



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO DI CHIMICA E FARMACIA

Scuola di Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche.

Indirizzo Scienze Chimiche.

**BIOSENSORI ELETTROCHIMICI DI TIPO
AMPEROMETRICO DI POTENZIALE INTERESSE
NELLA CARATTERIZZAZIONE DI PRODUZIONI
AGROALIMENTARI.**

Tesi di Dottorato di

Dott.ssa Roberta Farre

Il Supervisore

Prof. Gavino Sanna

Il direttore

Prof. Stefano Enzo

A due persone speciali, alle mie nonne.

Indice

Introduzione	pag. 1
Capitolo 1	pag. 9
1.1 Stato dell'arte	pag. 9
1.1.1 HMF (5-idrossimetil-2-furaldeide)	pag. 19
1.1.2 Composti polifenolici	pag. 31
1.2 Classificazione dei biosensori	pag. 50
1.2.1 Biosensori elettrochimici	pag. 53
Biosensori amperometrici	pag. 54
Biosensori potenziometrici	pag. 55
Biosensori conduttimetrici	pag. 57
Biosensori impedimetrici	pag. 58
1.2.2 Biosensori ottici	pag. 59
1.2.3 Biosensori piezoelettrici	pag. 61
1.2.4 Biosensori calorimetrici	pag. 62
1.3 Enzimi	pag. 64
1.3.1 Introduzione	pag. 64
Aldeide Deidrogenasi e Diaforasi	pag. 70
Polifenolossidasi	pag. 71
1.3.2 Immobilizzazione enzimatica	pag. 73
Intrappolamento	pag. 74
Adsorbimento	pag. 76
Cross-linking	pag. 77
Immobilizzazione covalente	pag. 77
1.4 Polimeri conduttori	pag. 87
1.4.1 Introduzione	pag. 87

1.4.2 Polipirrolo	pag. 92
1.4.2.1 Metodi di sintesi	pag. 93
Sintesi elettrochimica	pag. 93
Sintesi chimica	pag. 97
1.4.3 Politiofene	pag. 99
1.4.3.1 Metodi di sintesi	pag. 106
Sintesi chimica	pag. 106
Sintesi elettrochimica	pag. 109

Capitolo 2 Parte Sperimentale, risultati e Discussione

	pag.116
2.1 Tecniche Voltammetriche	pag.116
2.1.1 Voltammetria ciclica.	pag. 116
2.1.2 Cronoamperometria	pag. 121
2.2 Strumentazione e reagenti	pag. 123
2.3 Procedure per la costruzione di biosensori	pag. 126
2.4 Biosensori per la determinazione del glucosio	pag. 132
2.5 Biosensori per la determinazione dell'HMF	pag.151
2.6 Biosensori per la determinazione dei polifenoli	pag. 192
2.7 Commenti e prospettive future	pag. 231

Introduzione

La rilevazione e il monitoraggio di contaminanti, quali composti chimici, tossine e agenti patogeni nei prodotti alimentari e nell'ecosistema, è di fondamentale importanza per valutare ed evitare rischi per la salute umana e per l'ambiente. Le tecniche analitiche tradizionali, come la cromatografia liquida e la gascromatografia, assai spesso combinate con la spettrometria di massa, sono altamente sensibili e selettive, ma sono costose, in genere richiedono tempi di analisi piuttosto lunghi, anche a causa della frequente necessità di far precedere, alla fase di analisi, step di estrazione, purificazione o derivatizzazione dell'analita. Per tali ragioni esse sono ad appannaggio di personale altamente qualificato e laboratori attrezzati, e male si prestano ad attività sistematiche di monitoraggio in ambito applicativo da parte di personale non specificamente formato. È pertanto percepita fortemente l'esigenza di realizzare dispositivi analitici semplici, relativamente poco costosi, specifici, sensibili e portatili che permettano un adeguato monitoraggio di un gran numero di matrici biotiche.

I biosensori sono dispositivi che possiedono almeno in buona parte queste caratteristiche, pertanto essi appaiono candidati ideali per azioni di monitoraggio e rapide determinazioni di analiti di tipo organico ed inorganico su matrici alimentari o di interesse ambientale (1).

In estrema sintesi, un biosensore è un dispositivo analitico costituito fondamentalmente da tre elementi principali: una componente biologica, un trasduttore e una componente elettronica (2).

La componente biologica (detta anche mediatore biologico o elemento di riconoscimento molecolare) è quella che conferisce specificità al bioelettrodo;

essa può essere costituita da enzimi, batteri, microrganismi, recettori cellulari, anticorpi, acidi nucleici, tessuti animali o vegetali e persino organi intatti. Da parte sua il trasduttore ha la funzione di convertire il segnale biochimico in un segnale analitico, rendendolo così idoneo ad essere associabile ad una determinazione quantitativa. Infine la componente elettronica, a sua volta costituita da un sistema di condizionamento del segnale, un display, un sistema di elaborazione dei dati e un sistema di memorizzazione, ovvero, in pratica, da tutto ciò che serve per l'acquisizione e la visualizzazione dei dati (2) (3).

Quando una specifica molecola "target" interagisce con la componente biologica viene prodotto - a livello del trasduttore - un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione della sostanza che si intende determinare (Figura 1).

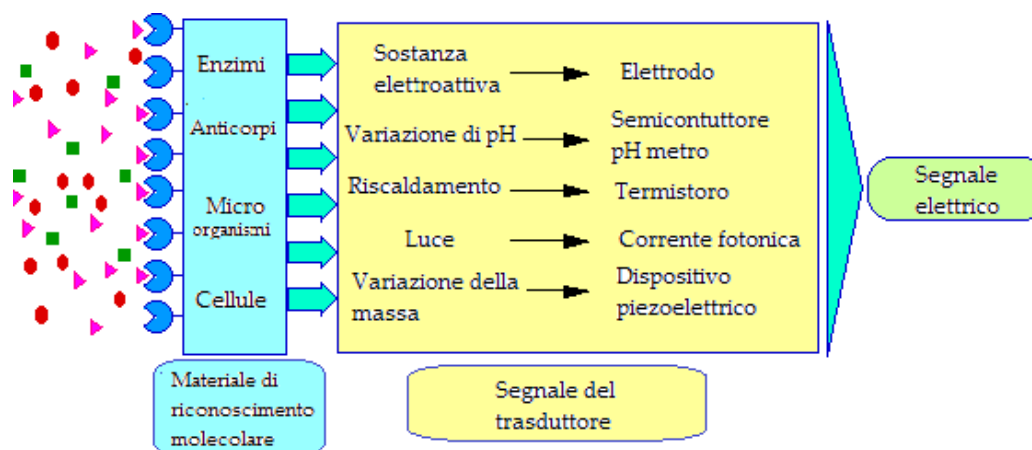


Figura 1. Schema di funzionamento di un biosensore.

Nel 2001 la IUPAC ha proposto per i biosensori la seguente definizione: "...un dispositivo autointegrato in grado di fornire informazioni analitiche quantitative o semiquantitative specifiche, utilizzando un elemento di riconoscimento biologico che si trova in diretto contatto spaziale con un elemento di trasduzione." Pertanto, "Un biosensore deve essere chiaramente

distinto da un altro dispositivo bioanalitico che richiede l'aggiunta di un reagente chimico per il suo corretto funzionamento." Infine, "...un dispositivo che sia monouso o che sia in grado di monitorare in maniera continuativa, o dopo una rapida e riproducibile rigenerazione, la concentrazione dell'analita può essere definito biosensore." (4).

Nonostante gli innegabili vantaggi che l'adozione di biosensori può determinare rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, la maggior parte di essi presentano ancora alcuni inconvenienti dovuti al non banale adattamento del sensore alla matrice reale in esame, mentre l'estrema specificità di risposta può talora essere d'ostacolo ove si intenda determinare contemporaneamente una molteplicità d'analiti, talché soltanto recentemente sono stati sviluppati alcuni sensori multi-analita.

Inoltre, e contrariamente ai biosensori ideati per applicazioni biomediche, quelli adoperati in diversi comparti quali il settore alimentare e quello ambientale allo stato attuale spesso non sono disponibili commercialmente, anche se gran parte della strumentazione sviluppata per l'applicazione nel settore sanitario potrebbe essere adattata, seppur con qualche peculiare difficoltà - per l'adozione in altri ambiti (3).

Di solito i biosensori possono essere classificati in modo generico sia in base alla natura del mediatore biologico, responsabile della selettività, sia in base al tipo di trasduttore impiegato (2). In accordo con il primo criterio, i biosensori possono essere classificati in dispositivi:

- Biocatalitici, o sensori enzimatici;
- Chemorecettoriali o sensori a recettore (anticorpi monoclonali, recettori endogeni o di membrana, o ancora enzimi);
- Immunologici o immunosensori.

D'altro canto, in base alla tipologia di trasduzione del segnale si può operare distinzione tra:

- Biosensori elettrochimici o bioelettrodi (amperometrici, conduttimetrici, impedimetrici e potenziometrici);
- Biosensori ottici o bio-optodi (SPR, Raman e FTIR, fibra ottica, etc.);
- Biosensori calorimetrici o biotermistori;
- Biosensori acustici.

Come ogni dispositivo analitico, anche i biosensori soffrono di numerose limitazioni, dovute principalmente alla precaria stabilità del materiale biologico impiegato per la rilevazione dell'analita. Essa infatti dipende dalle proprietà naturali dello stesso, che possono andar perse a causa di fenomeni degradativi (in genere processi di denaturazione) in seguito al discostamento dalle condizioni fisiologiche ottimali, generalmente in termini di pH, temperatura, o per la presenza di specie chimiche avvelenanti, quali ad esempio ioni di metalli pesanti.

Considerando il potenziale interesse del nostro gruppo di ricerca all'applicazione di questi dispositivi alla determinazione di molecole che possano fungere da indici qualitativi di prodotti del comparto apistico, e vista la sostanziale assenza di studi e prototipi di dispositivi di tal tipo in dette matrici, si è deciso d'intraprendere una nuova linea di ricerca, finalizzata a progettare, costruire ed applicare dei biosensori per l'analisi ed il monitoraggio di prodotti d'alveare (quali miele, propoli e gelatina reale).

L'apicoltura è praticata in quasi tutti i paesi del mondo, seppure con maggiore o minore intensità, e con specifiche caratteristiche che riflettono differenti condizioni ambientali e sociali.

In questi ultimi anni, e soprattutto nel 2014, il mercato internazionale del miele sta evidenziando una situazione di notevole difficoltà a causa della scarsità di prodotto. Le quantità insufficienti e i prezzi elevati del 2013 si sono riproposti anche lo scorso anno e con un sostanziale restringimento dei tradizionali divari di prezzo tra i diversi tipi di miele (chiari e scuri). I motivi sono riconducibili principalmente ad eventi climatici negativi (5) ed a molteplici fenomeni di inquinamento ambientale, sia circoscritto che generalizzato, che sempre più frequentemente mettono a repentaglio la stessa sussistenza delle colonie (6) (7). Anche l'apicoltura italiana ha risentito notevolmente di questi fattori. Rispetto al 2013, anno in cui le criticità erano localizzate principalmente nelle regioni settentrionali e soprattutto per alcuni mieli uniflorali (acacia), il 2014 si è rivelato una pessima annata per tutta la penisola, senza distinzioni fra produzioni primaverili o estive, sia al Nord che al Sud. Per quanto riguarda l'andamento produttivo, la produzione italiana di miele nel 2014, stimabile in una forbice compresa tra 11.500 e 13.000 t, ha subito una contrazione pari a circa il 50% rispetto alla produzione nazionale media (5).

Per quanto riguarda la Sardegna la produzione, anche se migliore rispetto a quella del 2013, appare ancora insoddisfacente per il cardo (media complessiva di 15 kg/alveare). Sono stati ottenuti raccolti discreti di eucalipto, con medie produttive di 15÷18 kg/alveare e picchi fino a 25 kg/alveare in alcune zone umide dell'entroterra. Per il corbezzolo i raccolti sono stati pressoché azzerati a causa della scarsità di piogge nei mesi di agosto e settembre, che hanno determinato un ritardo della fioritura. Al contrario sono state buone le produzioni di millefiori (attorno ai 20÷25 kg/alveare), in conseguenza delle predette difficoltà nella produzione di mieli uniflorali (5).

Anche in conseguenza delle criticità sin qui accennate, ma principalmente in funzione dell'accresciuta domanda da parte di un mercato che riconosce in

queste produzioni caratteri di eccellenza e di tipicità, dal punto di vista economico si è osservato – nel periodo compreso dal 2003 al 2014 - un notevole aumento del prezzo del miele italiano. A mero titolo esemplificativo, per il miele d'acacia è stato raggiunto un prezzo al dettaglio pari a 8,30 €/kg, per il miele di agrumi 4,64 €/Kg, castagno 6,14 €/Kg, melata 5,03 €/Kg, millefiori 4,27 €/Kg (5).

Il gruppo di ricerca in cui è stato svolto questo lavoro si è da sempre occupato della caratterizzazione dei prodotti d'alveare di origine sarda e della messa a punto di nuove metodiche analitiche per la determinazione di markers di freschezza dei prodotti d'alveare.

È noto che il miele appartenga alla categoria degli alimenti aventi importanti proprietà funzionali vista la sua particolare composizione chimica in termini di zuccheri (glucosio e fruttosio) e composti ad attività antiossidante (polifenoli). Tuttavia essendo un alimento ad elevato contenuto saccaridico ha una notevole predisposizione alla produzione, attraverso particolari reazioni di caramellizzazione (8) degli zuccheri o attraverso la reazione di Maillard (9), di un composto aldeidico, la 5-idrossimetil-2-furaldeide, da anni utilizzata come marker di freschezza del miele. La necessità di valutare questi parametri porta spesso all'utilizzo di tecniche cromatografiche oppure spettrofotometriche, solitamente caratterizzate da elevato costo e da lunghi tempi d'analisi. Si è deciso per questo motivo di intraprendere questo nuovo percorso di ricerca che ha come obiettivo la costruzione di biosensori per l'analisi di queste matrici, ed in particolare per la determinazione di alcuni degli analiti che ne caratterizzano la composizione chimica.

Anche in relazione alla mancanza di esperienza pregressa del gruppo di ricerca nel settore della biosensoristica, si è avvertita la necessità di acquisire il necessario background pratico onde poter svolgere proficuamente l'attività di

ricerca prefissata. Pertanto, in una fase propedeutica al principale obiettivo della ricerca, si è cercato di mettere a punto dei biosensori per la determinazione del glucosio. La scelta di tale molecola come benchmark è stata conseguente al fatto che detto analita è un componente maggioritario del miele, ma anche a causa della cospicua letteratura pregressa esistente sull'argomento, che sarebbe certamente risultata d'estrema utilità per sopperire alle scarse competenze iniziali. Contemporaneamente è stato possibile valutare il comportamento, in tale contesto, di polimeri conduttori di natura tiofenica quali potenziali componenti attivi del biosensore in itinere. La sintesi e la caratterizzazione di nuovi derivati tiofenici rappresenta infatti, un argomento di ricerca su cui il gruppo che ha sviluppato detto studio ha consolidate competenze. Sulla base dei risultati ottenuti nella fase preliminare, si è deciso di sintetizzare un nuovo monomero di potenziale interesse nella realizzazione di un biosensore per la determinazione dei polifenoli in prodotti d'alveare. Ultimo obiettivo del presente studio è stato quindi quello di mettere a punto un biosensore per la determinazione dell'HMF in matrici d'alveare. Riassumendo gli obiettivi realizzativi della presente Tesi di Dottorato sono stati:

1. Sviluppo di due biosensori amperometrici basati sulla glucosio ossidasi, immobilizzata su polimeri tiofenici, per la determinazione del glucosio in alimenti.
2. Sintesi di un nuovo monomero tiofenico, da utilizzare come polimero per l'immobilizzazione della componente biologica nello sviluppo di un biosensore elettrochimico a tirosinasi (e/o laccasi) per la determinazione del contenuto di polifenoli totali in matrici d'alveare.
3. Costruzione di un biosensore elettrochimico bienzimatico, basato sugli enzimi aldeide deidrogenasi e diaforasi, per la determinazione della 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF) in produzioni d'alveare.

1. **Van Dorst B. et al.** Biosensors and Bioelectronics. 2010, Vol. 26, pp. 1178-1194.
2. **Serra P.A.** Design and Construction of a Distributed Sensor NET for Biotelemetric Monitoring of Brain Energetic Metabolism using Microsensors and Biosensors. Biosensors. 2010, pp. 241-260.
3. **Sharma H. et al.** Sensors and Actuators B. 2013, Vol. 183, pp. 535-549.
4. **Justino C. L. et al.** Trend in Anal. Chem. 2015, Vol. 68, pp. 2-17.
5. **Naldi G.** MIELE ANDAMENTO PRODUTTIVO E DI MERCATO PER LA STAGIONE 2014. www.ilvaloredellaterra.it. [Online] 2015.
6. **Hendrix P. et al.** Bee mortality and bee surveillance in Europe, Scientific Report, submitted to European Food Safety Authority. 2009.
7. **Van Engelsdorp D. et al.** PLoS One. 2008, Vol. 3, 12, p. 4071.
8. **Kroh L. W. et al.** Food Chemistry. 1994 йил, Vol. 51, pp. 373-379.
9. **Ames J. M.** The Maillard reaction. Biochemistry of food proteins. London : Hudson, pp. 99-153.

Capitolo 1

1.1 Stato dell'arte.

Di biosensori si inizia a parlare per la prima volta nei primi anni sessanta, quando – nel 1962 - Clark e Lyons (1) descrissero per la prima volta un dispositivo amperometrico per la determinazione del glucosio nel sangue che utilizzava l'enzima glucosio ossidasi (GOx). Si trattò in quel caso di un'evoluzione della cella di Clark per la determinazione coulomboamperometrica dell'ossigeno, sviluppata negli anni precedenti, implementata dall'aggiunta di una membrana da dialisi che intrappolava l'enzima. Il meccanismo di funzionamento dell'elettrodo si basa sulla seguente reazione enzimatica:



in cui la variazione del flusso di O₂ viene monitorata in relazione all'entità di riduzione dell'H₂O₂ che avviene sul catodo di Pt.

Alcuni anni più tardi Updike e Hicks (2) elaborarono un modello biosensoristico per la determinazione del glucosio in cui la componente biologica veniva immobilizzata in un gel di poliacrilammide sulla superficie di un elettrodo ad ossigeno.

Nel 1969 Guilbault e Montalvo (3) descrissero un dispositivo potenziometrico costituito da un elettrodo di vetro accoppiato con l'enzima ureasi per la determinazione dell'urea nel sangue. Il principio di funzionamento era basato sulla determinazione delle variazioni del pH della matrice in esame, al procedere della reazione catalizzata dal biorecettore.

Sempre Guilbault e collaboratori (4) elaborarono nel 1973 un biosensore per la determinazione del glucosio nel sangue, basato sul monitoraggio amperometrico del perossido d'idrogeno originato dalla catalisi enzimatica.

Nel 1975 la Yellow Springs Instruments in Ohio commercializzò il primo biosensore per la determinazione del glucosio nel sangue.

Dagli anni '80 in poi lo sviluppo e l'applicazione dei biosensori nel settore medico, ambientale ed alimentare ha suscitato un notevole interesse sia nel campo accademico che in quello industriale. Allo stato attuale i biosensori maggiormente utilizzati sono quelli di tipo elettrochimico, grazie alla loro versatilità, sensibilità e rapidità di misura.

Il settore alimentare rappresenta probabilmente uno dei campi in cui si avverte una crescente necessità di effettuare un'ampia varietà di determinazioni analitiche e di test di controllo su molteplici matrici reali, spesso anche di natura complessa (5).

Tuttavia, una ricerca sul numero di pubblicazioni riguardanti i biosensori tra il 2005 ed il 2010 condotta dalla *ISI Web of Science* oggettiva che, a fronte di 12155 pubblicazioni sui biosensori, solo 496 (ossia solo poco più del 4% del totale) è relativo ad applicazione di tali dispositivi in campo agro-alimentare (6). Questa situazione è probabilmente dovuta al fatto che tale ambito è molto refrattario a rimpiazzare le tecniche analitiche abitualmente utilizzate con altre a maggior carattere d'innovatività, quali quelle impieganti biosensori. Ciò avviene sia per l'elevato costo di alcuni biosensori commerciali, ma anche perché la necessità d'introdurre nel protocollo analitico, prima della lettura elettrochimica, step di preparazione ed estrazione del campione, fa sì che i biosensori spesso non costituiscano un'alternativa economicamente valida ai metodi tradizionali d'indagine (6).

I sistemi enzimatici ed i microrganismi sono sempre stati sfruttati nel campo alimentare, basti pensare agli impieghi nel settore lattiero-caseario, ai processi di fermentazione alcolica, o ancora ai processi di lievitazione dei prodotti da forno e delle paste alimentari.

Sono comunque rintracciabili in letteratura metodi applicativi atti alla determinazione di metaboliti organici quali glucosio, lattosio, etanolo e vitamine in matrici alimentari di diversa natura (5); per l'individuazione di agenti contaminanti di tipo biologico, quali microrganismi, o chimico, ad esempio i residui di pesticidi o antibiotici; oppure ancora per la valutazione del grado di freschezza di un alimento, attraverso il monitoraggio di sostanze, spesso considerate indicative di processi di deterioramento dei prodotti (es: H₂O₂, HMF nel miele, trimetilammina e inosina nei pesci) (7).

In commercio esistono almeno due tipi di biosensori impiegati per l'analisi di matrici alimentari: il Biacore Q e l'HLAB-2020 (6). Il primo è stato prodotto dalla GE Healthcare, per la determinazione di alcune vitamine (quali acido folico, acido pantotenico e vitamina B₁₂), di contaminanti chimici (antibiotici) o agenti patogeni (*Staphylococcus Aureus*, *S. epidermis*, *E. Coli*) nei cibi. Si tratta di uno strumento totalmente automatizzato basato sulla risonanza plasmonica di superficie (SPR) in cui i campioni ed i reagenti vengono iniettati automaticamente per massimizzare la precisione dei risultati. Sono stati inoltre prodotti dei kit, la cui componente biologica può essere costituita da anticorpi, recettori, o aptameri, che - attraverso interazioni d'affinità - reagiscono con specifiche molecole target producendo un segnale proporzionale alla concentrazione delle suddette molecole.

L'HLAB-2020, prodotto dalla Hanson Technologies, permette di valutare la presenza dell'*Escherichia Coli* e di allergeni nei cibi. Fondamentalmente si tratta della versione commerciale dell'Array biosensor prodotto dalla Naval Research

Laboratory (NRL); si tratta di un biosensore ottico disegnato per la determinazione simultanea di diversi analiti in vari campioni. In questo sistema un elemento di riconoscimento biologico viene immobilizzato sulla superficie di una guida d'onda ottica, e l'analita viene determinato mediante prove di spettrometria a fluorescenza accoppiata con la tecnologia delle onde evanescenti (8), sfruttando il fenomeno ottico della riflessione totale interna.

Come si è già visto, il problema della determinazione di zuccheri semplici tramite biosensori è stato uno dei primi ad essere affrontato, tuttavia la messa a punto di biosensori per la determinazione del glucosio in matrici alimentari di diversa natura è ancora uno dei problemi analitici maggiormente studiati. Tale argomento ha acquisito ulteriore impulso già in tempi passati, ad esempio nell'ambito dei processi di valorizzazione del siero di latte e di smaltimento dei relativi effluenti di lavorazione (5).

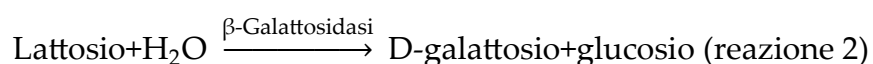
Solitamente l'enzima alla base del funzionamento di tali dispositivi è – come già illustrato in precedenza (reazione 1) - la glucosio ossidasi, immobilizzata con diverse tecniche sulla superficie del trasduttore. Generalmente questi biosensori sono costituiti da dispositivi amperometrici rivestiti da gel o membrane in cui si ritrova immobilizzata la componente biologica. Essi hanno delle limitazioni, in quanto l'estensione dell'intervallo di linearità del sensore può essere limitato dal valore della pressione parziale dell'O₂ in soluzione. Infatti il corretto funzionamento del dispositivo presuppone un'adeguata pressione parziale di ossigeno, e ciò ne preclude l'applicabilità in condizioni prossime all'anaerobiosi. Per risolvere questo problema, si è messa a punto una nuova generazione di biosensori che impiega mediatori diversi dall'ossigeno (quali coppie ferrocene/ione ferricinio o ferrocianuro/ferricianuro, etc.) in grado di sostituire l'O₂ nel trasporto degli elettroni tra la componente biologica e l'elettrodo (5).

Tra le recenti applicazioni in tale contesto, si può ricordare il contributo di Maines et al. (9), che hanno messo a punto un biosensore per la determinazione del glucosio in campioni di frutta fresca. La GOx è stata immobilizzata sulla superficie elettrodica su di una membrana di acetato di cellulosa modificata con Tween-80, un detergente non ionico in grado di proteggere l'enzima immobilizzato dal pH acido dei campioni. Appleton et al. (10) ha presentato una tecnica per l'immobilizzazione della GOx mediante sfere di vetro poroso (CPG) modificate con alchilammina. I gruppi amminici vengono prima attivati con una soluzione di glutaraldeide al 6,25% in tampone fosfato 0,1 M e a pH 6,0, e l'enzima viene quindi immobilizzato solubilizzando la GOx in una nuova soluzione di tampone fosfato a cui vengono aggiunti 0,5 g del vetro attivato; in un altro esperimento le CPG attivate vengono aggiunte ad una soluzione enzimatica, preparata sempre in tampone fosfato pH 6, contenente il polielettrolita DEAE-dextran. In quest'ultimo caso il sistema enzima/polielettrolita viene stabilizzato impiegando il sorbosio o il trealosio.

Inoltre l'utilizzo dei polimeri conduttori come polipirrolo, polianilina, politiofene etc. nello sviluppo dei biosensori ha portato all'ottenimento di nuovi dispositivi in cui la componente enzimatica è intrappolata all'interno del film polimerico. La letteratura mostra diversi lavori in cui il PPy viene utilizzato in maniera estensiva per lo sviluppo di questi strumenti grazie alle sue proprietà: elevata aderenza ai materiali elettrodici, modulazione della superficie dell'elettrodo, capacità di controllo delle proprietà del polimero modificando le condizioni di deposizione, procedure di immobilizzazione enzimatica semplici ed in condizioni ambientali blande, e quindi compatibili con la conservazione dell'attività enzimatica (11). L'evoluzione delle conoscenze di base sui polimeri conduttori portarono ben presto alla realizzazione dei primi biosensori in cui il polimero veniva impiegato anche per l'intrappolamento della GOx, mediante

ossidazione elettrochimica del monomero a partire da soluzioni contenenti anche l'enzima (11). Poiché al pH di lavoro la GOx assume carica negativa mentre il polimero risulta, nelle medesime condizioni, esser carico positivamente, l'incorporazione ionica della GOx nella matrice porta alla neutralizzazione del sistema, realizzando in tal modo un biosensore avente un range dinamico lineare compreso tra $1 \cdot 10^{-3}$ e 0,1 M in analita (11) (12). Tuttavia l'ossidazione elettrochimica del perossido d'idrogeno prodotto per catalisi enzimatica spesso comportava la riossidazione di altre specie presenti nel bulk di soluzione. Tali osservazioni hanno portato all'introduzione di sostanze che agiscono da mediatori nel processo redox, quali ad esempio i benzochinoni, che permettono di lavorare a potenziali di ossidazione decisamente più contenuti (12). Questa tipologia di biosensori è stata adottata anche in altri studi in cui si utilizza il politiofene o la polianilina, e in cui vengono variate le condizioni per l'immobilizzazione enzimatica, passando dalle procedure di intrappolamento diretto nel reticolo polimerico al cross-linking con i comuni agenti leganti reticolanti come glutaraldeide o carbodimmidi (13).

Assieme al glucosio, altri analiti appaiono di fondamentale importanza nel monitoraggio dei cibi; tra questi ricordiamo il lattosio, che rappresenta il disaccaride maggiormente presente del latte (in concentrazione mediamente compresa tra il 4 e il 6%) e nei prodotti caseari. Esso viene idrolizzato dall'enzima β -galattosidasi per formare D-galattosio e glucosio:



Il gruppo di ricerca guidato da Tkac (14) ha messo a punto due tipi di biosensori amperometrici per la determinazione di questo analita, basati sulla

contemporanea immobilizzazione di due enzimi (galattosio ossidasi e perossidasi) o la contemporanea immobilizzazione di tre enzimi (β -galattosidasi, galattosio ossidasi e perossidasi) utilizzando come elettrodo lavorante una barretta di grafite sulla quale è stato pre-adsorbito del ferrocene. L'uso della galattosio ossidasi previene l'interferenza del glucosio, mentre la β -galattosidasi migliora la sensibilità del sensore.

Anche la determinazione dell'acido ascorbico è di grande importanza nell'industria alimentare, in quanto si tratta di un importante nutraceutico grazie alle sue note proprietà antiossidanti. In linea generale l'analita viene determinato attraverso l'impiego dell'ascorbato ossidasi, secondo la seguente reazione:



Nonostante le diverse versioni dei biosensori per la determinazione di questo analita, nella gran parte dei casi i dispositivi sono costruiti facendo riferimento allo schema di funzionamento del catodo della cella di Clark per la misura dell'O₂. La concentrazione dell'acido ascorbico risulta esser proporzionale alla diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno in soluzione, che viene determinata dalla cella di Clark. Un procedimento simile è stato realizzato anche da Matsumoto e collaboratori (15), i quali hanno immobilizzato l'enzima su membrane di collagene, utilizzando la tecnica del cross-linking con glutaraldeide. Essi hanno applicato il metodo nella determinazione dell'acido ascorbico in campioni di diversi tipi di frutta, con ottimi risultati sia dal punto di vista dell'accuratezza che dal confronto dei risultati ottenuti con altre metodiche analitiche.

Guilbault et al. (16) svilupparono invece un sensore per l'ossidazione selettiva dell'acido ascorbico a bassi potenziali (+0,10 V vs Ag/AgCl) minimizzando

l'effetto di altri interferenti ossidabili presenti nei succhi di frutta. Il sensore è stato ottenuto modificando un elettrodo di carbonio vetroso con un film di polianilina.

La determinazione di alcoli, soprattutto etanolo, è importante nell'industria alimentare, infatti le bevande alcoliche devono essere sottoposte a continui processi di analisi in modo tale da tenere sotto controllo il tenore di etanolo lungo tutto il processo produttivo. Elettrodi per la determinazione di questo analita sono stati sviluppati da diversi gruppi di ricerca per applicazioni su matrici quali vino e birra (5). I risultati, tuttavia, non sono al momento incoraggianti: i sensori si sono dimostrati poco sensibili, con un tempo di vita molto breve, ma soprattutto hanno rivelato una scarsa specificità, risultando infatti esser sensibili non solo ad alcoli diversi dall'etanolo, ma anche ad alcuni acidi organici. Sensori enzimatici dotati di un maggiore livello di specificità sono quelli che impiegano l'enzima alcool deidrogenasi da lieviti; questo enzima tuttavia richiede la presenza del coenzima nicotinamminaadenosindinucleotiche (NAD) per il funzionamento, e ciò complica non di poco la costruzione del biosensore. Tuttavia sono stati proposti biosensori, con specificità piuttosto elevata, che non richiedono la presenza del coenzima NAD. Ad esempio, uno di essi è stato ottenuto immobilizzando, su un elettrodo per l'O₂, cellule della membrana del batterio *Gluconobacter Suboxydans* assorbite su un filtro di nitrocellulosa (5) (17). Queste cellule, dotate di un complesso sistema enzimatico, comprendente gli enzimi alcool deidrogenasi e aldeide deidrogenasi e del coenzima Q, sono in grado di convertire l'etanolo in acetaldeide e quest'ultima in acido acetico. Durante questo processo, si ha un contemporaneo consumo di ossigeno, che è monitorato dal sensore per l'O₂ (17). La variazione della pressione parziale dell'O₂ in soluzione risulta esser quindi proporzionale alla concentrazione

dell'etanolo. In generale i biosensori proposti in letteratura lavorano sfruttando l'attività catalitica degli enzimi alcol ossidasi o alcol deidrogenasi secondo le seguenti reazioni enzimatiche:



Shkotova et al. hanno messo a punto un biosensore basato sulla riossidazione del perossido d'idrogeno, sfruttando un trasduttore amperometrico in cui è immobilizzato l'enzima alcol ossidasi in una resina polimerica. Il biosensore, utilizzato per la determinazione dell'etanolo in bevande alcoliche ha mostrato un LOD pari a $3,5 \cdot 10^{-2}$ (% V/V) (18).

Un altro biosensore amperometrico immobilizza invece l'enzima alcol deidrogenasi (ADH) in un film di pirrolochinolina; questo dispositivo, indipendente dalla pressione parziale dell'ossigeno, opera in presenza di un cofattore solubile (NAD^+) che garantisce il trasferimento diretto degli elettroni dal centro attivo dell'enzima verso l'elettrodo, rendendo più semplici sia la costruzione che l'impiego del biosensore. L'enzima è intrappolato per cross-linking con poli(etilenglicol)diglicidil etero (PEGDGE) in un idrogel di tipo redox, realizzato utilizzando un complesso di Osmio modificato con un polimero non conduttivo ed impiegato come mediatore elettrochimico. Il substrato viene determinato attraverso l'ossidazione del mediatore ($\text{Os}^{2+}/\text{Os}^{3+}$) al potenziale di +0,20 V vs Ag/AgCl (19).

Si è già accennato alla possibilità di utilizzare particolari tipi di sensori (o biosensori...) per determinare, anche in continuo, analiti che possano fungere da indicatori dello stato di conservazione d'importanti prodotti alimentari. Ad esempio, il livello di concentrazione di trimetilammina o d'inosina nel pesce risulta esser associabile al suo stato di freschezza; mentre quello di α,ω -

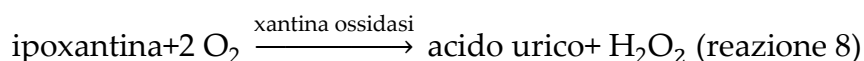
diammine biogene quali la cadaverina o la putrescina è stato proposto come indice dello stato di deterioramento della carne macellata (5).

Nel primo caso la freschezza del pesce è correlabile al decorso del pattern di decomposizione dell'ATP, di seguito riportato:



ove ATP= adenosintrifosfato; ADP= adenosindifosfato; AMP=adenosinmonofosfato; IMP= inosinamonofosfato; HxR= inosina; Hx = ipoxantina; x = xantina.

Nakatani et al. (20) hanno realizzato un biosensore amperometrico per la determinazione dell'ipoxantina nel pesce basato sulla seguente reazione enzimatica:



ove l'enzima xantina ossidasi viene immobilizzato su un elettrodo di Pt rivestito di nafion, utilizzando albumina di siero bovino (BSA) e glutaraldeide. Il biosensore è stato calibrato con ipoxantina ad un potenziale di +0,60 V vs Ag/AgCl in tampone fosfato a pH 7,0. Il dispositivo ha una risposta lineare nel range di concentrazione compreso tra $2 \cdot 10^{-6}$ e $1,85 \cdot 10^{-4}$ M ed un tempo di risposta particolarmente breve (30 s). Il biosensore è stato impiegato per determinare, la variazione della concentrazione di queste sostanza in pesci reali. Poiché l'adenosina-5'-fosfato viene rapidamente decomposta e, per tale ragione, l'aumento della concentrazione della ipoxantina è indice di non freschezza del prodotto.

Il gruppo di ricerca in cui è stato svolto il lavoro di dottorato è da tempo attivo nella messa a punto di nuovi metodi analitici volti alla determinazione di analiti significativi nel descrivere aspetti oggettivanti la qualità di produzioni

alimentari tipiche della Sardegna, quali ad esempio i prodotti di alveare o i prodotti lattiero-caseari. Alla luce di tale fatto si è ritenuto logico intraprendere una nuova linea di ricerca avente come obiettivo lo sviluppo di opportuni biosensori volti all'oggettivazione di aspetti inerenti la qualità di prodotti d'alveare tipici quali alcune varietà di miele, la gelatina reale e la propoli. Tra i possibili analiti in grado di poter esser significativi in tal senso, l'attenzione si è focalizzata sulla 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF) e sulla valutazione dell'attività antiossidante.

1.1.1 HMF (5-idrossimetil-2-furaldeide).

In relazione alla propria origine botanica, il miele differisce sia nell'aspetto che nelle proprietà sensoriali e nella composizione. I componenti aventi le più importanti proprietà nutraceutiche sono i carboidrati (soprattutto fruttosio e glucosio), presenti come loro somma in percentuale pari al 95%, assieme a circa 25 diversi oligosaccaridi (5-10%), comprendenti di- e trisaccaridi (21). Anche se il miele è un alimento ad alto contenuto di carboidrati, il suo indice glicemico varia entro un ampio intervallo, che va da 32 a 85 a seconda dell'origine botanica. Altri componenti presenti in minore quantità sono proteine, enzimi, aminoacidi, minerali, oligoelementi, vitamine, composti responsabili dell'aroma e sostanze polifenoliche. È stato osservato che dal punto di vista delle proprietà farmacologiche e curative, questo alimento manifesta peculiarità:

- antimicrobiche ed antivirali, mediante inibizione della crescita di microrganismi (soprattutto batteri gram-positivi) e funghi; tali attività sono correlate all'origine botanica, alla scarsa attività dell'acqua, al perossido d'idrogeno prodotto per azione dell'enzima glucosio ossidasi,

al pH acido del miele ed – ancora - alla presenza di composti come i polifenoli (22) (23) (24) (25).

- antinfiammatorie, attraverso un meccanismo che previene la formazione di radicali liberi dai tessuti infiammati (21).
- antiossidanti, tramite un meccanismo di prevenzione dello stress ossidativo delle cellule grazie all'apporto di una notevole quantità di sostanze (quali flavonoidi, acido ascorbico, acidi fenolici, derivati carotenoidi, amminoacidi e proteine) in grado di interagire ed inibire i radicali liberi presenti nell'organismo (21).
- antitumorali, attraverso l'inibizione di sostanze mutagene prodotte durante i processi di cottura dei cibi (3-ammino-1,4-dimetil-5H-piridol-[4,3-b]indolo) oppure attraverso l'attivazione del sistema immunitario dell'organismo (26).

Tutti questi effetti vengono esplicitati attraverso un consumo giornaliero di prodotto pari a 50-80 grammi.

Grazie al suo elevato contenuto di carboidrati il miele rappresenta un'ottima fonte energetica, soprattutto per gli atleti. Gli zuccheri più importanti presenti nel miele sono il glucosio ed il fruttosio mentre, per quanto riguarda gli oligosaccaridi, i più importanti sono i disaccaridi come il saccarosio, il maltosio, il trealosio ed il turanoso ed il palatinosio (21).

Durante il processo digestivo gli zuccheri semplici, come glucosio e fruttosio, vengono trasportati dal sangue e possono essere impiegati come riserva energetica dall'uomo, basti pensare che una dose di circa 20 g di miele copre circa il 3% del fabbisogno energetico di un individuo (21).

Dal punto di vista proteico, il miele contiene circa lo 0,5% di sostanza proteica, principalmente sotto forma di enzimi e amminoacidi liberi.

I tre principali enzimi presenti sono la diastasi (amilasi), che decompone l'amido o il glicogeno in unità più piccole, le invertasi (saccarasi, α -glucosidasi), che decompone il saccarosio in fruttosio e glucosio, ed infine la glucosio ossidasi, che porta alla produzione di H_2O_2 ed acido gluconico a partire dal glucosio (21).

La quantità di vitamine e minerali è invece piccola rispetto agli altri componenti e la sua assunzione contribuisce solo in maniera marginale all'apporto delle quantità giornaliere raccomandate. È noto comunque che diversi mieli contengano quantità variabili di minerali e oligoelementi. Dal punto di vista nutrizionale cromo, manganese e selenio sono importanti soprattutto per i bambini e ragazzi di età compresa tra 1 e 15 anni. Infine il miele contiene una quantità di colina compresa tra lo 0,3 e i 25 mg/kg, e di acetilcolina compresa tra 0,06 e 5 mg/kg di prodotto (27). La colina è essenziale sia come costituente della membrana cellulare che come promotore dei suoi processi di riparazione, garantisce l'ottimale funzionalità del cervello ed è attivo nella prevenzione delle malattie cardiovascolari; mentre l'acetilcolina è un noto neurotrasmettitore.

Il miele possiede gusti e colori diversi in base alla propria origine botanica.

Gli zuccheri sono i principali composti responsabili del gusto del prodotto, mentre l'aroma dipende anche da aspetti qualitativi e quantitativi legati alla componente minoritaria. Nei decenni passati le ricerche relative all'aroma del miele hanno portato all'identificazione di 500 composti volatili differenti, in vari tipi di miele, dipendenti proprio dall'origine botanica del prodotto.

Tra tutti gli alimenti saccaridici, il miele offre condizioni ideali per la formazione di aldeidi furaniche: alte concentrazioni di zuccheri, bassi valori di pH e dell'attività dell'acqua, significativa concentrazione di sostanza proteica ed elevata concentrazione di acidi organici (28).

Tra queste, la più importante è rappresentata dalla 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF). Si tratta di un'aldeide eterociclica a struttura furanica avente sei atomi di carbonio (29).

La sua formazione spontanea può avvenire attraverso due vie principali: la caramellizzazione (30) e la reazione di Maillard (31) (imbrunimento non enzimatico).

Caramellizzazione.

La caramellizzazione degli zuccheri avviene a temperature superiori ai 100 °C e determina lo sviluppo di una vasta gamma di aromi generalmente associati al caramello. Uno degli intermedi chiave di questo processo è il 3-deossiosone che si forma da una prima reazione di enolizzazione degli aldosi e dei chetosi, come rispettivamente il glucosio e il fruttosio, e dalla successiva disidratazione dei composti enolici formati. Tale intermedio, in ambiente neutro o acido, va incontro a disidratazione, con formazione dei composti α -dicarbonilici che, attraverso una reazione di ciclizzazione, generano la 5-idrossimetil-2-furaldeide.

In assenza di acqua e in condizioni pirolitiche, esiste un percorso alternativo che porta alla formazione di HMF a partire dal fruttosio o dal saccarosio. Questo meccanismo comporta la formazione di un intermedio altamente reattivo in forma cationica che viene convertito in HMF.

Reazione di Maillard.

La reazione di Maillard comprende una vasta gamma di reazioni di glicazione delle proteine ed è stata oggetto di vari studi volti alla comprensione dei meccanismi di reazione che portano alla formazione di un elevato numero di prodotti. Si tratta di una reazione che coinvolge i gruppi amminici degli

amminoacidi e delle proteine e i gruppi carbonilici degli aldosi, ma anche del destrosio, del fruttosio, dell'amido di mais e delle maltodestrine. La reazione è favorita da calore, luce, metalli e valori leggermente alcalini di pH, e può essere suddivisa in tre fasi principali (32).

Nel caso di un aldoso, la prima fase è ad esempio caratterizzata dalla formazione di una base di Schiff attraverso la condensazione del carbonio carbonilico dello zucchero e il gruppo amminico dell'amminoacido. L'intermedio formatosi viene immediatamente convertito, per disidratazione, in una base di Schiff che verrà poi trasformata in una aldosilammina.

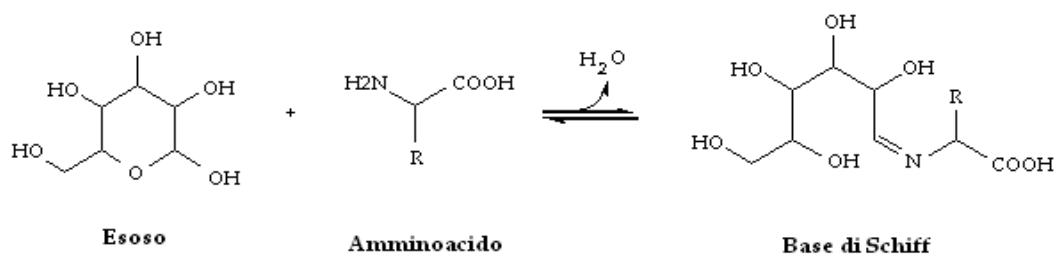


Figura 1.1 Schema della reazione di Maillard.

Questa successivamente subisce un riarrangiamento dei doppi legami che porta alla formazione di chetosammine (1-ammino-1-deossi-2-chetosi) tramite il cosiddetto riarrangiamento di Amadori: questo è considerato il passaggio chiave nella formazione dei più importanti intermedi per la reazione di imbrunimento.

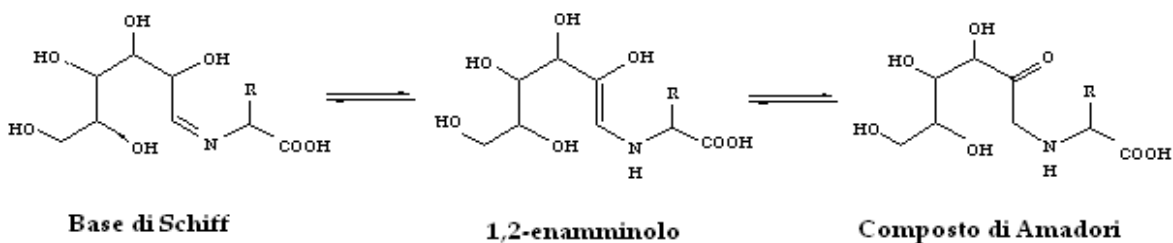


Figura 1.2 Schema del riarrangiamento di Amadori.

La seconda fase riguarda invece le reazioni che vedono coinvolti i composti di Amadori, i quali possono dare reazione di 1,2- o 2,3-enolizzazione (rispettivamente a pH acidi o debolmente basici), i cui prodotti, in seguito a deamminazione, generano il 3-deossialdochetoso che, per successive degradazioni, porta alla formazione di composti colorati e caratterizzati da un intenso aroma. Tra i prodotti di degradazione del 3-deossialdochetoso vi è HMF, la cui formazione - a partire da una base di Schiff - viene riportata di seguito.

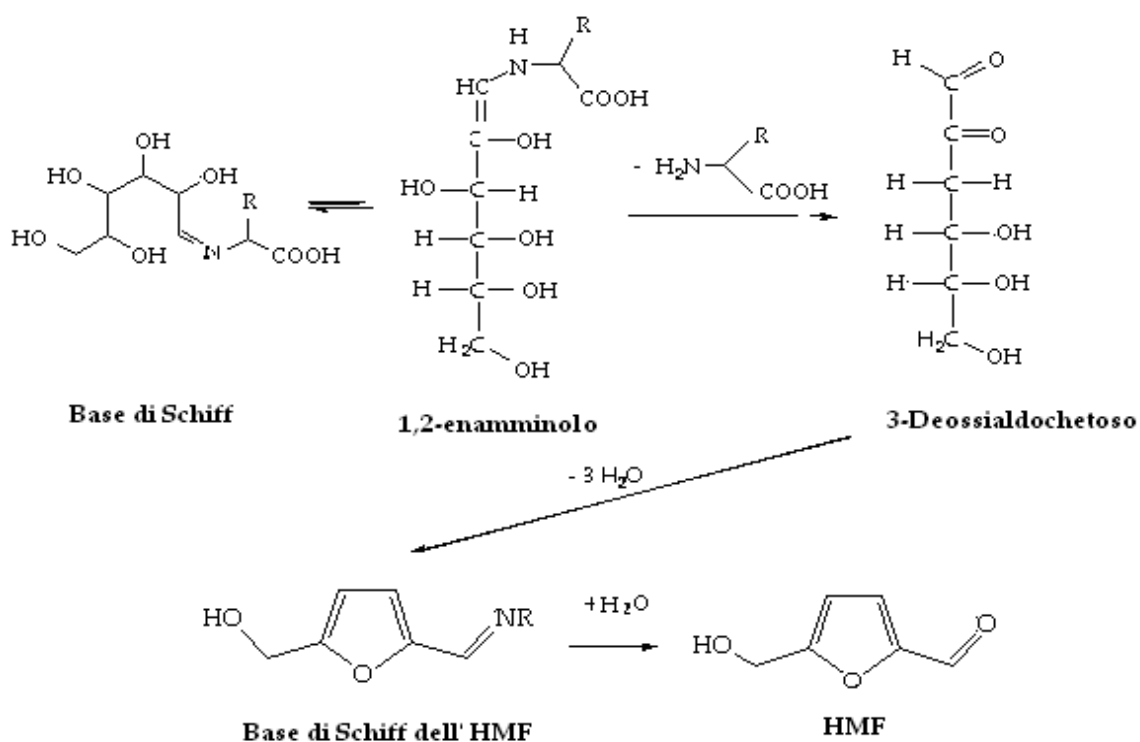


Figura 1.3 Meccanismo di degradazione dei prodotti di Amadori.

La terza ed ultima fase è caratterizzata dal raggiungimento di un alto grado d'imbrunimento e dallo sviluppo di aromi e gusti di arrostitimento e tostatura. Si formano in questo stadio le melanoidine, polimeri o copolimeri azotati, prodotti dalla reazione tra gli amminoacidi e le aldeidi volatili generate dalla degradazione di Strecker degli amminoacidi, e le pirazine, che contribuiscono

all'aroma di cioccolato o degli arrostiti di carne. Le melanoidine hanno una colorazione giallo-bruna e un contenuto di azoto variabile.

La velocità di formazione dell'HMF, oltre che dalla temperatura, è influenzata da diversi fattori quali il pH, l'attività dell'acqua e la struttura chimica dello zucchero che prende parte alla reazione. In figura sono illustrate le diverse vie di formazione dell'HMF negli alimenti.

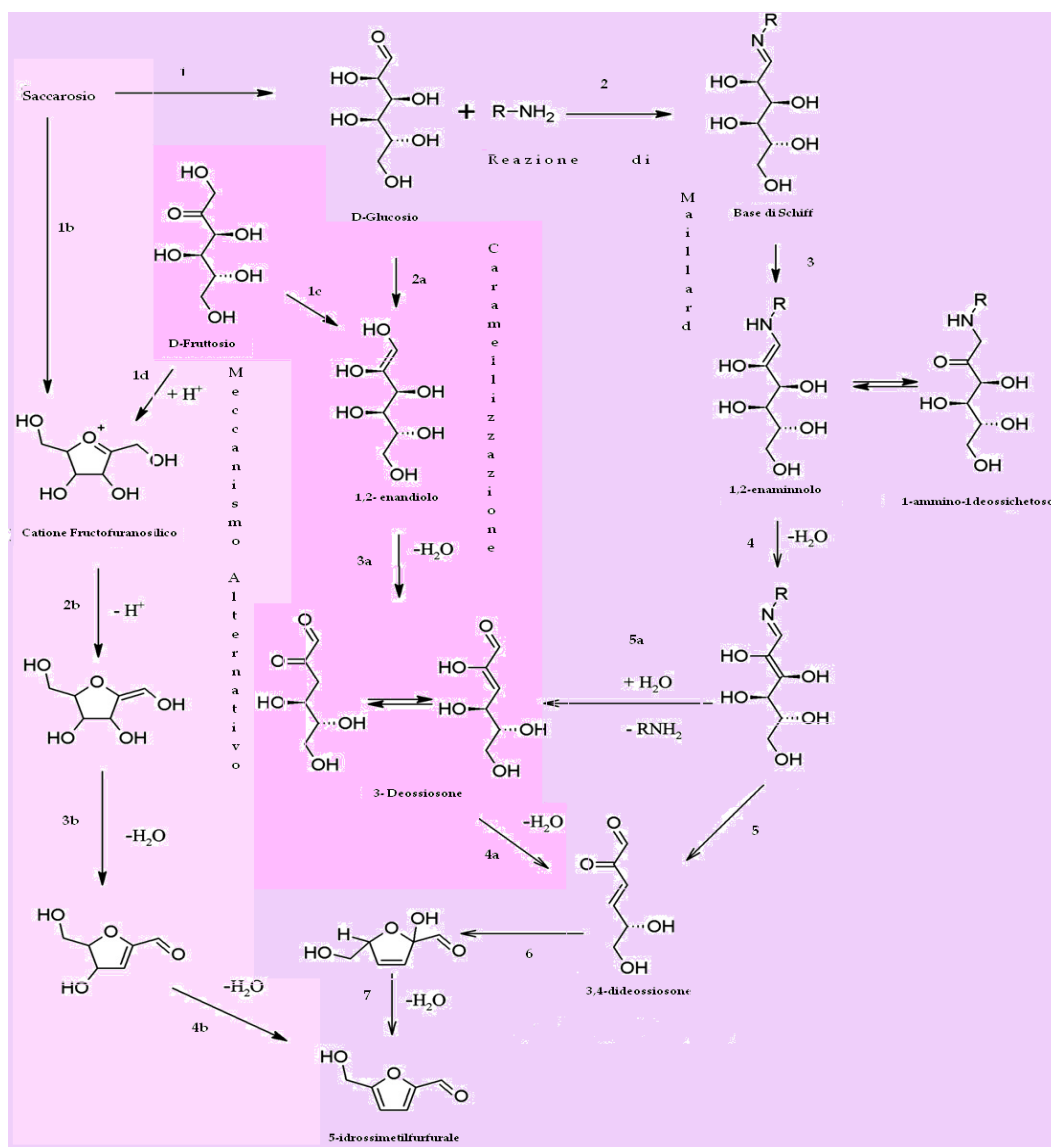


Figura 1.4 Schema di reazione proposto per la formazione dell'HMF negli alimenti (32) (33) (34).

Per questi motivi l'HMF è un parametro spesso associabile alla freschezza e alla qualità del miele. Inoltre la concentrazione di questo analita tende ad

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

aumentare con il grado di invecchiamento di questo alimento, in funzione di diversi fattori: acidità libera, percentuale di acqua, origine botanica e condizioni di conservazione. Basse concentrazioni di HMF sono quindi indice di qualità e di freschezza del prodotto.

D'altra parte, la presenza di potenziali composti tossici (aldeidi reattive, qual'è comunque HMF) negli alimenti ha attirato una attenzione crescente a tutela dei consumatori.

In particolare, secondo alcuni studi, HMF si colloca tra le sostanze che presentano il rischio di citotossicità, genotossicità e attività mutagena (28). D'altra parte, altri studi suggeriscono che probabilmente l'HMF non costituisca, per quantità mediamente assunta in relazione a quelle che si sono rivelate tossiche, un grave rischio per la salute umana.

Determinazione di HMF in alimenti.

La concentrazione di HMF rilevata negli alimenti che lo possono formare è direttamente correlabile ai tempi e alle temperature degli eventuali trattamenti termici a cui essi vengono sottoposti. L'aggiunta d'ingredienti secondari e le modalità di conservazione rappresentano un ulteriore fattore che influisce sul tenore di HMF di un alimento.

Il contenuto di HMF nei cibi può variare notevolmente, fino a superare la soglia dei grammi per chilogrammo, come nel caso dell'aceto balsamico, del caffè liofilizzato, del caramello alimentare o della frutta caramellata (33). Sebbene questi siano tra gli alimenti a più alto contenuto di HMF, sono in realtà il pane e il caffè a contribuire maggiormente all'assunzione di questo composto attraverso la dieta quotidiana (35). La letteratura offre diversi spunti relativi alla determinazione della 5-idrossimetil-2-furaldeide, che vedono l'impiego di molteplici tecniche strumentali.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Miele.

La Commissione Internazionale Miele (IHC) riconosce tre metodi ufficiali per la determinazione dell'HMF in tale matrice: due di essi sono di tipo spettrofotometrico, mentre il terzo è un metodo RP-HPLC (28). Il confronto delle loro prestazioni è stato riportato da Zappalà et al. (36), mostrando che i metodi spettrofotometrici permettono una notevole rapidità nelle analisi ma appaiono poveri di specificità e sensibilità; al contrario il metodo cromatografico è più preciso e sensibile ma richiede tempi di analisi lunghi.

Per quanto concerne la determinazione dell'HMF per via cromatografica, in genere il trattamento del campione prevede che piccole aliquote di miele vengano disciolte in acqua distillata, filtrate e iniettate (37) (38). In altri casi si procede con la chiarificazione delle soluzioni di miele mediante reattivi di Carrez (39) prima dell'introduzione cromatografica del campione. L'analisi viene solitamente condotta su colonne C18, utilizzando in genere come fase eluente miscele di soluzioni acquose di acidi (acido solforico (40), acido acetico (38) e metanolo.

In passato, il gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto il presente lavoro di Dottorato si è occupato di mettere a punto una nuova metodica RP-HPLC in luogo del metodo cromatografico ufficiale IHC per la determinazione dell'HMF nel miele, in quanto quest'ultimo oggettivava, nell'analisi del miele di corbezzolo, di una pesante interferenza data dall'acido omogentisico, marker di origine botanica del miele di corbezzolo, che coeluiva con l'analita. E' stato pertanto messo a punto un metodo diretto RP-HPLC (40), che è stato ottimizzato, validato e testato su 18 campioni di miele uniflorale provenienti da diverse aree geografiche dell'Italia (Sardegna, Piemonte e Toscana) e della Francia (Corsica). In una successiva estensione di questo studio, è stato messo a punto un metodo RP-HPLC in grado di determinare contemporaneamente,

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

oltre ad HMF, altri quattro tra aldeidi ed acidi furanici quali 2-furaldeide, 3-furaldeide, acido 2-furoico ed acido 3-furoico (30).

L'estensione di detti studi ad altri prodotti di alveare ha permesso, in tempi successivi, di mettere a punto per la prima volta un metodo cromatografico (41) volto alla determinazione dell'HMF nella gelatina reale. La gelatina reale, più comunemente nota come pappa reale, rappresenta uno dei prodotti più pregiati dell'alveare. Essa consiste in una secrezione prodotta dalle ghiandole ipofaringee e mascellari delle api nutrici che viene utilizzata come nutrimento per le larve (fino ai tre giorni di vita) e per l'ape regina (per tutta la vita). È una sostanza moderatamente acida i cui componenti principali sono acqua, proteine, zuccheri, lipidi e sali minerali. L'acqua costituisce circa i 2/3 della gelatina reale fresca, seguita da proteine e zuccheri, presenti anch'essi in grandi quantità. Le proteine costituiscono il 73,9% delle sostanze azotate ivi presenti, e, quattro tra le sei proteine principali sono glicoproteine. Il 60% di esse risulta esser solubile in acqua.

In generale la gelatina reale è un prodotto soggetto ad un rapido deterioramento, soprattutto se conservato in maniera non adeguata.

Nel corso degli anni sono state svolte diverse ricerche volte all'individuazione di un marker di freschezza per la gelatina reale, in grado di rivelare se un campione sia stato conservato in maniera corretta. La messa a punto di tale metodica era propedeutica a verificare che vi fossero i presupposti perché – in maniera analoga a quanto avviene per il miele – HMF potesse fungere da marker di freschezza anche per la gelatina reale, sulla base della considerazione che la contemporanea presenza di zuccheri e di proteine in tale matrice potesse determinarne le condizioni per la formazione di tale composto. Il riscontro preliminare con cui si è testato il nuovo metodo analitico ha avuto successo: l'analita è stato identificato in campioni di gelatina reale non freschi, mentre la

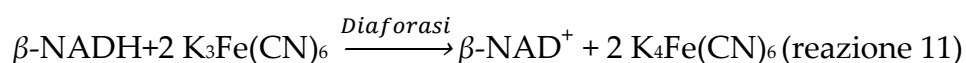
concentrazione di tale specie scende sotto il LoD del metodo nei campioni freschi. Nell'ambito di un successivo studio, si è cercato di valutare la variabilità della concentrazione di HMF di un unico campione di gelatina reale fresca in funzione della temperatura di conservazione (-18, 4 e 25°C) e del tempo di stoccaggio (fino a 9 mesi dopo il confezionamento). Mentre tutti i campioni di gelatina reale conservati tra 4 e -18°C hanno mostrato un livello di HMF sempre al di sotto del limite di rilevabilità, i campioni conservati a 25°C mostrano un aumento esponenziale della concentrazione di HMF in funzione del tempo. Questo fatto ha permesso di non poter escludere l'ipotesi che l'HMF possa rappresentare un buon marker di freschezza per la gelatina reale.

Purtroppo, a fronte del grande interesse analitico per la determinazione di HMF in una molteplicità di matrici (alimentari e biologiche), analogo riscontro è mancato per quanto riguarda la determinazione dell'HMF mediante biosensori. Infatti, l'indagine bibliografica ha messo in evidenza solo due contributi attinenti l'argomento.

Lomillo et al. descrivono due biosensori bienzimatici (42), entrambi basati sull'aldeide deidrogenasi (ALDH), che nel primo caso risulta esser associato con il cofattore β -nicotinammideadeninucleotide (β -NAD⁺) e con l'enzima Diaforasi, (a sua volta combinato con la coppia [K₄Fe(CN)₆]/[K₃Fe(CN)₆], utilizzata in qualità di mediatore redox), mentre nell'altro caso si associa ALDH con l'enzima NADH ossidasi. Lo schema di funzionamento di entrambi i biosensori si basa sulla reazione prodotta dall'enzima ALDH, che ossida il gruppo aldeidico a gruppo carbossilico provocando la contemporanea riduzione del cofattore secondo lo schema sotto proposto:



La riossidazione elettrochimica del NADH richiede elevati potenziali, e ciò determinerebbe l'ossidazione di altre specie, eventualmente presenti nella matrice che si sta analizzando, dando quindi luogo ad un'interferenza nel segnale generato. Pertanto è necessario abbinare un ulteriore enzima, dotato di selettività per quella specie chimica (NADH ossidasi, NOD), o in grado di abbassarne il potenziale di riossidazione (diaforasi). Le reazioni catalizzate dai due enzimi vengono di seguito riportate:



I biosensori sono stati sottoposti a prove di calibrazione mediante cronoamperometria operando in entrambi i casi in tampone fosfato a pH 8 e KCl 0,1 M, per il sistema Pt/ALDH/Diaph polarizzando l'elettrodo a $E = -0,15 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, mentre nel caso del biosensore Pt/ALDH/NOD, si è operato a $+0,60 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, effettuando, per ciascun sistema, aggiunte crescenti di HMF, in modo tale da indurre delle variazioni dell'intensità di corrente all'interno della cella elettrochimica. In questo modo, i potenziali applicati permettono nel primo caso di rigenerare il mediatore e nel secondo caso di indurre la riossidazione del NADH a NAD^+ , ripristinando, rispettivamente, il ciclo catalitico dei due biosensori. Dalle prove sperimentali riportate in questo articolo è emerso che i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando il biosensore Pt/ALDH/Diaph.

Anche il contributo pubblicato da Schultheissa et al. (43) prevede l'impiego della coppia enzimatica ALDH/NOD, entrambi immobilizzati tramite una membrana epossidica su un soppressore a micromembrana cationica. Il sistema così sviluppato è stato inserito e sfruttato come detector per HPLC, combinando

quindi l'efficienza di separazione delle tecniche cromatografiche ad elevata risoluzione con la specificità enzimatica e la sensibilità dell'analisi elettrochimica. Il dispositivo è stato poi impiegato, con esiti positivi, per l'analisi di prodotti come miele e caffè.

1.1.2 Composti polifenolici.

Le proprietà benefiche di diversi alimenti d'origine vegetale sono dovute ad alcuni dei loro metaboliti secondari, comunemente noti come fitonutrienti, che appartengono perlopiù a due classi fondamentali: polifenoli e terpeni (44).

I composti polifenolici sono delle sostanze ubiquitarie presenti in tutti gli organi delle piante e per questo motivo li ritroviamo facilmente nella dieta alimentare dell'uomo. Sono state identificate ben 8000 strutture fenoliche, disperse nel regno vegetale, che comprendono fenoli semplici a basso peso molecolare, e composti aventi una struttura più complessa e peso molecolare via via sempre più elevato (polifenoli, flavonoidi e tannini), che contengono nel loro scheletro numerosi sistemi aromatici (45).

Alla fine del XX° secolo, l'interesse per tali sostanze nei cibi è cresciuto notevolmente in seguito alla scoperta delle loro proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie, anti-microbiche e alle loro riconosciute capacità di fungere da radical-scavengers (46). Essi possono esercitare un effetto antiossidante indiretto, proteggendo gli enzimi dagli ossidanti endogeni presenti nell'organismo umano, fornendo una significativa protezione delle cellule dallo stress ossidativo, attiva a concentrazioni più basse rispetto a quella garantita dagli antiossidanti convenzionali (47) (48) (49).

I composti polifenolici più importanti a livello di attività biologica sono i flavonoidi: essi esercitano un ampio spettro di funzioni nella pianta, che includono la pigmentazione, l'interazione pianta-patogeno, la fertilità e la

protezione dalle radiazioni UV. Lo scheletro base dei flavonoidi è costituito da due anelli benzenici (indicati come A e B) collegati da una catena di tre atomi di carbonio che forma, con l'anello benzenico A, un anello piranico chiuso, detto anello C. Possono essere suddivisi in diversi sottogruppi in riferimento all'atomo di carbonio dell'anello C su cui si lega l'anello B e, in funzione del grado di insaturazione ed ossidazione dell'anello piranico, parleremo pertanto di flavoni, flavonoli, flavononi, isoflavonoidi, antociani, flavanoli, calconi, diidrocalconi, ed infine di auronni (50).

I flavonoidi sono soprattutto presenti nelle piante come glicosidi oppure nella loro forma esterificata. I termini aglicone e glicoside sono usati per indicare i flavonoidi che rispettivamente non contengono (o contengono) carboidrati nella loro struttura molecolare, rappresentati solitamente da glucosio, ramnosio, galattosio e arabinosio (50) (51). La notevole diversità delle strutture dei flavonoidi è dovuta alle alterazioni enzimatiche dello scheletro base. I gruppi idrossilici presenti nella struttura molecolare possono inoltre subire reazioni di metilazione o acetilazione che portano alla formazione di composti, sempre appartenenti alla categoria dei flavonoidi, aventi proprietà biologiche differenti rispetto a quelle dei composti iniziali.

La loro attività antiossidante è spesso superiore a quella mostrata dalle vitamine C ed E, essi inoltre giocano un ruolo fondamentale nella prevenzione di danni cronici come quelli determinati da malattie cardiovascolari o neurodegenerative, cancro, diabete di tipo 2 ed osteoporosi. Tale attività benefica è attribuibile ai gruppi fenolici presenti nel loro scheletro molecolare, che sono in grado di ridurre le specie ossigeno-reattive ed altri substrati (organici e non) in possesso di elevata reattività (52). Per questo motivo, gli alimenti o le bevande derivanti da piante ad elevato contenuto di tali sostanze, come il vino rosso, il tè verde, il caffè, il melograno e i frutti rossi, le mandorle e

il cioccolato sono considerati prodotti ad attività antiossidante. Essi sono anche responsabili delle proprietà organolettiche delle verdure: gli antociani ad esempio impartiscono i tipici colori rosso, viola o blu di frutti, piante e vino.

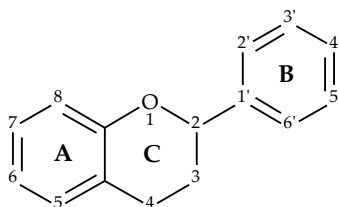
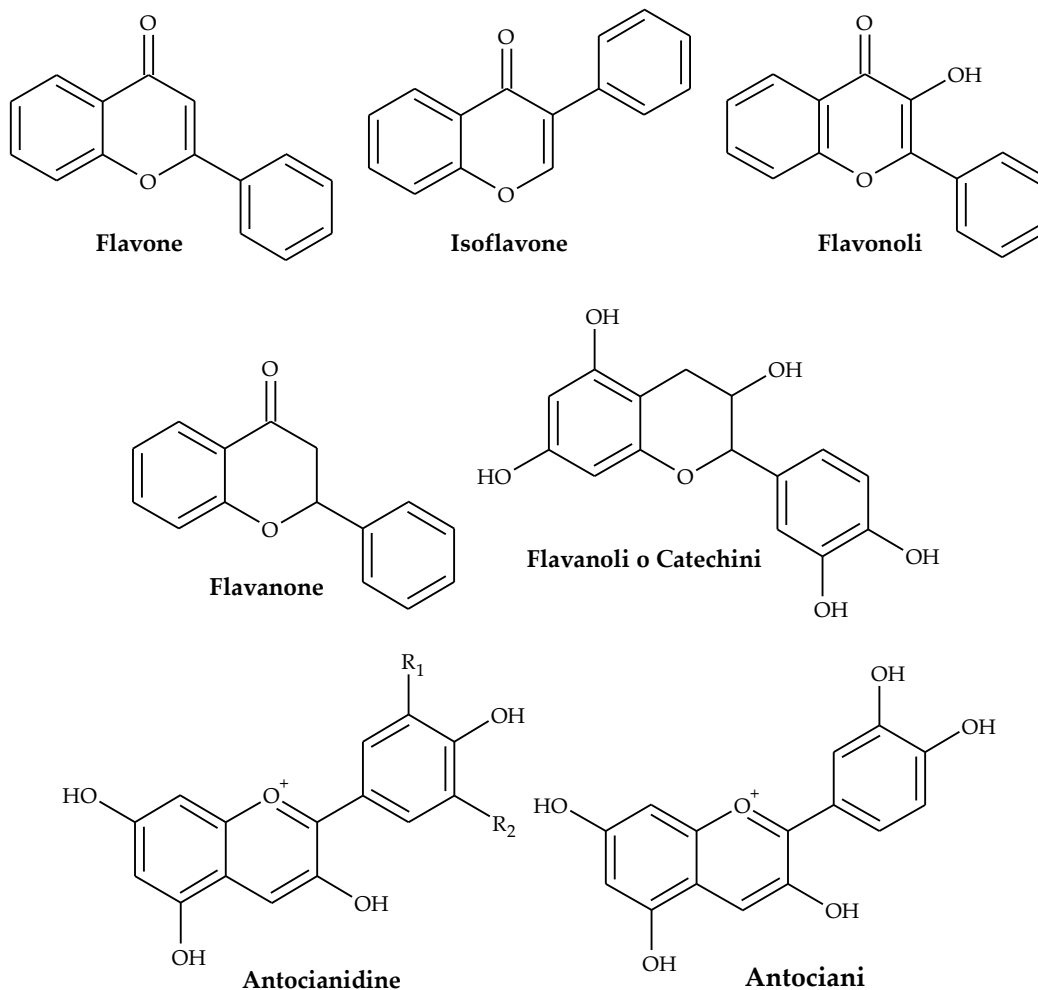


Figura 1.5 Struttura chimica dei flavonoidi.



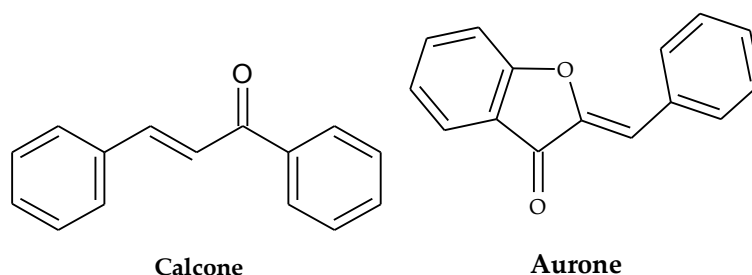


Figura 1.6 Struttura di alcuni dei sistemi flavonoidici presenti in natura.

Isoflavoni, neoflavonoidi, calconi.

Gli *isoflavoni* si differenziano dai flavoni in quanto questi ultimi recano l'anello B in posizione 2 dell'anello C, mentre gli isoflavoni presentano analogo sostituzione in posizione 3. Gli isoflavoni sono rintracciabili nelle leguminose o nei cibi contenenti soia. La genisteina, la daidzeina e il cumestrololo sono i tre isoflavoni maggiormente presenti nella soia, spesso con *glycitein*, biochanina A e formononetina (53) (54) (55) mentre tra le coltivazioni erbacee il trifoglio rosso è quella che ne presenta il maggior contenuto (56).

Spesso gli isoflavoni si ritrovano nella forma di 7-O-glucosidi e 6''-O-malonil-O-glucoside (53). In base alle ulteriori modificazioni della struttura chimica si identificano dieci sottogruppi principali di isoflavoni (Isoflavone, Isoflavanone, Isoflavanolo, Pterocarpano, Rotenoide, Isoflavan-3-ene, Cumestano, Isoflavano, Cumarancromone, Cumarancromene).

I *neoflavonoidi* che presentano l'anello B legato all'anello C mediante l'atomo di carbonio in posizione 4, sono rari negli alimenti di origine vegetale, tra essi la dalbergina è comunque il neoflavone più abbondante (53) (57).

Alcuni *calconi* sono invece presenti in succhi di frutta (succo di mela), oppure nel luppolo e – da questo - nelle birre.

Flavoni, flavanoni, flavonoli e flavanoli.

I *flavoni* sono presenti in tutte le parti della pianta, la maggior parte di essi viene sintetizzato a partire da due flavanoni (naringenina e pinocembrina). La struttura chimica dei flavoni è caratterizzata dalla presenza di un sistema carbonilico α - β insaturo nelle posizioni 2, 3 e 4 dell'anello C; spesso essi si presentano in forma glicosilata.

Possiedono proprietà antiossidanti e pertanto possono essere utili nella prevenzione dell'insorgenza di episodi neoplastici, ma anche come antiinfiammatori, antidiabetici ed antimicrobici.

I *flavanoni* possono essere presenti in natura anche sotto forma di O- oppure C-glicosidi, e sono abbondantemente presenti in frutti quali prugne ed agrumi. La naringenina è un flavanone presente soprattutto in pompelmi e arance.

Rispetto ai flavoni, i *flavonoli* si caratterizzano da un punto di vista strutturale per la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3 sull'anello C. Tale ossidrile spesso si può trovare anche in forma glicosilata. Sono ubiquitari nei cibi di origine vegetale, e – tra essi – annoveriamo principalmente la miricetina e la quercetina. Quest'ultima è presente in frutta e verdura, e può essere rintracciata soprattutto nelle foglie e in altre parti delle piante sotto forma di aglicoside o glicoside, in cui uno (o più) gruppi saccaridici sono legati all'anello fenolico mediante un legame glicosidico. L'attività biologica di tale molecola è stata attribuita alla sua capacità di neutralizzare *in vivo* radicali liberi (51) (50).

Flavanoli e proantocianidine.

I *flavanoli*, generalmente chiamati catechini, hanno una struttura differente rispetto ai comuni flavonoidi, a causa dell'assenza del doppio legame tra il carbonio in posizione 2 e quello in posizione 3, e del gruppo carbonilico sul carbonio 4 dell'anello C. Essi esibiscono diversi gradi di idrossilazione negli

anelli A e B, mentre la posizione 3 sull'anello C è generalmente occupata da un gruppo -OH oppure da un gruppo estereo legato ad una molecola di acido gallico. Questa caratteristica, assieme alla eventuale idrossilazione del C3, porta i flavanoli ad avere due centri chirali sulla molecola, il che rende possibile la formazione di quattro diastereoisomeri (53). Il catechino è l'isomero con configurazione *trans* mentre l'epicatechino presenta la configurazione *cis*. Ciascuna di queste due configurazioni porta a due stereoisomeri (+)-catechino e (-)-catechino, spesso reperibili nei cibi derivati dalle piante (53). In generale i flavanoli possono subire facilmente diverse reazioni di degradazione, che spesso vengono accelerate dal calore, da sostanze presenti nei cibi, da pH estremi elevati e dalla presenza di ossigeno disciolto o altre specie ossigeno-reattive. L'autossidazione di questi composti avviene attraverso la formazione di un radicale a struttura semichinonica, fortemente stabilizzato per risonanza. I flavanoli si possono ritrovare negli alimenti sotto forma di monomeri, oligomeri o polimeri. Le specie monomeriche le ritroviamo nelle foglie del tè e nei semi di cacao (58) (59). I flavanoli in forma oligomerica (da 2 a 7 unità monomeriche) sono considerati forti antiossidanti (53).

Il catechino e l'epicatechino possono polimerizzare portando a *proantocianidine* in quanto la rottura della catena polimerica, catalizzata dagli acidi, porta alla formazione di antocianidine (53).

Le *proantocianidine* vengono tradizionalmente considerate tannini condensati; si tratta di dimeri, oligomeri e polimeri dei catechini legati assieme attraverso un legame tra il carbonio in posizione 4 e quello in posizione 8 o 6. Le *proantocianidine* in base al legame interflavanico possono essere identificate come *proantocianidine* di tipo A, in cui i monomeri sono legati attraverso un legame etero C2-O-C7 o C2-O-C5, oppure di tipo B, in cui sono comuni i legami C4-C6 o C4-C8 (53).

Antocianidine ed antociani.

Le *antocianidine* costituiscono gli agliconi degli antociani e sono i principali componenti dei pigmenti rossi, blu e viola della maggior parte dei petali di fiori, della frutta e della verdura, e di alcune varietà speciali di cereali come, ad esempio, il riso nero.

Nelle piante esistono principalmente in forme glucosidiche che vengono comunemente denominate antociani.

Gli *antociani* sono invece responsabili della colorazione dei pigmenti di frutta e fiori. Sono uniti ad una o più unità glicosidiche attraverso un legame in posizione 2 o 3, e in posizione 3 nel caso di agliconi. Quando sono presenti zuccheri aggiuntivi nelle molecole degli antociani, essi si trovano posti in posizione 5 e 7 e - meno frequentemente - in posizione 3' o 5'. Cianidina, delphinidina e pelargonidina sono gli antociani più ampiamente trovati, assieme ad altre due dozzine di antocianine monomeriche (per un totale di 31 antociani). Infatti, il 90% di antocianine sono basati su cianidina, delphinidina e pelargonidina e loro derivati metilati (60).

Il colore degli antociani è pH-dipendente: rosso in ambiente acido e blu in condizioni basiche.

Infine i tannini, che sono molecole generalmente non glicosilate. Essi devono il loro nome alla capacità di far precipitare le proteine. Si distinguono in: tannini idrolizzabili, formalmente riconducibili a glucosidi dell'acido gallico o dell'acido ellagico, di utilizzo in cosmesi, e tannini condensati, derivanti dai flavonoidi.

Acidi fenolici.

Gli *acidi fenolici* sono dei composti polifenolici, non-flavonoidi, che possono essere divisi, in base alla loro struttura, in due categorie: derivati dell'acido

benzoico oppure derivati dell'acido cinnamico. In molti frutti e in molti ortaggi gli acidi cinnamici sono presenti sotto forma di derivati esterei, che esplicano un elevato potenziale antiossidante. Frutta e verdura contengono un'elevata concentrazione di acidi fenolici liberi, mentre nel grano e nei cereali questi composti si ritrovano in forma legata. I più comuni acidi idrossibenzoici che è possibile trovare nei vegetali sono gli acidi gallico, *p*-idrossibenzoico, vanillico e siringico, mentre i più importanti acidi cinnamici sono il caffeico, il ferulico ed il *p*-cumarico. Essi possono essere degradati o idrolizzati attraverso idrolisi acida o mediante azione enzimatica (53).

Negli ultimi decenni sono stati proposti diversi metodi analitici per la determinazione degli antiossidanti. Queste tecniche sono indirizzate sia alla valutazione complessiva del contenuto totale di polifenoli, o anche alla valutazione di una proprietà cumulativa ad essi ascrivibile (es: l'attività antiossidante) oppure volte all'identificazione ed alla quantificazione di singoli composti. Va da sé che ognuna di queste procedure necessita di specifici processi di estrazione degli analiti dalla matrice che si intende analizzare. Questo comporta l'uso di tecniche facenti impiego di solventi organici o fluidi supercritici, e procedure di sonicazione a microonde, campi elettrici pulsati, ultrasuoni.

I metodi tradizionalmente adottati per la determinazione in matrici di origine alimentare dell'attività antiossidante in relazione al contenuto totale di polifenoli sono quelli colorimetrici (che impiegano il reattivo di Foulin-Ciocalteau), elettrochimici ed infine biosensoristici. Mentre la determinazione quali-quantitativa di specifici analiti può essere effettuata sfruttando i classici metodi cromatografici (TLC, HPLC, GC), eventualmente interfacciati con spettrometri di massa (es: HPLC-MS) o spettrofotometri UV-Vis, oppure mediante elettroforesi capillare o spettrometria NMR (53).

La TLC utilizza differenti fasi stazionarie (silice, cellulosa, poliammide) per la determinazione qualitativa di acidi fenolici e flavonoidi in estratti di origine vegetale. I limiti dovuti all'impiego di questa tecnica, come la scarsa capacità di poter ottenere responsi quantitativi attendibili, la rende adatta solo per fini di riconoscimento qualitativo. Il primo metodo cromatografico per la determinazione dei flavonoidi è stato messo a punto nel 1976 da Fisher e Wheaton (61). Finora la tecnica analitica più usata per la separazione e la caratterizzazione dei composti fenolici è la High Performance Liquid Chromatography (HPLC) a fase inversa (RP) che utilizza, solitamente, una colonna C18 accoppiata a diversi sistemi di rilevamento e a sistemi di eluizione. Questi ultimi sono generalmente binari, e prevedono l'impiego di un solvente polare acquoso acido (es. acido acetico, acido perclorico, acido fosforico o acido formico), indicato come solvente A, ed un solvente organico meno polare (metanolo o acetonitrile) chiamato solvente B (62). I sistemi di rilevamento possono essere di tipo MS (spettrometro di massa) oppure di tipo UV. Il primo detector permette di analizzare matrici complesse attraverso la combinazione dell'efficiente capacità di separazione della cromatografia con l'elevata capacità di caratterizzazione strutturale tipica della spettroscopia di massa. Le molecole e gli ioni frammentati vengono separati in accordo al loro rapporto m/z nell'analizzatore e quantificati da un opportuno detector (50) (51).

Alcuni studi hanno impiegato la tecnica GC per l'analisi diretta dei polifenoli nei cibi. Questi composti spesso non hanno tuttavia i requisiti di volatilità e di termostabilità tali da poter permettere loro di essere direttamente determinabili per tale via. Il problema può essere agevolmente superato introducendo uno step di derivatizzazione chimica a dare specie stabili e volatili prima dell'introduzione cromatografica. In tal modo si migliora la separazione, la selettività, la sensibilità e l'esattezza della determinazione GC. Lo step di

derivattizzazione può essere eseguito nella soluzione campione prima dell'estrazione, oppure – ma meno spesso - una volta che l'analita viene estratto nella camera di iniezione del GC.

Come introdotto precedentemente, i prodotti d'alveare, soprattutto miele e gelatina reale, presentano un notevole contenuto di polifenoli. Oltre al fatto di rendere il miele un ottimo alimento con notevoli proprietà antiossidanti, la presenza di questi composti è utile nella loro classificazione botanica e geografica (63). La determinazione analitica in questa matrice viene generalmente effettuata secondo i metodi cromatografici precedentemente descritti. L'eluizione a gradiente è quella solitamente impiegata per il riconoscimento del complesso profilo fenolico utilizzando, come miscela eluente, anche stavolta un solvente acquoso in combinazione con un altro dotato di minore polarità.

La procedura analitica maggiormente impiegata per la determinazione dei singoli composti fenolici richiede in genere un preliminare step di estrazione dalla matrice del campione ed una fase di clean-up che precede l'introduzione cromatografica.

Nel caso del miele i campioni vengono prima omogenizzati, quindi l'analita viene estratto o per trattamento con opportuni solventi oppure mediante estrazione in fase solida, esso viene quindi sottoposto a clean-up, concentrato e analizzato. La rivelazione avviene generalmente per via spettrofotometrica UV-Vis, oppure per fluorescenza, approccio più sensibile rispetto alla prima tecnica (63).

L'analisi del contenuto di polifenoli è una strada promettente nel concorrere alla definizione dell'origini floreale e geografica di questo prodotto.

Nei casi più fortunati la presenza di un determinato composto fenolico nel miele è riconosciuto come marker di origine botanica del medesimo. Ad

esempio, ciò è vero per l'acido omogentisico nel miele di corbezzolo (64) (65) del siringato di metile nel miele di asfodelo (66), della miricetina, della 3-metossimiricetina, della 3'-metossimiricetina e della tricetina, tutti candidati marker d'identità botanica del miele d'erica (67). In altri casi, l'analisi del profilo dei composti polifenolici concorre all'attribuzione dell'origine geografica di un miele uniflorale. Ad esempio, è stata osservata una maggiore concentrazione di esperetina nei mieli di arancia, di kaempferolo nei mieli di rosmarino, la quercetina pare sia abbondantemente presente nel miele di girasole, mentre i mieli di castagno mostrano un elevato contenuto di acidi idrossicinammici (caffaico, p-cumarico e ferulico) (63).

Le tecniche cromatografiche rappresentano quindi un approccio versatile e potente per la determinazione quali-quantitativa della componente polifenolica. Tuttavia queste tecniche richiedono in genere lunghi tempi di analisi e, laddove si sia interessati o ad un singolo analita, o ad una stima della concentrazione dell'intera categoria (o di un parametro ad essa biunivocamente associata), l'adozione di biosensori al fine di sfruttare la specificità di risposta tipica della componente biologica potrebbe rappresentare un'ottima alternativa.

In letteratura sono infatti numerosi i biosensori atti a valutare, in diverse matrici alimentari, sia l'attività antiossidante che il contenuto totale in polifenoli. In generale la maggior parte dei biosensori sono di tipo amperometrico, utilizzano gli enzimi Tirosinasi (Tyr) e Laccasi (Lac) e sono dotati di elevata sensibilità e selettività.

La tirosinasi è un enzima binucleare contenente metallo proteina a base di Cu che, in presenza di ossigeno molecolare, catalizza la reazione di idrossilazione ed ossidazione di monofenoli a *o*-chinoni e l'ossidazione degli *o*-difenoli a chinoni. Questo enzima, generalmente estratto dai funghi, ha un punto

isoelettrico pari a 4,5 ed assume carica negativa a pH superiori a 4,5 in soluzioni acquose.

Campanella et al. (68) descrivono un biosensore per la determinazione di polifenoli totali in campioni di vino, ottenuto accoppiando l'enzima tirosinasi, preliminarmente immobilizzato in un gel polisaccaridico, ad un trasduttore amperometrico per l'O₂. La soluzione interna all'elettrodo era costituita da KCl 0,1 M in tampone fosfato a pH 6,6. La calibrazione è stata effettuata con soluzioni di polifenoli, che vengono ossidati ad un potenziale pari a -0,65 V vs Ag/AgCl secondo il seguente schema di reazione:



La variazione del segnale dovuto all'O₂ consumato risulta esser proporzionale alla concentrazione del polifenolo nel campione.

Numerosi sono i lavori in cui la Tyr viene immobilizzata in film di polipirrolo (PPy) o polianilina, questi vengono realizzati a partire da soluzioni acquose di monomero a pH compatibile con la conservazione dell'attività biologica dell'enzima; nel caso dei polimeri tiofenici il discorso è limitato al solo PEDOT in quanto in genere i monomeri tiofenici non sono solubili in mezzo acquoso.

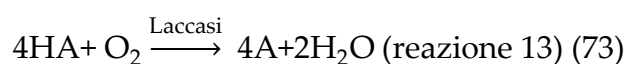
In riferimento al polipirrolo, sono stati costruiti diversi dispositivi per l'analisi di acque in cui la tirosinasi viene immobilizzata per intrappolamento nel film polimerico (69), oppure mediante cross-linking con glutaraldeide (70); in entrambi i casi i biosensori vengono calibrati con soluzioni di catecolo o fenolo, operando a pH 7,0 in tampone fosfato e polarizzando l'elettrodo lavorante a potenziale pari a E=-0,50 V (vs Ag/AgCl).

In un altro contributo (71) il film di polipirrolo ottenuto per polimerizzazione del monomero recante in posizione 2 un sostituente carbossilico, depositato su

microbilancia al cristallo di quarzo oppure su microelettrodi d'oro, è stato modificato con l'enzima tirosinasi mediante attivazione dei gruppi carbossilici presenti nel backbone polimerico, utilizzando una soluzione di carbodimide e pentafluorofenolo. La calibrazione, effettuata ossidando a potenziale pari a +0,10 V vs Ag/AgCl ha portato a buoni risultati usando soluzioni di catecolo.

Nel caso dei polimeri tiofenici spesso si sfrutta la formazione della carica negativa della tirosinasi a pH maggiori di 4,5 per effettuare l'immobilizzazione, ottenuta tramite interazioni di tipo elettrostatico con il PEDOT carico positivamente. L'analita viene determinato mediante riduzione a -0,20 V (vs SCE) dell'*o*-chinone prodotto enzimaticamente (72).

La laccasi invece è un enzima appartenente alla categoria delle ossidoriduttasi, e contiene ioni rameici all'interno della sua struttura. Può essere estratta da diverse piante o funghi, ed è in grado di catalizzare reazioni di ossidazione di diversi substrati - come i fenoli e le aniline - con contemporanea riduzione dell'O₂ ad acqua in accordo alla reazione seguente:



ove HA ed A sono rispettivamente la forma ridotta ed ossidata del substrato.

L'enzima laccasi viene utilizzato per diversi scopi nell'industria alimentare: come additivo nei processi di produzione di cibi e bevande (come ad esempio la stabilizzazione dei vini e della birra, o nelle fasi di chiarificazione dei succhi di frutta), nei processi di bioremediation delle acque di scarico delle industrie alimentari, oppure per la determinazione di analiti come i polifenoli.

In quest'ultimo settore sono stati sviluppati diversi biosensori amperometrici per la determinazione di detti analiti in varie bevande (vino, birra e tè). A tal proposito, nel 1992 Ghindilis et al. (74), notarono una validità pratica

nell'impiego dei biosensori costruiti impiegando la laccasi immobilizzata, piuttosto che l'enzima libero, per la determinazione dei tannini in tè di differenti origini. Montereali et al. (75) riporta la determinazione dei polifenoli in mosti e vini attraverso un dispositivo costruito accoppiando tirosinasi e laccasi, entrambi immobilizzati su elettrodi di grafite preventivamente modificati con ferrocene. I biosensori mostrano una buona risposta, anche in relazione ai risultati ottenibili sulla base del raffronto con consolidate tecniche spettrofotometriche, sebbene la presenza di SO₂ nelle matrici possa comportare inibizione dell'attività enzimatica.

Di Fusco et al. (73) hanno riportato lo sviluppo di due biosensori amperometrici, rispettivamente basati sulle laccasi *Trametes Versicolor* e *Trametes Hirsuta*, ottenuti immobilizzando gli enzimi su nanotubi di carbonio ed utilizzando come prepolimero poliazetidina (PAP), ed impiegati per la determinazione del contenuto di polifenoli nei vini. Essi hanno osservato che le prestazioni del biosensore dipendono fortemente dalla natura dell'enzima: nel caso dei biosensori preparati con la laccasi *T. Hirsuta* i risultati sono molto simili a quelli ottenuti con il metodo spettrofotometrico di Folin-Ciocalteu mentre l'altro dispositivo preparato con *T. Versicolor* porta all'ottenimento di risultati discordanti. Praseryo et al. (76) studiarono invece il comportamento del tetrametossiazobismetilenchinone (TMAMQ) nel misurare l'attività antiossidante di diverse molecole, presenti nei cibi e nell'organismo umano. Il TMAMQ viene generato per ossidazione della siringaldazina ad opera della laccasi, e viene comunemente utilizzato per determinare l'attività antiossidante di vari alimenti. Ibarra-Escutia et al. (77) svilupparono un biosensore amperometrico per valutare il contenuto di polifenoli in infusioni di tè, ottenuto immobilizzando con polivinilalcol la laccasi *T. Versicolor* su elettrodi di grafite. Il biosensore, calibrato con *o*-, *m*-, *p*- diidrossibenzene ed acido caffeico, mostra

un'eccellente stabilità e buone prestazioni in termini di risposta nel tempo, sensibilità e semplicità di analisi in quanto i campioni non necessitano di pretrattamento.

Il gruppo di ricerca di Portaccio (78) ha pubblicato un lavoro in cui si confrontava il comportamento di tre biosensori per la determinazione del contenuto di polifenoli in campioni di vino. Nei tre dispositivi l'enzima veniva immobilizzato adottando diverse tecniche di fissaggio. Un primo biosensore è stato costruito immobilizzando la laccasi attraverso cross-linking ottenuta per semplice immersione di un elettrodo di grafite in una soluzione di glutaraldeide, GA. Negli altri due biosensori la laccasi è stata immobilizzata attraverso formazione di legami covalenti con i gruppi carbossilici presenti sugli elettrodi di grafite modificati con gruppi $-COOH$; in un caso è stato effettuato un trattamento elettrochimico applicando un potenziale di +3,0 V (vs Ag/AgCl) per 2 ore in una soluzione di tampone fosfato 0,1 M (pH 7,2 e $T=25^{\circ}C$), mentre nel secondo caso l'elettrodo di grafite è stato modificato per trattamento con una soluzione acquosa di HNO_3 al 20% per 24 ore. Dopodiché i sensori sono stati ulteriormente modificati per immersione prima in una soluzione di tampone acetato (pH 4,5 e $T= 60^{\circ}C$) contenente carbodiimmide (attivante dei gruppi $-COOH$), quindi in una soluzione di esametildiammina (HMDA) 5% per 1 minuto e infine in una soluzione di GA al 10% per 30 minuti. Tutti e tre gli elettrodi sono stati calibrati con catecolo a -0,10 V vs Ag/AgCl. Il biosensore che mostra la migliore sensibilità è quello in cui la Laccasi è stata immobilizzata attraverso legami covalenti.

Infine lo sfruttamento dei nanomateriali e nanostrutture contenenti ossidi metallici, che promuovono il veloce trasferimento degli elettroni tra l'elettrodo e il sito attivo dell'enzima, hanno spinto i ricercatori all'impiego di tali matrici

nella costruzione di biosensori di ultima generazione. Tra i vari ossidi metallici, le nanoparticelle contenenti ossido di zinco (ZnONPs) sono state sfruttate grazie alle loro inusuali proprietà quali l'elevata area superficiale, la buona biocompatibilità, la buona stabilità chimica e la sostanziale atossicità. In un recente lavoro di Chawla et al. (79) è stato preparato un composito di ZnONPs e di nanoparticelle d'argento (AgNPs) depositato su un elettrodo d'oro, che è stato dapprima attivato con glutaraldeide e poi modificato con la soluzione enzimatica attraverso la formazione di legami covalenti. Le misure elettrochimiche sono state effettuate a +0,22 V (vs Ag/AgCl) in tampone acetato 0,1 M pH 6,0 e 35°C utilizzando la coppia $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ come mediatore redox.

L'uso del film composito AgNPS/ZnONPs nella costruzione di un biosensore attivo per la determinazione dei polifenoli totali ha portato a buone prestazioni analitiche quali un basso potenziale di lavoro (+0,22 V vs Ag/AgCl), un breve tempo di risposta (8 s), una buona sensibilità ed un'eccellente stabilità (5 mesi).

1. **Clark L. Jr. e Lyons C.** Amn. NY Acad. Sci. 1962, Vol. 102, pp. 29-45.
2. **Updike S. e Hicks G.** Nature. 1967, Vol. 214, pp. 986-988.
3. **Guilbault G. G. e Montalvo J. G. Jr.** J. Am. Chem. Soc. 1969, Vol. 91, pp. 2164-2165.
4. **Guilbault G. e Lubrano G.** Anal. Chim. Acta. 1973, Vol. 64, pp. 439-455.
5. **Campanella L. et al.** Applicazioni dei sensori e biosensori elettrochimici. Alghero : s.n., 1998. Seminari di Elettroanalisi, Sez. Chim. Anal. - Gruppo di Elettroanalisi. pp. 219-224.
6. **Mc Grath T. F. et al.** Anal. Bioanal. Chem. 2012, Vol. 403, pp. 75-92.
7. **Stephen White** Biosensors for food analysis. Handbook of Food Analysis 2nd Edition Methods and Instruments in Applied Food Analysis. s.l. : Nollet L. M. L., pp. 2133-2148.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

8. **Taitt C. R. et al.** Sensors. 2008, Vol. 8, pp. 8361-8377.
9. **Maines A. et al.** Anal. Commun. 1996, Vol. 33, pp. 27.
10. **Appleton B. et al.** Sens. Actuators. 1997, Vol. 43, pp. 65-69.
11. **Singh M. et al.** Sensors and Actuators B. 2009, Vol. 143, pp. 430-443.
12. **Foulds N. C. et al.** Anal. Chem. 1988, Vol. 60, pp. 2473-2478.
13. **Liu C. et al.** European Polymer Journal. 2007, Vol. 43, pp. 3264-3276.
14. **Tkac J. et al.** Analyst. 2000 a, Vol. 125, pp. 1285-1289.
15. **Matsumoto K. et al.** Anal. Chem. 1981, Vol. 53, pp. 1974-1979.
16. **Guilbault G. G. et al.** Analytica Chimica Acta. 2001, Vol. 431, pp. 239-247.
17. **Kitagawa Y. et al.** Analyst. 1987, Vol. 112, pp. 1747-1749
18. **Shkotova L. V. et al.** Mater. Sci. Eng. C. 2006, Vol. 26, pp. 411-414.
19. **Niculescu M. et al.** Food Chem. 2003 a, Vol. 82, pp. 481.
20. **Nakatani H. S. et al.** American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2005, Vol. 1, pp. 85-89.
21. **Bogdanov S. et al.** American Journal of the College of Nutrition. 2008, Vol. 27, pp. 677-689.
22. **Molan P. C. et al.** Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy. 1997, pp. 27-37.
23. **Molan P.C.** Bee World. 1992, Vol. 73, pp. 5-28.
24. **Molan P.C.** Bee World. 1992, Vol. 73, pp. 59-76.
25. **Bogdanov S.** Lebensm.-Wiss -Technol. 1997, Vol. 30, pp. 748-753.
26. **Wang X.H. et al.** J. Agric. Food Chem. 2002, Vol. 50, pp. 6923-6928.
27. **Heitkamp K. et al.** Schriften zur Oecotrophologie. 1984, pp. 1-60.
28. **Spano N. et al.** Talanta. 2009, Vol. 78, pp. 310-314.
29. **Kowalski S. et al.** Pol. J. Food Nutr. Sci. 2013, Vol. 63, pp. 207-225.
30. **Kroh L. W.** Food Chemistry,. 1994, Vol. 51, pp. 373-379.
31. **Ames J.M.** The Maillard reaction, In B.J.F. Hudson (Ed.). Biochemistry of food proteins. London: Elsevier. 1992, pp. 99-153.

32. **Farre R.** Tesi di Laurea. 2012.
33. **Capuano E. et al.** Food science and technology. 2011, Vol. 44, pp. 793-810.
34. **Perez-Locas C. et al.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2008, Vol. 56, pp. 6717-6723.
35. **Murkovic M. et al.** Molecular Nutrition and Food Research. 2006, Vol. 50, pp. 842-846.
36. **Zappalà M. et al.** Food Control. 2005, Vol. 16, pp. 273- 277.
37. **Khalil M.I. et al.** Food and Chemical Toxicology. 2010, Vol. 48, pp. 2388-2392.
38. **Fallico B. et al.** Food Chemistry. 2004,, Vol. 85, pp. 305-313.
39. **Ajlouni S. et al.** Food Chemistry. 2010, Vol. 119, pp. 1000-1005.
40. **Spano N. et al.** Talanta. 2006, Vol. 68, pp. 1390-1395.
41. **Ciulu M. et al.** Anal. Methods.2013, Vol. 5, pp. 5010-5013.
42. **Lomillo M. A. et al.** Electroanal. 2006, Vol. 18, pp. 2435-2440.
43. **Schultheissa J. et al.** Journal of Chromatography A. 2000, Vol. 880, pp. 233-242.
44. **Croteau R.** Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. s.l. : Buchanan B., Gruissmen W., Jones R., 2000, pp. 1250-1318.
45. **Crozier A. et al.** Natural Product Reports. 2009, Vol. 26, pp. 1001-1043.
46. **Ahmed I. A. et al.** Food Chemistry. 2015, Vol. 172, pp. 778-787.
47. **Pradeep P. M. et al.** Food Chemistry. 2015, pp. 455-463.
48. **Zhang B. et al.** Food Chemistry. 2015a, Vol. 172, pp. 862-872.
49. **Zhang C. et al.** Postharvest Biology and Technology. 2015b, Vol. 101, pp. 73-81.
50. **Vinas P. et al.** Gas-Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods. Polyphenols in Plants. s.l. : Watson R. R., 2014, pp. 103-157.
51. **Oroian M. et al.** Food Research International. 2015, Vol. 74, pp. 10-36.
52. **Perez Jimenez J. et al.** J. Agric. Food. Chem. 2010, Vol. 58, pp. 4959-4969.
53. **Tsao R.** Nutrients. 2010, Vol. 2, pp. 1231-1246.
54. **Wang H. et al.** J. Agric. Food Chem. 1994, Vol. 42, pp. 1666-1673.
55. **Mazur W.M. et al.** J. Nutr. Biochem. . 1998, Vol. 9, pp. 193-200.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

56. **Tsao R. et al.** J. Agric. Food Chem. . 2006, Vol. 54, pp. 5797-5805.
57. **Garazd M.M. et al.** Chem. Nat. Comp. 2003, Vol. 39, pp. 54-121.
58. **Si W. et al.** J. Chromatogr. A. 2006, Vol. 1125, pp. 204-210.
59. **Prior R.L. et al.** J. Agric. Food Chem. 2001, Vol. 49, pp. 1270-1276.
60. **Anderson O.M. et al.** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2006, pp. 472-551.
61. **Hasegawa S. et al.** Citrus. Modern Methods of Plant Analysis. 1996, Vol. 18, pp. 59-80.
62. **Merken H.M. et al.** J. Agric. Food Chem. 2000, Vol. 48, pp. 577-599.
63. **Pyrzynska K. et al.** Trends in Analytical Chemistry. 2009, Vol. 28, pp. 893-902.
64. **Cabras et al.** J. Agric. Food Chem. 1999, Vol. 47, pp. 4064-4067.
65. **Spano N. et al.** J. Chrom. A. 2005, Vol. 1090, pp. 76-80.
66. **Tuberoso et al.** J. Agric. Food Chem. 2009, Vol. 57, pp. 3895-3900.
67. **Ferreres F. et al.** Apidologie. 1994, Vol. 25, pp. 21-30.
68. **Campanella L. et al.** Talanta. 1994, Vol. 41, pp. 1015-1023.
69. **Stanca S. et al.** Bioelectrochem. 2004, Vol. 64, pp. 47-52.
70. **Apetrei C. et al.** Electrochem. Acta. 2011, Vol. 56, pp. 8919-8925.
71. **Foschini M. et al.** Electroanalysis. 2013, Vol. 25, pp. 741-749.
72. **Vedrine C. et al.** Talanta. 2003, Vol. 59, pp. 535-544.
73. **Di Fusco M. et al.** Talanta. 2010, Vol. 81, pp. 235-240.
74. **Ghindilis A. L. et al.** Biosensors and Bioelectronics. 1992, Vol. 7, pp. 127-131.
75. **Monteali M. R. et al.** J. of Molecular Catalysis B. 2010, Vol. 64, pp. 189-194.
76. **Prasetyo E. N. et al.** Food Chem. 2010, Vol. 118, pp. 437-444.
77. **Ibarra-Escutia P. et al.** Talanta. Vol. 81, pp. 1636-1642.
78. **Portaccio M. et al.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2006, Vol. 41, pp. 97-102.
79. **Chawla S. et al.** Anal. Biochem. 2012, Vol. 430, pp. 16-23.

1.2 Classificazione dei biosensori.

1.2.1 Introduzione.

Come già detto precedentemente, i biosensori possono essere classificati in diversi modi: in funzione della natura della componente biologica, in relazione al tipo di trasduttore, oppure ancora in base al meccanismo di trasporto degli elettroni dalla molecola biologica fino all'elettrodo.

In riferimento all'elemento di riconoscimento biologico si classificherà in termini di *biosensori biocatalitici* e *biosensori di affinità* (1).

Nel primo caso, la componente biologica è un enzima che catalizza una reazione chimica, generalmente di tipo redox, che coinvolge la molecola target: ad esempio, il dispositivo può misurare la catalisi o l'inibizione enzimatica dovuta alla presenza della suddetta specie chimica. Il biocatalizzatore può quindi metabolizzare l'analita e trasformarlo in un prodotto diverso da quello di partenza, che genera un segnale proporzionale alla sua concentrazione e all'efficienza enzimatica; oppure l'attività enzimatica può essere inibita dalla molecola target e in questo caso la sua concentrazione può essere associata alla riduzione della quantità di prodotto che si formerebbe in assenza di tale specie (2).

Nel caso dei biosensori ad affinità, il mediatore lega in maniera specifica l'analita formando un addotto che viene rilevato dal trasduttore.

In tale contesto, gli anticorpi sono gli elementi di riconoscimento maggiormente impiegati; possono essere policlonali, ovvero una miscela di anticorpi ottenuti dall'immunizzazione con un antigene, oppure monoclonali se vengono prodotti da cloni di una plasmacellula. I primi possono legarsi all'antigene in luoghi diversi o con diverse affinità vincolanti, mentre i secondi si legano alla stessa

regione bersaglio, detto epitopo, con affinità equivalente, e sono più selettivi degli anticorpi policlonali.

Gli immunosensori sono stati utilizzati per la quantificazione delle proteine e delle tossine biologiche, ma anche come biomarcatori in una vasta gamma di aree di ricerca come la sicurezza alimentare, la chimica farmaceutica, il monitoraggio ambientale ed infine la medicina clinica (91).

Elementi di riconoscimento quali acidi nucleici (DNA e RNA) risultano essere chimicamente più stabili degli anticorpi. In genetica sensoriale, il filamento di DNA o RNA target viene riconosciuto attraverso l'ibridazione del filamento di DNA o di RNA di riconoscimento (DNA o sonda RNA) grazie all'elevata affinità naturale esistente tra di essi. L'ibridazione si verifica in particolari regioni della sequenza di DNA o RNA bersaglio, e l'evento di bioriconoscimento può portare all'appaiamento delle basi del DNA complementari (cioè l'accoppiamento sonda – bersaglio) (91). Questo tipo di biosensori viene largamente impiegato per monitorare problemi genetici o malattie infettive. Il loro sviluppo è stato seguito con particolare attenzione grazie alle loro potenziali applicazioni in analisi genetica, diagnostica clinica, analisi forense e altre applicazioni mediche (4).

I biosensori che utilizzano gli aptameri come elemento di riconoscimento biologico vengono definiti aptasensori, e risultano essere più stabili e più adatti ad essere impiegati nelle condizioni dei campioni reali grazie alle loro specifiche proprietà. Si tratta di singoli filamenti di RNA e o DNA che legano ad essi specifiche molecole target con elevata specificità ed affinità. Gli aptameri sono stati impiegati in diverse applicazioni, ma il loro uso come elemento di riconoscimento biologico nei biosensori appare promettente per la determinazione rapida e semplice di proteine. Grazie alle loro piccole dimensioni (30-100 nucleotidi) rispetto agli anticorpi e agli enzimi, possono

essere immobilizzati con una maggiore densità, inoltre possono essere sintetizzati con alti valori di riproducibilità e purezza (4).

Nei biosensori che invece utilizzano come componente biologico intere cellule, il segnale analitico viene rilevato misurando lo stato metabolico generale di questi organismi viventi, come ad esempio l'inibizione della crescita, la vitalità della cellula, la respirazione cellulare e la bioluminescenza batterica. Ad esempio, la quantificazione del consumo di ossigeno durante il metabolismo di idrocarburi è uno dei metodi più sensibili per la determinazione di queste sostanze. L'uso di cellule intere ha diversi vantaggi rispetto all'impiego degli enzimi e - tra questi - abbiamo l'elevata stabilità, ridotti requisiti di depurazione, basso costo di preparazione ed efficiente cofattore di rigenerazione (91).

Nei biosensori microbici, i microorganismi vengono immobilizzati sulla superficie del trasduttore per la determinazione di analiti target. Batteri e funghi possono essere impiegati in tali dispositivi per determinare specifiche molecole o per monitorare lo stato generale dell'ambiente circostante. A differenza degli enzimi, essi non richiedono processi di purificazione, e proprio rispetto a questi ultimi hanno dei costi meno elevati e possono essere applicati molto rapidamente. I microorganismi sono stati assemblati con un'ampia varietà di trasduttori (amperometrici, potenziometrici, calorimetrici, conduttimetrici, fluorimetrici etc.). Il loro impiego, come nel caso delle cellule vive, è basato sullo studio del loro metabolismo, in molti casi accompagnato da un consumo di ossigeno o CO₂ che viene monitorato elettrochimicamente. L'integrazione di questi microorganismi sulla superficie del trasduttore è l'unico requisito per ottenere un biosensore microbico. Dispositivi di questo tipo sono stati ad esempio sfruttati per la determinazione delle epinefrine, fissando sulla superficie del trasduttore il fungo (*Phanerochaete Chrysosporium*

ME446), oppure per la determinazione dell'etanolo utilizzando come elemento di riconoscimento cellule di *Candida tropicalis* (4).

Comunemente i biosensori vengono classificati in base alla natura del trasduttore impiegato per riconoscere il segnale generato dall'interazione tra l'elemento di riconoscimento biologico e la sostanza che si intende determinare. Di seguito verranno descritti nel dettaglio i principali tipi di dispositivi utilizzati (91).

1.2.2 Biosensori elettrochimici.

Tra le diverse tipologie di biosensori, quelli elettrochimici sono maggiormente utilizzati grazie sia alla loro elevata sensibilità e ai brevi tempi di risposta, ma anche a causa delle loro caratteristiche fisiche, poiché possono essere facilmente miniaturizzati, e possono inoltre essere impiegati per l'analisi in mezzi torbidi. Anche i costi connessi all'assemblaggio di tali sensori sono molto più bassi rispetto a quelli che caratterizzano altri tipi di dispositivi (5).

I biosensori elettrochimici sono in grado di misurare la corrente prodotta dalle reazioni di ossidazione e riduzione che coinvolgono l'elemento di riconoscimento e la sua molecola target, convertendo in maniera diretta l'evento biologico in un segnale elettrico e rendendoli per questo motivo interessanti per l'analisi del contenuto o della concentrazione di un campione biologico o analitico. Il loro meccanismo di funzionamento è basato sulla determinazione di una proprietà elettrica (resistenza, corrente, potenziale, conduttanza o impedenza) che viene valutata applicando metodologie elettroanalitiche differenti come la potenziometria, la conduttimetria, l'amperometria o la voltammetria (4). A sua volta, la misura elettrochimica è correlata al potenziale chimico di alcune specie (analiti) presenti nella soluzione in esame, misurato rispetto a quello di un elettrodo di riferimento. In altre parole, diverse reazioni

chimiche comportano il consumo (o la produzione) di ioni o elettroni e – conseguentemente - causano delle variazioni delle proprietà elettriche della soluzione in esame. Esse possono quindi essere rilevate ed utilizzate come parametri di misura. La risposta strumentale dipende dall'attività degli analiti (e non dalla loro concentrazione). In relazione alla natura della variazione misurata durante l'evento di bioriconoscimento, i biosensori elettrochimici possono essere catalogati come amperometrici, potenziometrici, voltammetrici, impedimetrici e conduttimetrici (4).

Per la loro semplicità d'impiego essi sono spesso sfruttati nei test di monitoraggio di bioprocessi industriali (ad esempio, per la determinazione di amminoacidi, lieviti, acido lattico, etanolo, etc.), in campo ambientale (per la ricerca di pesticidi, fertilizzanti, sostanze estrogeniche o analiti gassosi quali CO o CO₂), nel settore sanitario (per la misurazione del livello di glucosio, alcool, ormoni, etc.) e infine in campo forense per la rilevazione di sostanze dopanti, patogeni o tossiche (come la cocaina, l'antrace, gli agenti nervini, etc.) (5).

Per l'analisi con questo tipo di biosensori viene impiegata una classica cella elettrochimica, collegata ad un potenziostato o ad un altro opportuno strumento utilizzato in elettroanalisi. Gli stessi elettrodi svolgono un ruolo importante nel garantire le performance della cella elettrochimica e del biosensore stesso.

Biosensori amperometrici.

La determinazione amperometrica riguarda il monitoraggio delle variazioni di corrente prodotte dalle interazioni tra l'analita ed il sistema di bioriconoscimento molecolare, che possono portare a reazioni redox catalizzate dagli enzimi, oppure a reazioni di bioaffinità che avvengono sulla superficie del trasduttore. Sull'elettrodo di lavoro, solitamente di platino, oro, grafite, oppure

ancora film polimerici, viene applicato un potenziale costante rispetto all'elettrodo di riferimento, generalmente un elettrodo ad Ag/AgCl o a calomelano saturo (SCE), e si registra la variazione di corrente in funzione della concentrazione della specie elettroattiva, secondo la seguente equazione matematica:

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot m_0 \cdot c_0$$

Dove

i : corrente limite (A);

n : numero di elettroni;

F : costante di Faraday, 96485 C \cdot mol $^{-1}$;

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

m_0 : coefficiente di trasporto di massa;

c_0 : concentrazione della specie elettroattiva in soluzione, mol \cdot L $^{-1}$;

Il potenziale di lavoro viene scelto in modo tale da rendere possibile un processo faradico a carico dell'analita in esame. L'elemento di riconoscimento biologico si trova immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo secondo diversi meccanismi, che per il momento definiremo semplicemente come chimici o fisici. Nel caso in cui venga impiegato un anticorpo, si produrrà un segnale dovuto alla sua interazione con la molecola target, nel caso in cui invece venisse utilizzato un enzima, esso catalizzerà una reazione redox che porterà alla produzione di una specie elettroattiva (94).

Biosensori potenziometrici.

I biosensori potenziometrici possono essere suddivisi in biosensori che utilizzano transistori ione-selettivi ad effetto di campo (ISEFTs) e biosensori luce-indirizzabili (LAPs).

Il principio di funzionamento di questi dispositivi è la misurazione di una differenza di potenziale, in condizioni di equilibrio elettrochimico, proporzionale all'attività dell'analita (a_1) presente nel campione, secondo quanto previsto dall'equazione di Nernst:

$$E = E_0 \pm \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln a_1$$

dove E_0 è il potenziale standard quando $a_1 = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, R è la costante dei gas, F è la costante di Faraday ed n è il numero totale di cariche dello ione i , mentre il segno dipende dalla carica della specie ionica.

In sostanza, si cercherà di effettuare la misura della differenza di potenziale che vige all'equilibrio elettrochimico (ossia quando non si registra un significativo passaggio di corrente nel sistema) tra un elettrodo indicatore (trasduttore) ed un elettrodo di riferimento, o tra le due superfici di un'opportuna membrana interessata a fenomeni di scambio ionico. Il trasduttore può essere un elettrodo ione-selettivo (ISE), ovvero un sensore elettrochimico basato su film sottili o su una membrana selettiva agli elementi di riconoscimento. I più comuni dispositivi potenziometrici sono pHmetri o millivoltmetri elettronici, opportunamente corredati da sensori ioneselettivi come K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , F^- , I^- , CN^- , o a gas come CO_2 o NH_3 .

La risposta prodotta è proporzionale – a seconda dei casi – al logaritmo dell'attività, della fugacità o della concentrazione della specie attiva, e per tale motivo questa tecnica ha un esteso campo di applicazioni ed è particolarmente sensibile a basse concentrazioni.

Un'importante variante dei sensori ISE è rappresentata dai transistor a effetto di campo sensibile agli ioni (ISFET, *ion-sensitive field-effect transistors*), costituiti da una membrana ione-selettiva applicata direttamente sul *gate* del FET. Essi

possono essere di due tipi: capacitori metallo/ossido e transistor. Il loro principale vantaggio sta nel fatto che abbassano il rumore di fondo (dovuto all'alta impedenza degli ISE), in quanto la distanza della membrana dall'amplificatore tende a zero. L'accoppiamento di questi dispositivi con un componente biologico li trasforma di fatto in biosensori, che vengono definiti transistor a effetto di campo enzimatici (ENFETs) o immunologici (INFETs). Tali sistemi utilizzano un campo elettrico che genera delle regioni in cui è presente un eccesso di carica all'interno di un substrato semiconduttore, in modo tale da migliorarne (o attenuarne) la conduttività elettrica locale.

I biosensori LAPs sono dei dispositivi che generalmente consistono in semiconduttori metallo-isolanti (MIS) oppure semiconduttori elettrolita-isolanti (EIS), questi ultimi sono quelli maggiormente impiegati in tale contesto. Essi basano il loro principio di funzionamento sull'accoppiamento di una fotocorrente transitoria ad uno strato sottile isolante di silicio *n*-doped o *p*-doped in contatto con un elettrolita in cui avviene la reazione immunologica desiderata. Le variazioni di potenziale all'interfaccia di silicio vengono rilevate dalla differenza di distribuzione di carica tra la superficie di isolante e il FET (94) (7).

Biosensori conduttimetrici.

Il funzionamento dei biosensori conduttimetrici è basato sul fatto che quasi tutte le reazioni enzimatiche portano o al consumo o alla produzione di specie cariche e, di conseguenza, determinano modifiche della composizione ionica del campione testato (4). I dispositivi di questo tipo presentano diversi vantaggi: gli elettrodi a film sottile sono, per esempio, adatti alla miniaturizzazione e possono essere prodotti su larga scala utilizzando una tecnologia poco costosa. La loro applicazione non richiede l'impiego di elettrodi di riferimento ed i

trasduttori non sono sensibili alla luce; infine è possibile con essi determinare un ampio spettro di composti di natura diversa sulla base di varie reazioni e meccanismi. La conducibilità di una soluzione ionica è determinata dal moto degli ioni in essa presenti. Quando viene applicata una differenza di potenziale tra gli elettrodi di un'opportuna cella immersa in una soluzione elettrolitica, viene in essa generato un campo elettrico, che induce un movimento ordinato ed opposto delle specie ioniche in base alla loro carica; nello specifico si avrà un flusso di cationi verso il polo negativo, mentre gli anioni tenderanno a spostarsi verso il polo positivo (8). La conducibilità (o conduttanza) di una soluzione elettrolitica (conduttore di II specie) viene definita come il reciproco della resistenza:

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

ove R: resistenza della soluzione;

$$R = \frac{\rho * l}{A} \qquad \rho = \frac{R * A}{l} \qquad \Lambda = \frac{1}{\rho} * \frac{A}{l}$$

Il trasduttore conduttimetrico è un sistema miniaturizzato di due elettrodi in grado di misurare la conduttanza della soluzione elettrolitica all'interno della cella conduttimetrica (8).

Biosensori impedimetrici.

I biosensori impedimetrici sono basati su una tecnica usata comunemente detta *spettroscopia di impedenza elettrochimica*. Il funzionamento di questi dispositivi necessita l'applicazione di un segnale elettrico sinusoidale a basso voltaggio e a diverse frequenze ad una cella elettrochimica, e la corrente risultante viene utilizzata per determinare l'impedenza. Più in dettaglio, l'immobilizzazione di elementi di riconoscimento biologico sulla superficie elettrodica produce delle variazioni della capacità elettrica e della resistenza al trasferimento interfacciale

di elettroni dell'elettrodo, è ciò si traduce in una variazione dell'impedenza (4). Le mutazioni interfacciali dovute ai processi biologici possono essere misurati secondo questa tecnica elettrochimica. Il segnale applicato può coinvolgere un ampio range di frequenze ed ampiezze, ed i risultati possono essere interpretati secondo due strade differenti; l'approccio più rigoroso è quello che riguarda la risoluzione analitica di un set di equazioni differenziali, mentre la seconda strada prevede la valutazione dell'impedenza in termini di circuiti equivalenti. L'impedenza elettrica è definita dall'equazione seguente:

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \text{sen}(2\pi ft)}{I_0 \text{sen}(2\pi ft + \varphi)} \quad (9)$$

dove V_0 e I_0 sono rispettivamente l'ampiezza del segnale di tensione e di corrente, f è la frequenza, t è il tempo, φ è la fase compresa tra le funzioni potenziale-tempo, e corrente-tempo (4).

1.2.3 Biosensori ottici.

I biosensori ottici includono tutti quei dispositivi in cui i cambiamenti indotti da una reazione chimica producono un segnale elettronico proporzionale in ampiezza o frequenza alla concentrazione di uno specifico analita a cui lo strumento risulta essere sensibile. Essi nascono dallo sfruttamento delle proprietà riflesse della luce e l'attività degli elementi di riconoscimento biologico per il rilevamento di specifiche sostanze. I segnali prodotti da questi sistemi sono piuttosto versatili in quanto possono essere impiegati per il rilevamento diretto di specifici analiti o amplificati in combinazione con altre tecniche (94). Infatti, molti dei dispositivi ottici sviluppati basano il proprio meccanismo d'azione sulla risonanza plasmonica di superficie (SPR) oppure sulla tecnologia delle fibre ottiche combinate con le varie tecniche spettroscopiche (assorbanza, fluorescenza, Raman, etc.) (10) (11).

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

In dettaglio, la tecnica SPR è basata su un fenomeno ottico che si manifesta quando un fotone di luce incidente colpisce la superficie di un metallo. Ad un certo angolo di incidenza una porzione dell'energia della radiazione interagisce con gli elettroni dell'interfaccia dielettrica, i quali vengono emessi a causa della loro eccitazione. Il movimento degli elettroni, definito come plasmone, corrisponde ad un'onda che si propaga in direzione parallela alla superficie del metallo stesso (94) (11).

Nei biosensori SPR, le molecole di riconoscimento biologico (anticorpi, oligonucleotidi, aptameri) vengono prima immobilizzate sulla superficie del trasduttore; quando la soluzione contenente le molecole target si ritrova a contatto con la superficie, si instaurano delle interazioni per affinità tra le due componenti, che inducono un cambiamento dell'indice di rifrazione della superficie dell'elettrodo.

Negli esperimenti SPR, la risonanza o le unità di risposta (RU) sono i parametri usati per descrivere la variazione di segnale, dove 1 RU equivale ad uno spostamento dell'angolo critico di 10^{-4} gradi (12) ovvero ad 1 picogrammo (pg)*mm² di massa legata all'area superficiale. Nella fase iniziale dell'esperimento, quindi in assenza d'interazioni tra la componente biologica e la sua molecola target, il valore iniziale RU corrisponde all'angolo critico (5).

La variazione dell'indice di rifrazione generato su una superficie avente uno spessore **h** può essere calcolato come segue:

$$\Delta n_d = (dn/dc)_{vol} \Delta \Gamma / h$$

dove $(dn/dc)_{vol}$ rappresenta l'incremento dell'indice di rifrazione **n** con concentrazione volumetrica dell'analita pari a **c**, mentre $\Delta \Gamma$ indica la concentrazione della molecola bersaglio legata alla superficie (13) (12).

Tipicamente, un biosensore SPR ha un limite di rilevazione dell'ordine di $10 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (12).

Una fibra ottica invece è un cavo, costituito di vetro o materiale polimerico, all'interno del quale le onde luminose si propagano per riflessione interna totale. Un biosensore a fibra ottica impiega una trasduzione elettronica (o ottica) per monitorare una reazione biologica e la trasmette sotto forma di segnale ottico. Nella maggior parte dei casi il sistema di riconoscimento biologico è un anticorpo legato sulla superficie della fibra. I biosensori a fibra ottica possono essere sensibili o alle variazioni di assorbanza, o alle variazioni dell'intensità fluorescente della luce in entrata ed in uscita dal sistema ottico, che può essere correlata, mediante le normali leggi dell'ottica, alla concentrazione dell'analita in esame.

1.2.4 Biosensori piezoelettrici.

I biosensori piezoelettrici sono dei dispositivi sensibili alle variazioni della massa, della viscosità o della densità di campioni che vengono messi in contatto con una superficie piezoelettricamente attiva (14). Il trasduttore piezoelettrico maggiormente impiegato è la microbilancia al cristallo di quarzo (QCM). Grazie alle sue proprietà piezoelettriche, il cristallo può dar luogo a delle oscillazioni, attraverso un semplice circuito elettrico, secondo una frequenza naturale direttamente proporzionale allo spessore del cristallo. Ove una massa venga depositata sulla superficie del cristallo di quarzo (nel caso dei biosensori, parliamo della componente biologica) si registra una riduzione della frequenza di oscillazione (14). In assenza di una specifica molecola target, il cristallo oscillerà ad una determinata frequenza, mentre in presenza dell'analita, la frequenza di oscillazione del cristallo piezoelettrico varierà in funzione del grado d'interazione tra lo specifico analita e la sonda biologica depositata sul

cristallo, o meglio in funzione della variazione della massa dovuta a tale interazione (15). Questo tipo di dispositivo utilizza particolari oligonucleotidi, immobilizzati sulla superficie dei cristalli di quarzo che vengono immersi, durante l'analisi, in una soluzione contenente i potenziali acidi nucleici che fungono da molecola target. In seguito all'interazione complementare tra le due componenti, si osserva un aumento della massa del biosensore piezoelettrico, direttamente proporzionale alla riduzione della frequenza di risonanza del quarzo. I maggiori vantaggi nell'impiego di questi dispositivi risiedono nell'ottenimento di risultati in tempo reale a bassi costi ed in maniera semplice. Gli svantaggi riguardano però la bassa sensibilità ed una limitata specificità, a causa della possibilità d'interferenze sulla superficie del sensore (15) (5).

1.2.5 Biosensori calorimetrici.

Questi ultimi, meno diffusi rispetto ai precedenti, sono dispositivi in grado di misurare la variazione (solitamente un incremento...) di temperatura della soluzione contenente l'analita a seguito del decorso di una reazione (promossa dall'elemento biologico) che lo vede coinvolto, ed associarla alla concentrazione della specie in esame. (10).

In base al meccanismo di trasporto degli elettroni tra l'elemento di riconoscimento biologico e il trasduttore, i biosensori, possono infine essere classificati come biosensori di prima, seconda e terza generazione.

Nei dispositivi di prima generazione (i meno recenti) il biorecettore si trova fissato (o intrappolato) in una membrana, a sua volta bloccata sulla superficie del trasduttore; in queste condizioni la specie chimica secondaria, prodotta dalla reazione redox catalizzata dal biocatalizzatore sull'analita, è direttamente ossidata o ridotta sulla superficie dell'elettrodo.

Nei biosensori di seconda generazione vengono impiegate particolari sostanze redox, dette mediatori, capaci di diffondere all'interno dell'involucro enzimatico dall'analita alla superficie del trasduttore.

Infine, nel caso dei sistemi di terza generazione il trasporto degli elettroni avviene attraverso contatto elettronico diretto tra il trasduttore e la componente biologica e questo è reso possibile dalla struttura del materiale elettrodico che riduce la distanza e rende possibile il tunneling elettronico tra biocatalizzatore ed elettrodo (4).

1. **Borisovt S.M. et al.** Chem. Rev. 2008, Vol. 108, pp. 423-461.
2. **Wang X. et al.** Trend. Environ. Anal. Chem. 2014, Vol. 2, pp. 25-32.
3. **Justino C. L. et. al.** Trend in Anal. Chem. 2015, Vol. 68, pp. 2-17.
4. **Karunakaran C. et al.** Biosensors and Bioelectronics. s.l. : Elsevier, 2015. pp. 2-68.
5. **Mungroo N. A. et al.** Biosensors. 2014, Vol. 4, pp. 472-493.
6. **Sharma H. et al.** Sensors and Actuators B. 2013, Vol. 183, pp. 535-549.
7. **Thevenot D. et al.** Biosensors and Bioelectronics. 2001, Vol. 16, pp. 121-131.
8. **Renault N. J. et al.** Sensors. 2008, Vol. 8, pp. 2569-2588.
9. **Wang Y. et al.** Sensors. 2012, Vol. 12, pp. 3449-3471.
10. **Thakur M. S. et al.** J. Food Sci Technol. 2013, Vol. 50, pp. 625-641.
11. **Marazuela M. et al.** Anal. Bioanal. Chem. 2002, Vol. 372, p. 664-682.
12. **Nguyen H. H. et al.** Sensors. 2015, Vol. 15, pp. 10481-10510.
13. **De Feijter J.A. et al.** Biopolymers. 1978, Vol. 17, pp. 1759-1772.
14. **Stu Borman.** Anal. Chem. 1987, Vol. 59, p. 1161-1164.
15. **Kimmel D. W. et al.** Anal. Chem. 2012, Vol. 84, pp. 685-707.

1.3 Enzimi.

1.3.1 Introduzione.

Sebbene esista un'ampia varietà di mediatori biologici che possono essere impiegati nello sviluppo dei biosensori, assai spesso la scelta ricade sugli enzimi. Questi sono molecole di natura proteica, in grado di catalizzare una specifica reazione chimica, e tale proprietà giustifica il termine *biocatalizzatore* con cui essi sono frequentemente identificati. Gli enzimi permettono di ridurre l'energia di attivazione (E_a) della reazione da essi catalizzata, incrementandone la velocità fino ad un fattore di 10^6 - 10^{12} (1). La catalisi biologica fu identificata e descritta per la prima volta alla fine del '700, in studi sulla digestione della carne da parte di secrezioni gastriche. Negli anni successivi, Louis Pasteur osservò che la conversione dello zucchero in alcol era catalizzata da "fermenti", successivamente chiamati enzimi (2). L'isolamento e la cristallizzazione dell'enzima ureasi da parte di Sumner nel 1926 (3) rappresenta il vero passo avanti nello studio delle proprietà di uno specifico enzima. Sumner stabilì dapprima che i cristalli fossero interamente costituiti da proteine e quindi postulò che quella fosse la prevalente natura degli enzimi. Quest'idea venne accettata soltanto alla fine del 1930 dopo che Northrop e Kunitz cristallizzarono altri enzimi quali la pepsina, la tripsina e altri enzimi digestivi, verificando che tutti erano delle proteine (4). Nella seconda metà del XX secolo le ricerche in merito si moltiplicarono in maniera esponenziale, portando alla purificazione di migliaia di enzimi e alla determinazione della struttura e del meccanismo d'azione di un centinaio di essi. La loro attività catalitica dipende dall'integrità della loro conformazione proteica nativa, e in generale tutte le loro strutture (dalla primaria alla quaternaria) sono, per diverse ragioni, essenziali per l'ottimale espressione della loro funzione.

Gli enzimi sono molecole con massa molecolare che varia in un ampio range, tentativamente compreso tra 12000 a oltre 1.000.000 Dalton. Alcuni enzimi vengono attivati direttamente dai gruppi chimici presenti nella struttura proteica, altri invece hanno bisogno di funzionalità aggiuntive, che possono essere ioni inorganici come Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} (*cofattori*), oppure complesse molecole organiche o metalloorganiche (*coenzimi*). Altri infine necessitano per il loro corretto funzionamento della presenza sia di ioni metallici che del coenzima (5). Un coenzima o uno ione metallico legato covalentemente alla proteina enzimatica viene chiamato **gruppo prostetico**. Un enzima cataliticamente attivo e completo di tutti i suoi coenzimi o ioni metallici è detto **aloenzima**, mentre con **apoenzima** o **apoproteina** si intende la sola sua parte proteica. I coenzimi operano come trasportatori temporanei di specifici gruppi funzionali (5).

L'Unione internazionale di biochimica e di biologia molecolare ha sviluppato una nomenclatura per gli enzimi, i numeri EC. Ciascun enzima è descritto da una sequenza di quattro cifre preceduta da "EC". Il primo numero sostanzialmente classifica l'enzima in base al suo meccanismo d'azione:

1. Ossidoreduttasi: reazioni di ossidoriduzione; trasferimento di elettroni o di atomi di idrogeno e di ossigeno da una molecola ad un'altra.
2. Transferasi: trasferimento di gruppi funzionali da un substrato ad un altro (es. un metile o gruppi fosforici).
3. Idrolasi: Formazione di due prodotti a partire da uno per idrolisi di uno o più legami.
4. Liasi: addizione o rimozione non idrolitica di gruppi funzionali a o dalla molecola di substrato (es. legami doppi o formazione di doppi legami mediante rimozione di gruppi).

5. Isomerasi: riarrangiamento intramolecolare; ovvero trasferimento di gruppi funzionali all'interno di molecole in seguito a reazioni di isomerizzazione.
6. Ligasi: unione di due molecole attraverso la formazione di nuovi legami covalenti carbonio-carbonio, carbonio-azoto, carbonio-ossigeno, carbonio-zolfo, mediante reazioni di condensazione accoppiate alla scissione di ATP.

Una caratteristica delle reazioni catalizzate dagli enzimi è quella di avvenire all'interno dei confini di una "tasca" dell'enzima chiamata *sito attivo*. La molecola che si lega al sito attivo e su cui l'enzima agisce prende il nome di *substrato*. Nella superficie del sito attivo sono presenti dei residui amminoacidici che legano il substrato e catalizzano la reazione chimica. La formazione del complesso enzima-substrato è essenziale per la biocatalisi, ed è anche il punto di partenza per l'elaborazione matematica che definisce il comportamento cinetico di queste reazioni e per la descrizione teorica del meccanismo d'azione degli enzimi (5).

Come già menzionato precedentemente, l'aumento della velocità di una reazione determinato da un enzima può variare da 6 a 12 ordini di grandezza. Questo avviene grazie al riarrangiamento dei legami covalenti che si ha durante una reazione mediata da enzimi. Tra il substrato e i gruppi funzionali specifici dell'enzima hanno luogo diversi tipi di reazioni chimiche, come ad esempio formazione di legami transitori, attraverso i quali il substrato viene attivato per la reazione, oppure trasferimento temporaneo di qualche gruppo dal substrato al sito attivo. Si genera quindi una via di reazione a bassa energia. Talvolta invece si generano delle interazioni di tipo non covalente tra substrato ed enzima che portano alla formazione di un complesso specifico. La formazione di ogni interazione debole nel complesso ES (enzima-substrato) è accompagnata da un piccolo rilascio di energia libera proporzionale alla stabilizzazione

ottenuta tramite l'interazione. Il potere catalitico deriva quindi dall'energia rilasciata durante la formazione di questi legami e dalle interazioni deboli tra il substrato e l'enzima. La formazione del complesso ES non è sufficiente a spiegare la catalisi enzimatica; in questo complesso si formano delle interazioni deboli quando però si raggiunge lo stato di transizione. L'energia libera (energia di legame) rilasciata durante la formazione di queste interazioni controbilancia almeno in parte l'energia necessaria per superare la barriera energetica. La stessa energia di legame che fornisce l'energia per la catalisi genera negli enzimi la specificità, ovvero la capacità di queste molecole di discriminare tra il substrato e composti simili. Se il sito attivo di un enzima possiede gruppi funzionali disposti in modo da formare una varietà di interazioni ottimali con un dato substrato nello stato di transizione, esso in genere non sarà in grado di interagire altrettanto bene con una diversa molecola.

I principali parametri caratteristici di un enzima sono:

- *Attività enzimatica*, espressa in $\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}$, è definita come la quantità di substrato convertito nell'unità di tempo (minuto) in condizioni standard di temperatura, pH e forza ionica.
- *Attività specifica enzimatica*, espressa in $\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ di proteina, è l'attività enzimatica per unità di massa (1 mg) di proteina equivalente.
- *Costante catalitica* o *numero di turnover*, espressa in $\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mole}^{-1}$, è l'attività enzimatica per mole di enzima.

Per studiare il meccanismo d'azione degli enzimi vengono utilizzati diversi approcci sperimentali, tra i vari metodi quello maggiormente impiegato è la *cinetica enzimatica* (5).

Una semplice reazione enzimatica può essere scritta come:

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.



dove E, S e P rappresentano rispettivamente l'enzima, il substrato ed il prodotto. ES è il complesso transitorio dell'enzima con il substrato. Il ruolo dell'enzima è quello di accelerare la conversione di S in P senza venir consumato nel corso della reazione senza che la costante di equilibrio venga modificata. La reazione raggiunge l'equilibrio molto più rapidamente in condizioni di catalisi enzimatica, in quanto la velocità della reazione è molto superiore a quella che si può osservare in assenza di enzima (5).

Il meccanismo enzimatico più semplice è stato descritto per la prima volta da Michaelis-Menten nel 1913 (6); il modello proposto si basa su due assunzioni:

- La velocità di reazione viene valutata per un periodo di tempo durante il quale l'entità del decorso della reazione inversa è fisicamente trascurabile, e quindi nel periodo di valutazione scelto da Michaelis e da Menten, la velocità è costantemente pari a v_0 ;
- Si presuppone che il complesso enzima-substrato sia in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato e che tale situazione non sia alterata dalla formazione del prodotto;

La velocità iniziale v_0 è pari a: $v_0 = k_2[ES]$.

Per poter derivare un'equazione utile che descriva la catalisi enzimatica si assume che la reazione proceda in condizioni di stato stazionario, per cui

$\frac{d[ES]}{dt} = 0$, cioè $k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$, da cui ricavando [ES]:

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

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

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

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

$$[ES] = \frac{[E][S]}{k_M} \text{ e considerando che } [E] = [E_{tot}] - [ES]$$

l'espressione iniziale $v_o = k_2[ES]$ può essere scritta come:

$$v_o = \frac{k_2 [E_{tot}][S]}{([S] + k_M)} \quad \text{(equazione 2)}$$

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

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

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

$$v_o = \frac{v_{max} [S]}{([S] + k_M)} \quad \text{(equazione 3)}$$

Questa equazione caratterizza un'iperbole equilatera e la cinetica di un certo enzima viene definita da due costanti:

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

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

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

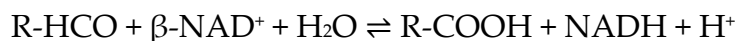
Esistono vari metodi matematici per determinare i valori di k_M e v_{max} , il più semplice è quello che si serve del grafico dei doppi reciproci o linearizzazione di Lineweaver-Burk.

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

1 U=1 μ mol di substrato trasformato in un minuto.

Aldeide deidrogenasi e Diaforasi.

L'aldeide deidrogenasi è un enzima appartenente alla classe delle ossido reductasi, con numero EC 1.2.1.5, e catalizza la seguente reazione:

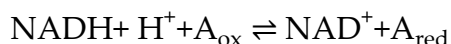


Per le prove sperimentali di questo lavoro di tesi è stata utilizzata l'aldeide deidrogenasi estratto dal lievito di birra; si tratta di un tetramero avente peso molecolare pari a 228 kDa e costituito da subunità di 57kDa.

I monomeri sono assemblati in modo tale da formare dei tetrameri a forma quadrata; questo enzima esiste in diverse isoforme ed è localizzato sia nel citosol che nei mitocondri.

È in grado di catalizzare la reazione di ossidazione di differenti substrati quali acetaldeide, formaldeide, propionaldeide, n-butiraldeide; la sua attività viene inibita da sostanze come la propilurea, la crotonaldeide, il cicloesiliscianato.

L'enzima diaforasi E.C. 1.8.1.4 appartiene alla categoria delle NADH deidrogenasi e catalizza la seguente reazione:



Dove A: acetore nella forma ossidata e ridotta.

Polifenolossidasi.

Gli enzimi appartenenti alla categoria delle polifenolossidasi contengono all'interno della loro struttura ioni Cu in opportuni stati di ossidazione e catalizzano le reazioni di un elevato numero di composti, anche non solo polifenolici. Sono suddivise in due gruppi: le Laccasi e le Tirosinasi (7).

Le Tirosinasi giocano un ruolo cruciale nella idrossilazione di fenoli ad *orto*-difenoli e nell'ossidazione degli *orto*-difenoli ad *orto*-chinoni. Nel centro catalitico di questi enzimi sono localizzati due ioni rameici, chiamati CuA e CuB. Lo stato di ossidazione del rame e l'assenza (o la presenza) di ossigeno nel sito attivo dell'enzima, determinano il tipo di tirosinasi (*met*-, *ossi*- o *deossi*-). Il legame dell'O₂ alla forma *deossi* della tirosinasi spinge l'attività enzimatica che porta alla formazione dell'*ossi*-enzima. Questa forma può interagire con il substrato monoidrossilato oppure diidrossilato. Nel primo caso, l'O₂ attacca l'anello fenolico, con rottura del legame O-O, successiva idrossilazione del substrato e conseguente formazione dell'*o*-difenolo, con successiva ossidazione di quest'ultimo ad *o*-chinone. Nel secondo caso, il substrato diidrossilato coordina due ioni rameici. Il rilascio del chinone porta alla formazione della forma *met*- dell'enzima, che è capace di legare un unico substrato diidrossilato. Successivamente a questa reazione, entrambi gli ioni rameici si ritrovano coordinati attraverso l'ossigeno al substrato, e la dissociazione del chinone prodotto dal sito catalitico dell'enzima porta alla rigenerazione della forma *deossi* della tirosinasi (Figura 1) (8) (9) (10).

Le laccasi sono delle cuproproteine appartenenti alla classe delle ossido-reduttasi; esse catalizzano l'ossidazione mono-elettronica del substrato, generando radicali liberi. Il prodotto di questa reazione è fortemente instabile, e può soggiacere ad una seconda reazione (enzimatica o non-enzimatica, quali ad

esempio un'idratazione, un disproporzionamento o una polimerizzazione) (8) (11) (12). Il sito attivo delle laccasi è composto da quattro atomi di rame; le laccasi ossidano il substrato attraverso la riduzione dell'O₂ ad H₂O. L'ossidazione del substrato avviene sullo ione rame di tipo 1 (T1) mentre il cluster di rame triatomico T2/T3 è responsabile della riduzione dell'ossigeno. Il centro rameico T1 accetta un elettrone proveniente dal substrato elettrondonatore; l'elettrone viene dunque trasferito nel cluster T2/T3. In seguito all'interazione tra l'ossigeno ed il cluster T2/T3 avviene una riduzione bieletronica che porta alla formazione dell'intermedio perossidico contenente l'anione O₂⁻. L'intermedio perossidico subisce una riduzione bieletronica con successiva rottura del legame O-O con conseguente formazione di un intermedio totalmente ossidato connesso con il prodotto ottenuto dalla riduzione dell'O₂ (13) (12) (14).

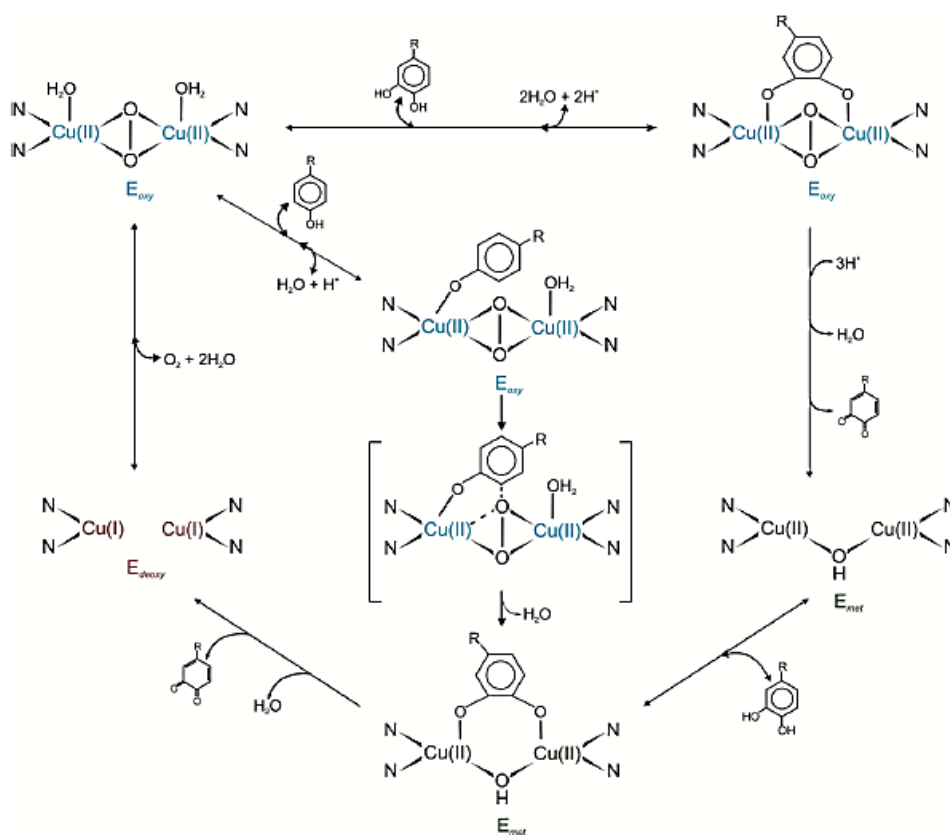


Figura 1.7 Ciclo catalitico della Tirosinasi (7)

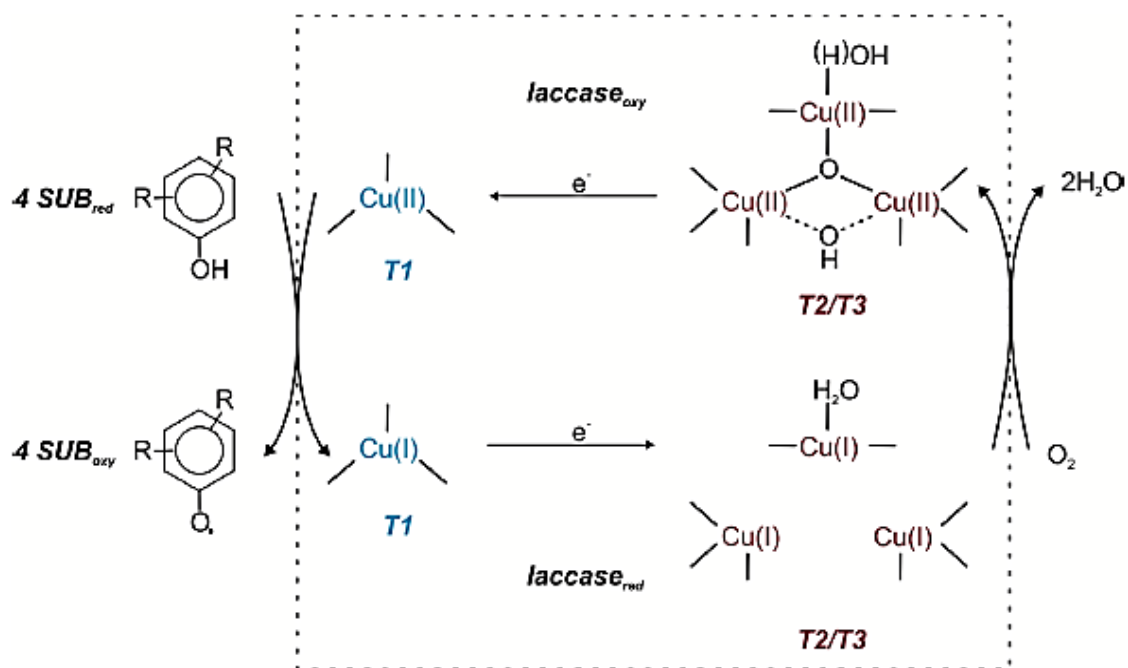


Figura 1.8 Ciclo catalitico della Laccasi (7).

1.3.2 Immobilizzazione enzimatica.

L'immobilizzazione degli enzimi sulla superficie del trasduttore è una fase particolarmente delicata e complessa dello sviluppo del biosensore. In letteratura vengono riportate diverse tecniche che permettono l'immobilizzazione dell'elemento di riconoscimento biologico e comprendono il classico adsorbimento, la formazione di legami covalenti, l'intrappolamento, il cross-linking oppure ancora l'affinità. Talvolta questi sistemi di fissaggio vengono combinati tra loro oppure vengono sostituiti da metodi più moderni, che prevedono a tal fine l'impiego di polimeri conduttori, nanotubi di carbonio e nanoparticelle (15). La scelta del tipo d'immobilizzazione influenzerà enormemente le proprietà del biosensore, e quindi i parametri di sensibilità, selettività e stabilità, in quanto ogni meccanismo di fissaggio può influenzare in maniera differente la mobilità, la stabilità, l'orientazione e soprattutto l'attività

enzimatica (16). Il processo d'immobilizzazione, da cui dipendono le performances analitiche del biosensore, dev'essere conservativo nei confronti della struttura, della funzione e dell'attività della componente biologica. Questa deve rimanere bloccata sulla superficie del dispositivo durante il suo impiego senza dare luogo a fenomeni di desorbimento. La scelta del meccanismo d'immobilizzazione dipende fundamentalmente dalla natura dell'enzima, dal tipo di trasduttore e dalle modalità di determinazione dell'analita (17). Il più importante fattore che orienta la scelta è quello inerente la qualità del biosensore che s'intende ottenere: infatti la sensibilità di questi dispositivi decresce notevolmente qualora l'elemento di riconoscimento biologico vada incontro al processo di denaturazione, oppure subisca delle modifiche conformazionali, soprattutto in prossimità del suo sito attivo (17).

Intrappolamento.

Gli enzimi possono essere bloccati in una matrice tridimensionale, come un film elettropolimerizzato, un fotopolimero, una matrice polisaccaridica oppure ancora nanotubi di carbonio. Questo tipo d'immobilizzazione è piuttosto semplice dal punto di vista pratico. L'enzima, il mediatore, ed altri additivi possono essere inglobati contemporaneamente all'interno dello stesso film depositato sulla superficie del trasduttore senza danneggiare l'elemento biologico, preservandone l'attività. I biosensori basati sull'intrappolamento fisico sono spesso caratterizzati da una maggiore stabilità sia nel corso dell'impiego sia durante la fase di conservazione. Tuttavia alcune limitazioni possono essere dovute al rilascio della componente biologica in soluzione oppure ancora ad una restrizione nella diffusione dell'analita attraverso il film (17) (18). L'intrappolamento può essere effettuato tramite elettropolimerizzazione, impiegando dei materiali anfifilici, tramite

fotopolimerizzazione, processi sol-gel, mediante l'impiego di gel di polisaccaridi o di pasta di carbonio.

La polimerizzazione elettrochimica è un approccio semplice e attraente per l'immobilizzazione controllata degli enzimi sulle superfici degli elettrodi. Questo metodo *one-step* consiste nell'applicare un adeguato potenziale o un opportuno valore di corrente al trasduttore immerso in una soluzione acquosa contenente contemporaneamente le molecole enzimatiche e quelle del monomero che s'intende polimerizzare. In questo modo, nel corso della polimerizzazione, l'enzima presente in prossimità della superficie del trasduttore viene incorporato fisicamente all'interno del *network* polimerico in accrescimento. La maggior parte dei film elettrosintetizzati sono polimeri conduttori come la polianilina, il polipirrolo o il politiofene. Grazie alla sua conducibilità, lo spessore del film può essere facilmente controllato ed è possibile inoltre generare diversi strati polimerici successivi. Il metodo d'immobilizzazione *one-step* non comporta alcuna reazione chimica tra il monomero e le biomolecole e permette anche, grazie al controllo dello spessore dello strato del polimero, la modulazione della quantità di biomolecole immobilizzate.

Questi sistemi sono inoltre ben adattabili a processi di miniaturizzazione.

Lo svantaggio di tale approccio risiede nelle alte concentrazioni di monomero (0,05-0,5 M) e di unità enzimatiche (0,2-3,5 mg*ml⁻¹) solitamente richieste (18).

Inoltre, è difficoltoso valutare il quantitativo di biomolecole intrappolate all'interno del reticolo polimerico, in quanto esso non può essere stimato per semplice differenza tra le concentrazioni della componente biologica in soluzione prima e dopo l'elettropolimerizzazione. I polimeri conduttori possono favorire il flusso di elettroni, rappresentando quindi una possibilità interessante per la fabbricazione di biosensori elettrochimici. I polimeri non conduttori (poli

o-fenilendiammina, *o*-amminofenolo, polipirrolo sovraossidato) rappresentano invece delle matrici emergenti per il processo d'immobilizzazione (19). In particolare, l'immobilizzazione elettrochimica di biomolecole produce dei film molto sottili, a causa della loro crescita autolimitante, portando quindi alla produzione di biosensori aventi tempi di risposta rapidi (19). In queste condizioni il substrato e i prodotti tendono a diffondere rapidamente da e verso il sito attivo dell'enzima ma, essendo permselettivi, impediscono l'interferenza da parte di altre specie elettroattive eventualmente presenti nel campione. I sensori realizzati in tal modo posseggono inoltre una buona selettività, una elevata sensibilità ed un tempo di risposta piuttosto rapido.

Adsorbimento.

L'adsorbimento enzimatico sulla superficie di supporti solidi rappresenta il metodo più semplice per la loro immobilizzazione fisica (20).

L'enzima viene solubilizzato in opportuno solvente avente un pH idoneo per la conservazione delle proprietà enzimatiche, e quindi posto a contatto con il supporto solido per un determinato periodo di tempo.

L'enzima non adsorbito viene quindi rimosso mediante lavaggio con idoneo tampone. I meccanismi di adsorbimento si basano su legami deboli, quali forze di carattere elettrostatico come le forze di Van der Waals e/o interazioni idrofobiche. Questa tecnica non comporta alcun processo di funzionalizzazione del supporto ed è generalmente rispettosa dell'attività enzimatica (17) (21).

Anche se questo metodo d'immobilizzazione in generale non comporta inattivazione enzimatica, presenta tuttavia degli inconvenienti dovuti al fatto che gli enzimi sono labilmente legati al supporto e l'enzima può essere desorbito facilmente in seguito a variazioni termiche, di pH e forza ionica.

Così, questi biosensori sono caratterizzati da una scarsa stabilità operativa e di stoccaggio. Un altro inconveniente è l'adsorbimento non specifico di altre proteine o sostanze.

Cross-linking.

L'immobilizzazione enzimatica con la tecnica del cross-linking utilizzando glutaraldeide o altri agenti bifunzionali come gliossale o esametildiammina rappresenta un altro approccio noto per lo sviluppo dei biosensori.

In letteratura sono riportati diversi biosensori conduttimetrici in cui l'immobilizzazione enzimatica viene effettuata sfruttando un gel ottenuto dalla co-reticolazione della glutaraldeide e dell'albumina di siero bovino (BSA); tali strumenti sono stati impiegati per la rilevazione di diverse specie chimiche come metalli pesanti e sostanze inquinanti (17).

Immobilizzazione covalente.

L'accoppiamento covalente degli enzimi ai supporti polimerici è un metodo d'immobilizzazione chimica piuttosto comune per lo sviluppo di biosensori enzimatici.

In questo modo, i biocatalizzatori sono vincolati alla superficie attraverso gruppi funzionali non essenziali per la loro attività catalitica ma nondimeno già presenti nella loro struttura. L'accoppiamento tra gli enzimi e il supporto solido è generalmente preceduto da una fase di attivazione dei gruppi funzionali presenti sulla superficie del trasduttore, impiegando reagenti multifunzionali come la glutaraldeide o la carbodimide.

Il supporto può essere costituito sia da un materiale inorganico (vetro poroso) che da un materiale naturale (come ad esempio la cellulosa) o - ancora - da un polimero sintetico (ad esempio, nylon). L'immobilizzazione covalente può

essere eseguita direttamente sulla superficie del trasduttore o su una membrana (o film sottile) depositato sulla superficie dello stesso.

Sono stati descritti numerosi protocolli per l'attivazione delle superfici solide e le procedure maggiormente impiegate saranno successivamente descritte con maggior dettaglio.

Con questa tecnica di preparazione del biosensore si ottiene un dispositivo maggiormente stabile, ma a prezzo del consumo di elevate quantità di bioreagenti e di una riproducibilità non ottimale (17).

Attivazione dei gruppi carbossilici.

Le carbodiimmidi permettono il legame tra i gruppi carbossilici di un supporto e la funzione amminica di un enzima. La N-idrossisuccinimide (NHS) può essere associata alla carbodiimmide in modo tale da migliorarne l'efficienza d'immobilizzazione. Questa procedura è largamente impiegata per lo sviluppo dei biosensori enzimatici, e il meccanismo di reazione è riportato in Figura 3.

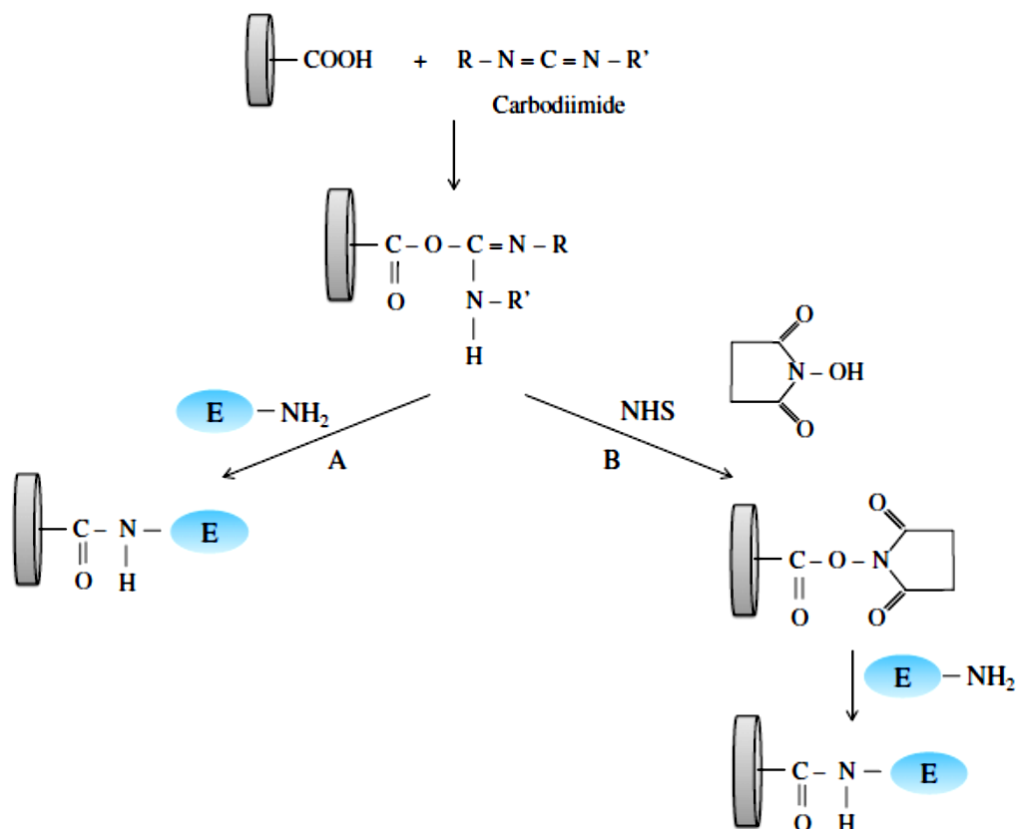


Figura 1.9 Meccanismo di reazione tra i gruppi $-\text{COOH}$ e EDC/NHS (17).

Le carbodiimmidi più facilmente disponibili e comunemente usate sono l'EDC rappresentata in figura 4, idrosolubile, per reticolazione in soluzione acquosa e il DCC, in figura 5, insolubile in acqua, per i metodi di cross-linking in solventi organici.

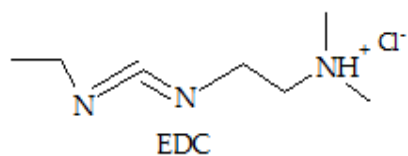


Figura 1.10 Struttura chimica dell'1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC).

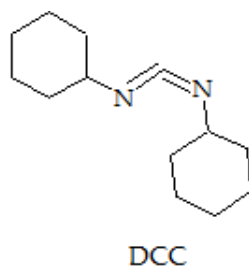


Figura 1.11 Struttura chimica della dicicloesilcarbodimmide (DCC).

L'EDC reagisce con i gruppi carbossilici per formare un intermedio attivo O-acilisourea, che può essere facilmente spostato da un attacco nucleofilo da parte di gruppi amminici primari nella miscela di reazione. L'ammina primaria forma un legame ammidico con il gruppo carbossilico originale, e un sottoprodotto dell'EDC viene rilasciato come derivato solubile dell'urea. L'intermedio di O-acilisourea è instabile in soluzioni acquose; la mancata reazione con i residui amminici porta all'idrolisi dell'intermedio, alla rigenerazione dei gruppi carbossilici e al rilascio di un derivato dell'urea N-sostituito.

La reticolazione con EDC è più efficiente in condizioni acide (pH 4,5) e deve essere eseguito in buffer privo di gruppi carbossilici ed ammine esterne. I tamponi fosfato e pH neutro (fino a 7,2) sono comunque compatibili con la chimica di reazione, anche se mostrano minor efficienza. Questa può essere migliorata aumentando la quantità di EDC nell'ambiente di reazione.

La N-idrossisuccinimmide (NHS) o il suo analogo idrosolubile (Sulfo-NHS) sono spesso inclusi nei protocolli di accoppiamento EDC per migliorarne l'efficienza e creare intermedi stabili (ammino-reattivi). L'EDC lega l'NHS ai gruppi carbossilici, formando un estere-NHS che è notevolmente più stabile della O-acilisourea intermedia, pur consentendo una coniugazione efficiente con le ammine primarie a pH fisiologico (22).

I meccanismi con cui si compie il trasferimento redox dal sito attivo enzimatico alla superficie del trasduttore sono diversi, tra questi annoveriamo:

- Il sistema navetta (*electronic shuttle*), caratteristico per i biosensori di I e II generazione;
- Il diretto (*tunnelling*), specifico per i biosensori di III generazione;
- Il diretto (*wired*) mediante polimeri redox o conduttori.

La comunicazione diretta avviene anche quando il sito attivo dell'enzima è collegato (*cablato*) alla superficie del trasduttore di segnale per mezzo di polimeri conduttori; infatti, la struttura flessibile del polimero avvolge l'intero enzima, creando una rete tridimensionale specifica elettrone-conduttrice, attraverso la quale gli elettroni si possono spostare verso o dall'elettrodo. La possibilità di legare il biocatalizzatore direttamente alla superficie del trasduttore apre la strada alla possibile miniaturizzazione di tali dispositivi.

1.3.3 Mediatori redox (23).

I biosensori enzimatici spesso necessitano di particolari specie chimiche per ripristinare il ciclo catalitico e per garantire il trasporto degli elettroni dal centro redox dell'enzima alla superficie dell'elettrodo lavorante. Tali sostanze, generalmente coppie redox a basso peso molecolare, sono comunemente note con il termine di mediatori, e fungono da "navette" per il trasporto degli elettroni nel sistema biosensoristico. Durante la reazione catalitica, il mediatore prima reagisce con l'enzima ridotto e quindi diffonde verso la superficie elettrodica, ove viene nuovamente ossidato. I dispositivi di questo tipo sono meno sensibili alle sostanze interferenti, poiché la presenza dei mediatori permette loro di lavorare a potenziali più bassi.

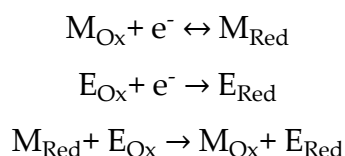
Il mediatore deve essere stabile nelle condizioni operative e non deve interferire nel processo di analisi (ad esempio dando reazioni collaterali durante il trasferimento degli elettroni). Inoltre esso deve reagire rapidamente con l'enzima ridotto e deve presentare una cinetica reversibile; la sovratensione necessaria a indurre la sua riossidazione deve inoltre essere inferiore rispetto al potenziale redox sia delle specie elettrochimicamente attive presenti che - soprattutto - dell'enzima. Infine, sia la sua forma ossidata che quella ridotta deve essere stabile. La voltammetria ciclica è una tecnica utile per studiare le proprietà dei mediatori e permette di scegliere l'agente più idoneo alla costruzione di un biosensore amperometrico.

L'impiego dei mediatori porta a notevoli vantaggi, in quanto le misure sono meno dipendenti dalla concentrazione di ossigeno, il potenziale di lavoro del biosensore dipende dal potenziale di ossidazione del mediatore e - lavorando a potenziali non troppo elevati - viene ridotta notevolmente l'interferenza da parte di altre specie chimiche eventualmente presenti.

Esistono diversi tipi di mediatori impiegati nei biosensori, tra questi abbiamo coloranti organici (24) (25) (26) (27) (blu di metilene, fenazine, tionine, blu di Prussia) oppure coppie redox inorganiche. Tuttavia, l'impiego di molecole organiche in tale contesto ha spesso dato luogo a problemi dovuti alla loro bassa stabilità e al fatto che i loro potenziali redox dipendono dal pH della soluzione in cui sono stati solubilizzati.

Pertanto il ferrocene e i suoi derivati sono tra i più diffusi mediatori nella fabbricazione di biosensori stabili e sensibili (28) (29) (30), ma anche specie organiche come i chinoni e la coppia redox inorganica $[K_3Fe(CN)_6]/[K_4Fe(CN)_6]$ sono stati largamente impiegati.

I mediatori, come detto in precedenza, servono a facilitare il trasferimento di elettroni dalla componente biologica al trasduttore.

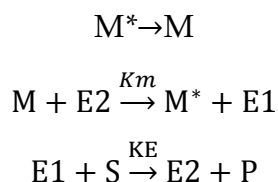


dove M_{Ox} ed E_{Ox} sono le forme ossidate del mediatore e dell'enzima, viceversa M_{Red} e E_{Red} sono le forme ridotte.

Il processo elettromotore avviene pertanto al potenziale redox tipico del mediatore, e la specie M_{Ox} viene rigenerata in prossimità della superficie elettrodica. Esistono mediatori in grado di soddisfare le esigenze in termini di struttura, proprietà e range di potenziali redox.

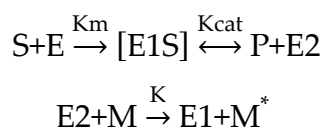
Il mediatore compete con il substrato naturale dell'enzima (spesso ossigeno molecolare), spingendo in maniera efficace ed efficiente il flusso di elettroni verso l'elettrodo. Tuttavia, alcuni mediatori redox possono funzionare solo in un ambiente privo di ossigeno.

La mediazione infine può essere di tipo omogeneo ed eterogeneo; nel sistema omogeneo, il mediatore e l'enzima diffondono liberamente nella soluzione. Questo approccio è frequentemente utilizzato per determinare le costanti di velocità per la reazione enzima-mediatore (31) (32) (33) e per misurare l'entità della reazione tra mediatori e proteine redox. Il mediatore M^* viene convertito nella sua forma di partenza M nella superficie elettrodica. M diffonde dall'elettrodo e reagisce con l'enzima E_2 per dare E_1 e produrre nuovamente M^* . Infine l'enzima viene riconvertito nella sua forma E_2 per reazione con il substrato S , come mostrato dal seguente schema di reazione.



Per gli enzimi che lavorano in presenza di flavoni e chinoni, le reazioni redox del gruppo prostetico coinvolgono due elettroni. Perciò - in questi casi - il ciclo catalitico viene completato impiegando per ogni elettrone due molecole di mediatore (ad esempio, ferrocene).

Nel caso della mediazione eterogenea si possono presentare due situazioni diverse: nel primo caso il mediatore viene aggiunto direttamente al bulk della soluzione, mentre nel secondo caso lo si ritrova legato all'elettrodo ed esso diffonde in soluzione durante la misura. Il ferrocene (34) e i sali inorganici conduttori (35) (36) (37) sono esempi rappresentativi di mediatori eterogenei, che operano in accordo al seguente schema.



Sulla superficie dell'elettrodo: $M^* \rightarrow M$

dove S è il substrato, P è il prodotto, E1 and E2 rappresentano due stati redox dell'enzima, mentre la coppia M/M* è il mediatore o il partner redox naturale.

Se consideriamo il caso della glucosio-ossidasi, che converte il glucosio in gluconolattone, M/M* può essere un naturale partner redox (come la coppia O_2/H_2O_2) oppure un mediatore aggiunto come la coppia ferrocene/ione ferricinio.

I derivati del ferrocene, aventi diversa carica e solubilità e con potenziali redox compresi tra +0,10 V e +0,40 V vs SCE vengono spesso impiegati per la preparazione di biosensori atti alla determinazione del glucosio (23).

1. Scheller F.W. et. al. Encyclopedya of Anal. Sci. 2005, Vol. 2, pp. 529-536.

2. **Pasteur L.** Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'academie des sciences Paris. 1931, Vol. 45, pp. 1032-1036.
3. **Sumner J. B.** J. Biol. Chem. . 1926, Vol. 69, pp. 435-441.
4. **Kunitz M. e Northrop J.** Gen. Physiol. 1931, Vol. 16, pp. 295-331.
5. **Nelson D.L. e Cox M. M.** I principi di biochimica di Lehninger. s.l. : Zanichelli.
6. **M., Michaelis L. e Menten.** Biochem. 1913, Vol. 49, pp. 333-369.
7. **Guzik U. et al.** Molecules. 2014, Vol. 19, pp. 8995-9018.
8. **Duran N. et al.** Enzyme Microb. Technol. 2002, Vol. 31, p. 907-931.
9. **Siegbahn P.E.M.** J. Biol. Inorg. Chem. 2003, Vol. 8, pp. 567-576.
10. **Solano O.** Pigm. Cell. Melanoma Res. 2009, Vol. 27, pp. 750-760.
11. **Mukherjee S.** Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2013, Vol. 12, pp. 61-73.
12. **Kunamneni A. et al.** Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. 2007.
13. **Wojcieszynska D. et al.** Biochem. Eng. J. 2012, Vol. 66, pp. 1-7.
14. **Li Y. et al.** Int. J. Electrochem. Sci. 2012, Vol. 7, pp. 11400-11413.
15. **Mulaa F. J. et al.** Biosensors. Handbook of Food Safety Engineering. s.l. : Da-Wen Sun, 2012, pp. 313-351.
16. **Jiang J. H. et al.** Encyclopedia of Analytical Chemistry, Bioanalytical Chemistry, Biosensors - Biomolecules Analysis -. 2015, pp. 1-24.
17. **Sassolas A et al.** Biotechnology Advances. 2012, Vol. 30, pp. 489-511.
18. **Cosnier S.** Handbook of biosensors and biochips. s.l. : John Wiley & Sons, 2007, pp. 237-249.
19. **Cosnier S.** Anal. Bional. Chem. 2003, Vol. 377, pp. 507-520.
20. **Choi M. F. M.** Microchim. Acta. 2004, Vol. 148, pp. 107-132.
21. **Agyei D. et al.** Enzyme engineering (immobilization) for food applications Ed. -Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality-. s.l. : Rickey Y. Yada. Elsevier, 2015, pp. 213-235.
22. **Hoares G. D. et al.** Journal of biological chemistry. 1967, Vol. 242, 10, pp. 2447-2453.
23. **Chaubey A. et al.** Biosensors and Bioelectronics. 2002, Vol. 17, pp. 441-456.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

24. **Brunetti B. et al.** J. Electroanal. Chem. 2000, Vol. 491, pp. 166-174.
- 25., **Aoyagi T. et al.** Anal. Chem. 1997, Vol. 69, pp. 659-663.
26. **Dubin A. G. et al.** Bioelectrochem. Bioenerg. 1991, Vol. 25, pp. 131-135.
27. **Karyakin A. A. et al.** Anal. Chem. 1995, Vol. 67, pp. 2419-2423.
28. **Kajjya Y. et al.** Electroanal. Chem. 1991, Vol. 301, pp. 155-164.
29. **Francis G. et al.** Anal. Chem. 1984, Vol. 56, pp. 667-671.
30. **Turner A. P. F.** Methods Enzymol. 1988, Vol. 137, pp. 90-103.
31. **Szentrimay R. et al.** Electrochem. studies of Biol. Syst. 1977, Vol. 38, pp. 143-169.
32. **Turner A. P. F. et al.** The World Biotech. Report. 1987, Vol. 1, pp. 125-137.
33. **Davis G.** Biosensors. 1985, Vol. 1, pp. 161 - 178.
34. **Feinberg B. A. et al.** Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Wiley, New York : Milazzo D., 1981, Vol. 4, pp. 225.
35. **Kalys J.J.** Biosensors. 1986, Vol. 2, pp. 3-10.
36. **Khan G. F.** Biosens. Bioelectrons. 1996, Vol. 11, pp. 1221-1227.
37. **Li Q. S. et al.** Biosens. Bioelectrons. 1999, Vol. 14, pp. 327-334.

1.4 Polimeri Conduttori

1.4.1 Introduzione

La geniale idea di combinare la specificità di un elemento di riconoscimento biologico con la sensibilità dei trasduttori (ottico, termico, gravimetrico, elettrochimico) ha portato alla nascita dei biosensori. Il crescente interesse verso il loro impiego in analisi ambientale, sanitaria ed agroalimentare ha spinto la comunità scientifica ad approfondirne gli aspetti teorici ed applicativi. Una delle fasi più complesse nella realizzazione dei biosensori è l'immobilizzazione della molecola biologica sulla superficie del sistema di trasduzione, in quanto devono essere garantite alcune condizioni fondamentali (1):

- Stabilità delle macromolecole biologiche;
- Completa conservazione delle sue proprietà biologiche;
- Biocompatibilità ed inerzia chimica del sistema;
- Accessibilità ai siti attivi delle biomolecole bloccate.

L'ancoraggio di questi elementi è stato realizzato seguendo diversi approcci come l'adsorbimento fisico, il cross-linking, le interazioni covalenti e l'intrappolamento in gel e membrane. Inoltre, la versatile possibilità di funzionalizzare a piacere per via elettrochimica gli elettrodi convenzionali ha dischiuso nuovi orizzonti per l'applicazione di questi materiali in campo elettroanalitico, soprattutto nell'ambito della realizzazione di sensori di tipo chimico e di tipo biologico.

Grazie alla stabilità dei polimeri nei solventi organici, essi costituiscono un materiale ideale soprattutto per l'intrappolamento della componente biologica e la preservazione della sua attività in condizioni che si discostano comunque da quelle ideali per la loro funzione.

Per quanto riguarda l'intrappolamento delle biomolecole, la maggior parte dei lavori presenti in letteratura sono stati effettuati utilizzando polimeri conduttori come polipirrolo, polianilina, politiofene e loro derivati.

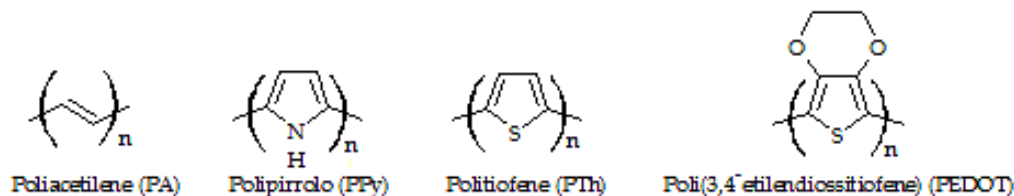


Figura 1.12 Struttura dei CP maggiormente impiegati.

I polimeri conduttivi (CP) sono delle macromolecole formate da piccole unità di ripetizione altamente reattive, solitamente in possesso di sistemi elettronici aromatici o comunque π -coniugati, tra loro legate in una sequenza regolare.

Allo stato neutro i CP si comportano da isolanti e la loro conducibilità intrinseca è dovuta alla formazione di trasportatori di carica in seguito a processi di doping ossidativi (p-doping) o riduttivi (n-doping) del loro sistema coniugato (2); nello specifico si generano degli ioni radicalici, detti *polaroni*, o ioni biradicalici, chiamati *bipolaroni*, delocalizzati lungo il backbone polimerico (3) (4) (5).

Contemporaneamente alla formazione di queste specie cariche, all'interno della struttura della macromolecola vengono inglobati dei controioni (dopanti) (4), che possono essere anioni o cationi in base al tipo di processo di doping; essi comportano un bilanciamento delle cariche presenti nella catena polimerica, portando pertanto ad un sistema che nel suo complesso è neutro.

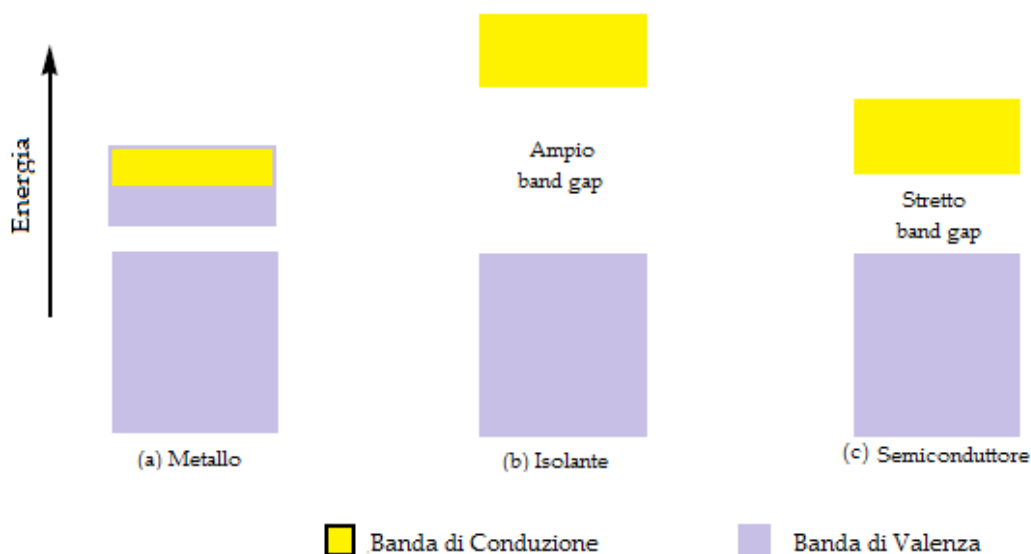
In generale le proprietà elettriche di un polimero dipendono dalle strutture elettroniche delle unità di ripetizione e dalle interazioni tra unità adiacenti, e possono essere spiegate attraverso la teoria delle bande elettroniche. Si parlerà pertanto di *banda di valenza* (CV), che rappresenta il livello elettronico occupato a più alta energia, e di *banda di conduzione* (CB) ovvero il livello elettronico non

occupato a minor energia. La differenza energetica tra i due livelli è definita come *band gap* (E_g) (6). Gli elettroni quindi devono possedere un valore specifico di energia per poter occupare una determinata banda e necessitano di un'energia extra per passare dalla banda di valenza a quella di conduzione (7).

Il fenomeno del doping genera delle nuove bande all'interno del gap energetico, rendendo possibile il movimento degli elettroni ed aumentando la conducibilità del materiale (4). Inoltre, l'attrazione tra gli elettroni di un'unità di ripetizione verso i nuclei di un'unità adiacente permette lo spostamento di tali cariche lungo la catena principale e sulle catene laterali, innalzando la conducibilità elettrica; tale fenomeno viene spesso indicato come "salto dell'elettrone".

Tanto più piccola è l'energia del band gap, ovvero la distanza tra la banda di conduzione e la banda di valenza, tanto più conduttivo risulterà essere il polimero.

Nello stadio antecedente al processo di doping questi materiali si comportano da isolanti ($10^{-10} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), tuttavia la loro conducibilità può essere aumentata fino a dodici ordini di grandezza ($10^2 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), in dipendenza della natura del sistema polimerico e della concentrazione della specie dopante (8).



Il processo di doping dei CP può essere eseguito per via elettrochimica oppure chimica.

Nel caso dell'ossidazione o riduzione elettrochimica, il polimero neutro è sottoposto ad un opportuno potenziale di ossidazione o riduzione in una cella elettrochimica. La carica generata sulla catena polimerica è quindi controbilanciata dal controione della soluzione elettrolitica.

La conducibilità del CP può essere modulata in funzione della concentrazione e della natura del controione. Quest'ultima caratteristica influenza non solo l'elettroattività, ma condiziona anche le proprietà strutturali e superficiali del film. Un vantaggio dell'approccio per elettropolimerizzazione è di poter controllare lo spessore del polimero in funzione della quantità di carica che fluisce attraverso la cella elettrochimica durante la crescita dello stesso (4).

Nel caso del doping chimico, invece, i CP sono dopati mediante l'aggiunta di un agente esterno, solitamente reagenti ossidanti come $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_7$ o FeCl_3 ; tale approccio è spesso indicato come "sintesi chimica" (2).

Oltre alla notevole variazione in termini di conducibilità, l'immissione di carica nei CP porta ad altri fenomeni interessanti che possono essere sfruttati per

svariate applicazioni. Il cambiamento della struttura elettronica dei CP è accompagnato, infatti, da una variazione delle proprietà ottiche nella regione del vicino IR (NIR) e dell'UV-Vis. Questa proprietà è sfruttata ad esempio nei display elettrocromici e nei sensori ottici. Infine l'incorporazione di ioni conduce al bilanciamento delle cariche generate durante il processo di doping lungo la catena polimerica. Questa proprietà è sfruttabile per la realizzazione di membrane a scambio ionico e può essere modulata utilizzando differenti controioni. Infatti, l'affinità dei polimeri conduttori per specifiche molecole target può essere modificata mediante incorporazione nella loro struttura di recettori sintetici o naturali. Stesso risultato si ottiene mediante immobilizzazione sulla superficie del trasduttore attraverso l'impiego di reagenti chimici multifunzionali oppure sfruttando direttamente le proprietà dei CP.

Si è prima detto che i polimeri maggiormente impiegati per la preparazione di biosensori sono il polipirrolo, la polianilina e il politiofene. Il polipirrolo presenta un vantaggio, dovuto alla possibilità di effettuare la sua elettrosintesi in condizioni di biocompatibilità (bassi potenziali di ossidazione e pH neutro) (1). Nel caso del politiofene, la potenziale semplicità di possibili reazioni di funzionalizzazione dell'anello eteroaromatico rende il monomero idoneo per lo sviluppo di sistemi elettrodi dedicati alla determinazione amperometrica. Diversi monomeri tiofenici sono stati proposti per la loro applicazione in elettroanalisi (2,2'-bitiofene, 3-metiltiofene, etilendiossitifene) (9). A differenza del pirrolo, e con poche eccezioni (es: etilendiossitifene), i monomeri tiofenici non sono solubili in soluzione acquosa. L'elettropolimerizzazione del tiofene è quindi condotta in solventi organici, ovvero in condizioni non completamente biocompatibili. In letteratura sono comunque riportati numerosi lavori in cui essi vengono utilizzati per la costruzione di biosensori. Si tratta spesso di

dispositivi in cui l'elemento biologico viene immobilizzato su di un film polimerico predepositato.

L'anilina è un monomero interessante per la produzione di sensori e biosensori, poiché agisce come un effettivo mediatore per il trasferimento di elettroni in reazioni redox o enzimatiche, risultando essere adatta anche all'immobilizzazione delle biomolecole. Tale monomero ha ottenuto un notevole successo nell'applicazione in campo biosensoristico anche grazie ad alcune delle sue proprietà, come la stabilità in termini di conducibilità nelle condizioni di stoccaggio dei biosensori, anche per periodi particolarmente lunghi. Inoltre l'impiego di questo polimero permette una notevole amplificazione del segnale analitico durante il processo di riconoscimento biologico. Infine la possibilità di sintetizzare questo polimero sotto forma di nanostrutture (nanofili, nanosfere, nanotubi) che possiedono una maggiore sensibilità ed offrono tempi di risposta brevi è stata ampiamente sfruttata nel settore delle nanotecnologie (10).

1.4.2. Polipirrolo

Il polipirrolo (PPy) è uno dei polimeri conduttori maggiormente utilizzati nella costruzione di biosensori analitici (come sensori catalitici aventi enzimi immobilizzati, immunosensori basati sull'affinità di proteine immobilizzate, sensori a filamento di DNA). Infatti, nel periodo compreso tra il 1990 ed il 2005 sono stati pubblicati sulla rivista "Electrochimica Acta" almeno 300 articoli riguardanti le sue applicazioni e le sue caratteristiche. La notevole versatilità di tale materiale è dovuta alle sue molteplici proprietà, tra cui l'attività redox, la capacità di scambio ionico e di discriminazione ionica, l'attività catalitica e la resistenza alla corrosione. La possibilità d'impiego per la produzione di nanofili

ad alta conducibilità (tra 10^{-4} e 10^{-2} S*cm⁻¹) e a temperatura ambiente l'hanno reso interessante nel settore delle nanotecnologie. L'effetto elettrocromico, comune ai CP, è spesso sfruttato nel settore della produzione di sistemi ottici. Infine, la capacità di adsorbimento di molecole organiche ed inorganiche (proteine, filamenti di DNA, gas) combinata con alcune delle proprietà elencate precedentemente (es. attività redox) lo rendono adatto nella costruzione di biosensori. Molte di queste caratteristiche sono influenzate dalle modalità di sintesi del film e dalla natura della specie dopante coinvolta (11).

1.4.2.1 Metodi di sintesi.

Il polipirrolo (Ppy) fu sintetizzato per la prima volta nel 1912 (12). Le tecniche impiegate per la sua sintesi sono molteplici:

- Polimerizzazione elettrochimica (13);
- Polimerizzazione per ossidazione chimica (14);
- Polimerizzazione fotochimica (15);
- Polimerizzazione al plasma (16);
- Polimerizzazione attraverso microonde (17).

Tra essi, i maggiormente impiegati sono quelli che si basano sull'induzione della polimerizzazione per via elettrochimica, applicando uno specifico potenziale anodico, o attraverso iniziazione chimica, utilizzando opportuni agenti ossidanti.

Sintesi elettrochimica.

L'approccio elettrochimico per la sintesi di film conduttori ed elettroattivi è un metodo piuttosto versatile poiché permette di variare le proprietà del film ottenuto modificando in maniera controllabile le condizioni dell'elettrolisi

(potenziale elettrochimico, densità di corrente, solvente, elettrolita). L'elettrosintesi permette inoltre di avere un facile controllo dello spessore del film polimerico.

Grazie alla buona solubilità del pirrolo in un'ampia gamma di solventi, la sua elettropolimerizzazione può essere effettuata in soluzione acquosa oppure in solventi organici. I parametri operativi, in particolare la natura del solvente, le dimensioni e la natura dei controioni/dopanti, hanno una forte influenza sulle proprietà del polipirrolo in termini di conduttività, proprietà meccaniche, struttura e caratteristiche morfologiche (18) (19). I controioni giocano un importante ruolo, perché il polimero è sintetizzato direttamente nella sua forma ossidata e nel suo stato dopato.

Il monomero è dapprima solubilizzato in una soluzione contenente un elettrolita di supporto con scarso carattere nucleofilo e bassa resistenza. Applicando un adeguato potenziale ($E \geq +0,65$ V vs Ag/AgCl) è possibile inizializzare la reazione di polimerizzazione. Il potenziale applicato può essere facilmente controllato e – con esso - la qualità del CP ottenuto.

L'elettropolimerizzazione del pirrolo è una reazione molto complicata, ed il suo meccanismo non è noto con certezza (19). Lo schema presunto cui comunemente si fa riferimento in letteratura (Fig. 1.13) prevede, come primo stadio, la formazione di un radicale catione attraverso l'ossidazione delle unità monomeriche neutre presenti in prossimità della superficie del trasduttore. La propagazione della reazione avviene per interazione tra due unità monomeriche radicaliche, e questa reazione è seguita da uno step di aromatizzazione ed ossidazione del dimero. Quest'ultimo, a causa della sua maggiore coniugazione, è più facilmente ossidabile rispetto all'unità monomerica. L'accrescimento della catena, che avviene per addizione ai dimeri radicalici di un nuovo radicale catione del monomero, prosegue fino ad

esaurimento del reagente. L'interruzione dell'accrescimento della catena polimerica si verifica quando il gruppo reattivo terminale viene bloccato da interazioni con molecole d'acqua (o di altri nucleofili forti), o a causa della mancanza di ulteriori unità monomeriche ossidate (17). Tali aspetti comportano limitazioni nella scelta del sistema solvente/elettrolita di supporto (17) e per questo motivo spesso sono preferiti solventi aprotici, a causa del loro debole carattere nucleofilo.

Sebbene la maggior parte delle unità pirroliche siano tra loro legate attraverso legami $\alpha-\alpha'$ (o posizione 2,5'), un numero non trascurabile di unità monomeriche risulteranno esser diversamente legate (in maniera $\alpha-\beta$ oppure $\beta-\beta'$); questo tipo di accoppiamento porta alla formazione di oligomeri solubili, e quindi alla riduzione della lunghezza di coniugazione ed infine ad un abbassamento della conducibilità (19).

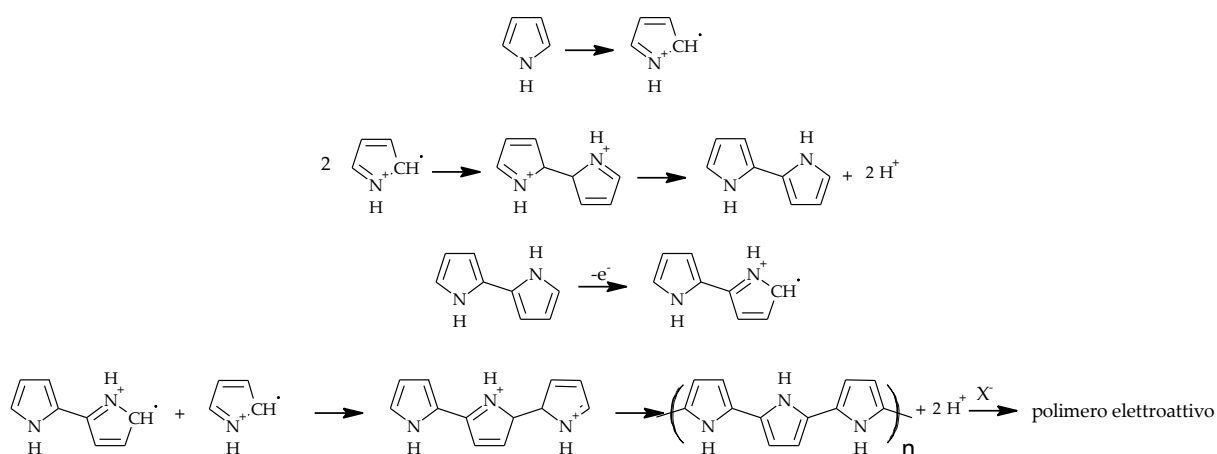
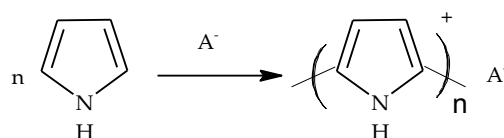


Figura 1.13 Schema di polimerizzazione elettrochimica del pirrolo.

Il polimero che si ottiene per via elettrochimica è nella sua forma ossidata e l'elettroneutralità è garantita da un incorporamento di un adeguato numero di controioni. La reazione complessiva della sintesi elettrochimica del polipirrolo può essere riassunta nella seguente maniera:

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.



Il valore di n , ovvero il numero di moli di elettroni per unità monomerica interessati nel processo di formazione del polimero, è stato stimato esser compreso tra 2,2 e 2,4 (19). 2 F/mol vengono coinvolti nel processo di formazione del film, mentre la carica in eccesso viene consumata durante l'ossidazione parziale del polimero. Una stima quantitativa del grado di ossidazione del polipirrolo può essere ottenuta mediante analisi elementare, ed è stato stimato che per tale CP il livello è compreso tra 0,2 e 0,4. In generale, sarà presente un anione per ogni 3 ÷ 4 unità di pirrolo, in modo tale da garantirne l'elettroneutralità; questo aumenta del 30 ÷ 40% il peso finale del polimero (19) (20). I controioni necessari a bilanciare la carica del CP possono non necessariamente provenire tutti dall'elettrolita di supporto: altri ioni negativi, anche di dimensioni diverse, possono concorrere all'elettroneutralità del polimero. Infatti la natura, le dimensioni, la carica, la struttura elettronica e sterica del controione, ma anche le condizioni di deposizione, il materiale di cui è costituito l'elettrodo e la natura del solvente sono tutti fattori fondamentali nella determinazione delle proprietà del film conduttivo elettrodepositato (19).

Il film polimerico può essere depositato su una vasta tipologia di elettrodi metallici e/o solidi. Gli elettrodi maggiormente impiegati sono quelli di carbonio vetroso, di platino e d'oro (19) (21) (22). Tuttavia sono stati testati anche elettrodi d'indio-ossido di stagno, titanio, alluminio ed argento, ma - rispetto ad un classico elettrodo di platino - il potenziale di ossidazione del monomero appare più elevato e la densità di corrente risulta estremamente ridotta, a causa della formazione di un film di ossidi metallici che impedisce il trasferimento degli elettroni durante il processo (19) (23).

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Le proprietà elettriche del Ppy dipendono fortemente dal suo stato redox: a potenziali molto anodici si può verificare una sua sovraossidazione, che comporta una riduzione della conducibilità e la perdita di ioni di bilanciamento inglobati nel film polimerico. In soluzioni acquose (o contenenti ossigeno) la sovraossidazione avviene a potenziali più bassi e porta alla parziale perdita di conduttività del film per formazione di gruppi funzionali contenenti ossigeno nella struttura polimerica.

Lo spessore del film di polipirrolo può essere determinato secondo la seguente equazione:

$$\delta_p = \frac{M \cdot Q_p}{(2 \cdot F \cdot \rho \cdot A)} \quad (24)$$

dove δ_p : spessore del film (cm);

F: costante di Faraday (96485 C \cdot mol⁻¹);

M: peso molecolare del pirrolo (67,1 g \cdot mol⁻¹);

ρ : densità del film di polipirrolo (1,5 g \cdot cm⁻³);

A: superficie dell'elettrodo (cm²);

Q_p: densità di carica (C);

Il numero 2 corrisponde al numero di elettroni scambiati per unità di pirrolo.

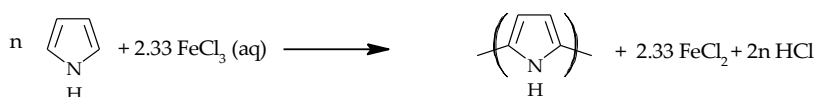
Sintesi chimica.

Polimeri a base polipirrolica possono essere facilmente preparati anche per via chimica. Questo tipo di polimerizzazione è particolarmente rapida e non richiede l'adozione di strumentazione complessa. Notevoli quantità di tale materiale possono essere ottenute sotto forma di polveri sottili attraverso l'impiego di sostanze ossidanti sia in solventi acquosi o organici che attraverso la deposizione chimica in fase vapore. Tuttavia l'impiego di questa tecnica limita il numero di polimeri conduttori che possono essere prodotti, a causa del

basso numero di controioni che può essere inglobato all'interno della matrice polimerica.

La sintesi chimica di Ppy viene descritta in letteratura utilizzando diversi agenti ossidanti come H₂O₂, HNO₂, PbO₂, FeCl₃, persolfati e chinoni (25). Per essa sono stati proposti due meccanismi di reazione: il primo comporta l'ossidazione monoelettronica del pirrolo per dare radicali cationici che danno poi luogo a coupling; mentre il secondo meccanismo comporta l'interazione di una molecola di radicale catione con una molecola di pirrolo.

Gli agenti ossidanti più comunemente utilizzati nella polimerizzazione chimica in soluzione acquosa sono: perossidisolfato d'ammonio, sali di ferro, rame o cerio, perossidi (26) (27) (28) (29) (30) (31). Il maggior grado di conducibilità è stato tuttavia ottenuto utilizzando FeCl₃ come agente ossidante (32) (33) (34) (17). Per tale motivo il cloruro ferrico è stato definito come il miglior ossidante chimico, e l'acqua appare come il miglior solvente per l'ottenimento di un polimero avente una buona conducibilità. La stechiometria della reazione è riportata di seguito:



Il miglior rapporto molare iniziale Fe(III)/pirrolo per la polimerizzazione a partire da una soluzione di FeCl₃ acquoso a 34-36°C è compreso tra 2,25 e 2,33 (19) (35). Durante la polimerizzazione chimica del pirrolo, l'elettroneutralità della matrice polimerica è conservata incorporando anioni della soluzione di reazione. I controioni sono generalmente gli anioni degli ossidanti chimici, oppure i prodotti di riduzione degli ossidanti stessi.

La riduzione della temperatura di reazione durante la polimerizzazione del monomero ha avuto un impatto positivo sulla conducibilità risultante del

materiale. Tale aspetto può essere spiegato con l'allungamento della catena polimerica che contiene un minor numero di difetti, e quindi oggettiva un maggior grado di coniugazione (36) (37). Inoltre la reticolazione attraverso la posizione β sull'anello pirrolico rende il Ppy conduttivo nella sua forma ossidata con conseguente creazione di una carica positiva ogni 3-4 unità ripetitive lungo il background del polimero; essa viene compensata dall'anione della molecola ossidante. Oltre che dalla temperatura, anche in questo caso fattori come la natura del solvente, il tempo di reazione, la natura e la concentrazione dell'agente ossidante influenzano in maniera decisiva il potenziale di ossidazione della soluzione, e quindi la conducibilità del polipirrolo sintetizzato chimicamente. L'analisi elementare ha dimostrato che la composizione del polipirrolo elettrosintetizzato è identica a quella del polimero sintetizzato mediante ossidazione chimica (17).

1.4.3 Politiofene

Nonostante la somiglianza strutturale del monomero tiofenico al pirrolo, rispetto al quale differisce solamente per la natura dell'eteroatomo, il tiofene può andare incontro facilmente a sostituzione nella posizione 3. Questo permette di modulare solubilità e processabilità, stereoregolarità, estensione della coniugazione, comportamento redox e conducibilità (38).

Il politiofene (PTh) è un polimero π -coniugato che possiede una notevole versatilità strutturale e stabilità ambientale, sia nello stato neutro che in quello dopato, e ciò lo rende particolarmente interessante per diverse applicazioni. Nello specifico, rilevante attenzione è stata dedicata da parte di numerosi gruppi di ricerca alla sintesi di nuovi polimeri tiofenici recanti funzionalizzazioni in posizione β .

Tuttavia, l'inserimento di un sostituente nella posizione β del monomero non deve pregiudicare né la sua polimerizzabilità né le principali caratteristiche funzionali del materiale risultante, quali conducibilità elettrica e proprietà elettrochimiche ed ottiche. Pertanto è necessario valutare in maniera preventiva gli effetti strutturali (induttivi, mesomerici e sterici) dovuti alla presenza del sostituente sull'anello tiofenico (39).

Anche se i fattori sterici non influenzano significativamente il potenziale di ossidazione del monomero, essi esercitano comunque un notevole effetto sulla struttura e sulle proprietà del polimero sostituito e, in alcuni casi estremi, anche sulla reazione di elettropolimerizzazione. Diversi sono i casi descritti in letteratura in cui la distorsione del backbone coniugato causato da interazioni steriche tra i sostituenti di unità monomeriche adiacenti ha comportato una diminuzione del grado di coniugazione del polimero, con conseguente diminuzione della conducibilità del polimero dopato. L'elevata conduttività del politiofene regio regolare è, infatti, una conseguenza della sua capacità di autoassemblarsi in aggregati planari ordinati, e ciò viene pregiudicato da sostituenti con significativi requisiti sterici.

Le vie di sintesi tradizionali incorporano diversi regioisomeri nella struttura polimerica, e ciò ha negative conseguenze nella conduttività del polimero risultante. I primi tentativi per ovviare a questi inconvenienti sono stati fatti mediante sintesi regioselettive che possono modulare il coupling tra i monomeri sostituiti. Le interazioni possono essere di tipo testa-testa, coda-coda e testa-coda.

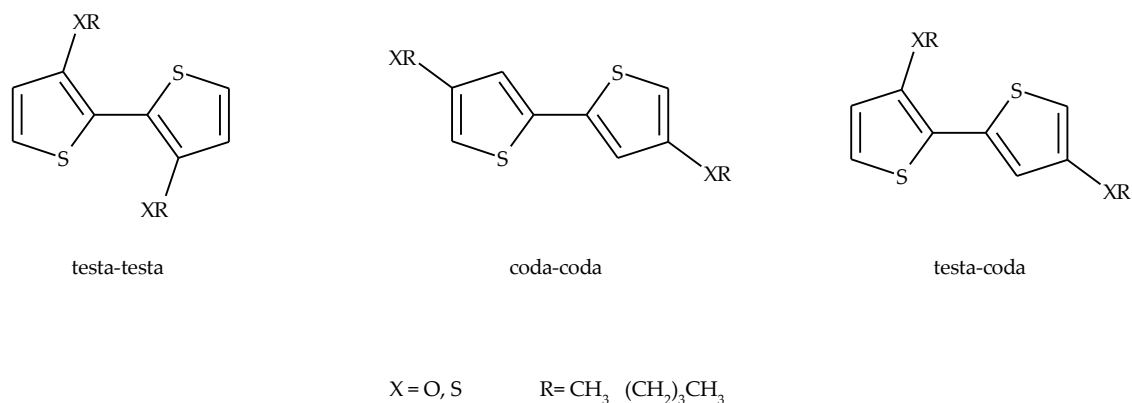


Figura 1.14 Interazioni tipiche tra monomeri tiofenici sostituiti.

La sintesi di polimeri regioregolari viene realizzata tramite cross-coupling con catalizzatori a base di Ni o di Pd.

McCullough et al. hanno sviluppato un protocollo di coupling che utilizza derivati di organomagnesio; in tal modo si ottiene un prodotto testa-coda con una percentuale > 98%. Qualche anno dopo Rieke et al. riportarono un protocollo che fa impiego di derivati di organozinco e, successivamente, dapprima Stille mise a punto un approccio che faceva impiego di composti di organo-stagno, e poi Suzuki ne realizzò uno che impiegava organoborani. Queste vie sintetiche hanno tutte permesso la formazione di polimeri altamente conduttivi grazie alla notevole regioselettività del catalizzatore volta per volta utilizzato (40) (25).

Ovviamente, la presenza di un sostituito sull'anello tiofenico produce, oltre ad effetti sterici, anche degli effetti elettronici. Gruppi fortemente elettrone-attrattori (es. carbossilici ed aldeidici) inducono un aumento del potenziale di ossidazione dell'unità monomerica, rendendo più difficoltosa la polimerizzazione. In questo modo, infatti, si andrebbero a formare radicali cationi assai reattivi che privilegiano altre reazioni (ad esempio, con le specie presenti nel sistema solvente) rispetto a quelle (di accoppiamento) che

porterebbero alla crescita del polimero. Anche monomeri alo-sostituiti hanno difficoltà a polimerizzare e, ove lo facciano, portano alla formazione di polimeri scarsamente conduttivi. La causa di tale comportamento, come riportato da Roncali, è dovuta alla combinazione di fattori elettronici e sterici (39).

Al contrario la presenza di sostituenti elettron-donatori produce un decremento del potenziale di ossidazione rispetto a quello relativo al monomero non funzionalizzato e dunque alla più facile stabilizzazione delle specie radicaliche prodotte. Questi radicali possono quindi diffondere dalla superficie dell'elettrodo e formare oligomeri solubili. Monomeri sostituiti con gruppi tioalchilici o alcossidici sono stati polimerizzati mediante sintesi chimica. Tuttavia, i derivati tioalchilici hanno portato a polimeri meno conduttivi rispetto a quelli ottenuti dalla polimerizzazione dei monomeri non sostituiti. Nel caso degli alcossitiofeni, l'effetto elettron-donatore del gruppo alcossile induce un decremento del potenziale di ossidazione del monomero che stabilizza il risultante radicale prodotto e favorisce la formazione di corte catene oligomeriche solubili (39). Anche il 2,2'-bitiofene è stato ampiamente utilizzato in passato per la sintesi di PTh sostituiti, soprattutto per cercare di far diminuire l'elevato potenziale di ossidazione del tiofene non sostituito. Infatti esso è in grado d'indurre, contemporaneamente all'ossidazione del monomero, la sovraossidazione delle catene polimeriche formate. In tal modo si formano gruppi funzionali sulla catena polimerica in crescita, ed essi portano ad una riduzione o – al limite - ad una totale interruzione della coniugazione del sistema di elettroni π , con perdita significativa della conducibilità del polimero. Tra i vari monomeri tiofenici il 3,4-etilendiossiofene (EDOT) è quello che ha ottenuto maggiore successo dal punto di vista applicativo, soprattutto nell'ambito biosensoristico, poiché la presenza di due atomi di ossigeno direttamente collegati agli anelli tiofenici ne permette l'ossidazione a potenziali

particolarmente bassi. Quest'aspetto, unito alla simmetria della molecola e allo scarso ingombro sterico dell'anello condensato, porta alla formazione di un polimero, il poli(3,4-etilendiossitiotefene) (PEDOT), caratterizzato da un'elevata conducibilità. Come ulteriore vantaggio l'EDOT, grazie alla polarità conferita dall'anello condensato, consente la polimerizzazione anche in soluzione acquosa, cioè nello stesso mezzo solvente dove il sensore è più spesso utilizzato. Tutte queste caratteristiche, insieme all'altissima stabilità elettrochimica, giustificano il grande successo che il PEDOT ha ottenuto in molte applicazioni elettroanalitiche (9).

Anche la sintesi dei politiofeni può essere realizzata attraverso metodi chimici o per ossidazione elettrochimica, quest'ultima si lascia preferire ove s'intenda modificare una superficie elettrodica con tale polimero conduttore. La crescita del film per via elettrochimica è favorita sia dalla conducibilità elettrica del polimero p-dopato in fase di crescita, che dalla più semplice ossidazione elettrochimica delle catene oligomeriche rispetto al monomero di partenza.

La deposizione elettrochimica di polimeri conduttori è un processo unico che procede attraverso una prima nucleazione e una fase di crescita della catena polimerica ed è caratterizzata dall'ossidazione dei monomeri tiofenici neutri sulla superficie dell'elettrodo. Le fasi successive sono oggetto di numerosi studi, in quanto il meccanismo di polimerizzazione non è ancora noto con sufficiente precisione.

Un aspetto importante è che la reazione di elettropolimerizzazione procede seguendo una specifica stechiometria elettrochimica che coinvolge un numero di moli di elettroni n pari a 2,07-2,5 $F \cdot \text{mol}^{-1}$ per unità tiofenica. Anche in questo caso l'ossidazione richiede 2 elettroni per unità monomerica, mentre l'eccesso di carica viene coinvolto nel processo di doping del polimero (39).

Per quanto riguarda l'elettrodeposizione dei politiofeni sono stati proposti differenti meccanismi che ipotizzano due tipi di nucleazione, quella istantanea e quella progressiva, e tre tipi di crescita della catena polimerica (monodimensionale, bidimensionale e tridimensionale).

In caso di nucleazione istantanea, il numero di nuclei si mantiene costante nel tempo, ed essi danno luogo ad accrescimento della catena senza formazione di ulteriori nuclei, mentre nel caso di nucleazione progressiva i nuclei vengono generati in continuazione.

La crescita monodimensionale avviene in un'unica direzione, perpendicolare alla superficie dell'elettrodo, mentre in quella bidimensionale i nuclei si combinano preferibilmente in direzione parallela all'elettrodo. Per quanto riguarda invece l'accrescimento tridimensionale, le catene si allungano sia in direzione parallela che in direzione perpendicolare alla superficie dell'elettrodo. Sulla base di tali principi generali, in letteratura (41) vengono riportati due modelli che possono descrivere la nucleazione e l'accrescimento dei polimeri conduttori.

Il primo meccanismo di elettropolimerizzazione prevede un primo step in cui il monomero è adsorbito sulla superficie dell'elettrodo ed ossidato ad un adeguato valore di potenziale. Il processo successivo, riguardante la propagazione della catena sulla superficie dell'elettrodo ipotizza che l'unità monomerica ossidata venga legata come unità terminale del polimero. Secondo questo schema la propagazione avviene in maniera tridimensionale o bidimensionale.

Un ulteriore meccanismo proposto presuppone che il composto di partenza venga ossidato vicino alla superficie dell'elettrodo portando alla formazione di oligomeri solubili nello strato di diffusione in prossimità dell'elettrodo. La

successiva saturazione dello strato di diffusione da parte degli oligomeri comporta la nucleazione e la crescita dei polimeri conduttori.

Tutti i recenti studi pubblicati in letteratura escludono un semplice meccanismo di propagazione della catena per la formazione di polimeri conduttori. Piuttosto si presuppone che l'elettropolimerizzazione coinvolga tre diverse fasi:

- l'ossidazione del monomero all'elettrodo e la formazione di oligomeri solubili preferibilmente nello strato di diffusione durante lo step di dimerizzazione;
- la deposizione degli oligomeri, che coinvolgono processi di nucleazione e di crescita;
- la polimerizzazione in stato solido, che produce catene più lunghe e materiali reticolati.

Anche quando è utilizzato lo stesso monomero, molti fattori sperimentali scelti per l'elettrodeposizione del polimero influenzano non solo le caratteristiche strutturali e morfologiche del film prodotto, ma anche le sue caratteristiche chimiche. Ad esempio, la temperatura condiziona non solo la velocità globale del processo ma permette d'orientare la reazione, in termini di energia di attivazione, verso un possibile cammino di reazione rispetto ad un altro ed influenza anche la solubilità degli oligomeri in crescita. Inoltre, il percorso di reazione è condizionato da una serie di variabili aggiuntive, tra cui la concentrazione del monomero e la natura del solvente e dell'elettrolita di supporto. Essi giocano un ruolo di primo piano nel determinare la lunghezza e la struttura del polimero risultante, e il modo in cui le diverse catene interagiscono tra di loro. Questi aspetti sono fondamentali per definire la conducibilità intracatena e intercatena, che influenzano il band gap del polimero e la propagazione di carica su tutto il film (9).

1.4.3.1 Metodi di sintesi.

In letteratura sono stati proposti due diversi approcci per la polimerizzazione del tiofene:

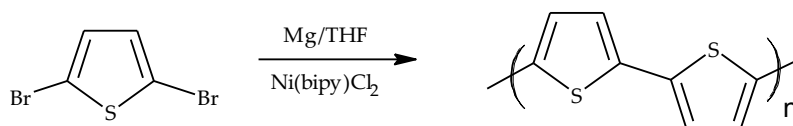
- reazione chimica (coupling catalizzato da metalli o polimerizzazione per ossidazione chimica (42);
- elettropolimerizzazione;

che verranno descritte con maggior dettaglio nei paragrafi successivi.

Sintesi chimica.

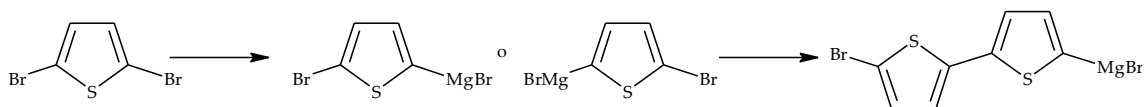
I PTh possono essere sintetizzati attraverso due procedure che prevedono in un caso l'impiego di metalli di transizione come catalizzatori, e nell'altro una polimerizzazione per ossidazione.

I metalli di transizione catalizzano le reazioni che coinvolgono monomeri tiofenici dialogenati in posizione 2 e 5 (43). Una delle prime sintesi del politiofene non sostituito risale al 1980 ad opera di due gruppi di ricerca differenti (Yamamoto et. Al., e Liu et al.) (44) (45). In entrambi i casi la procedura di sintesi del polimero prevede una policondensazione del 2,5-dibromotiofene catalizzata da un complesso metallico. La sintesi di Yamamoto è condotta con Mg in tetraidrofurano (THF) in presenza del catalizzatore Ni(bipy)Cl₂ (bipy = 2,2'-bipiridina).



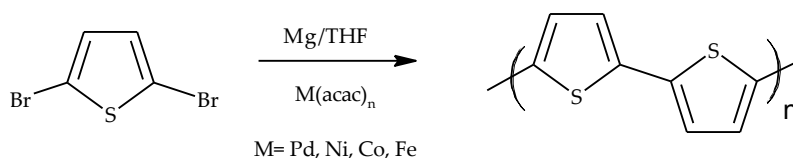
Il Mg reagisce con uno dei due atomi di bromo portando alla formazione del corrispondente reattivo di Grignard in posizione 2 o 5 che - per reazione di

accoppiamento catalizzata dal complesso di Ni(II) - porta alla formazione di un dimero tiofenico con un gruppo -MgBr ed un atomo di Br.



La propagazione della reazione prosegue formando film polimerici a basso peso molecolare. La polimerizzazione è un'estensione della reazione di coupling di Kumada (46) degli alogenuri arilici con i reattivi di Grignard. Il prodotto, un polimero a basso peso molecolare, possiede una scarsa conducibilità ed una scarsa solubilità in THF (che è il solvente comunemente utilizzato per questa reazione), e quest'ultima caratteristica preclude la possibilità di accedere per questa via a polimeri ad elevato peso molecolare.

Risultati simili sono stati ottenuti da Lin e Dudek (47) utilizzando come catalizzatori $M(\text{acac})_2$ ($M = \text{Pd}, \text{Ni}, \text{Co}, \text{Fe}$; acac = acetilacetato).

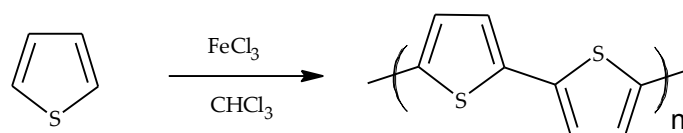


Studi effettuati variando le condizioni operative (es: quantità di Mg, natura del solvente e del metallo (Mg, Zn), la concentrazione di monomero, natura dell'alogeno legato al monomero, la temperatura, il tempo di reazione e il tipo di catalizzatore usato) hanno permesso di ottimizzare le caratteristiche chimiche e funzionali di questi polimeri (48).

Un lavoro condotto in riferimento alla reazione di Yamamoto nella policondensazione dei 2,5-dialotiofeni ha mostrato una resa quantitativa a partire dal 2,5-dibromotiofene, in presenza di $\text{Ni}(\text{cod})_2$ (cod = bis(1,5-cicloottadiene)) e PPh_3 (PPh_3 = trifenilfosfina) a 60-80°C in DMF (48).

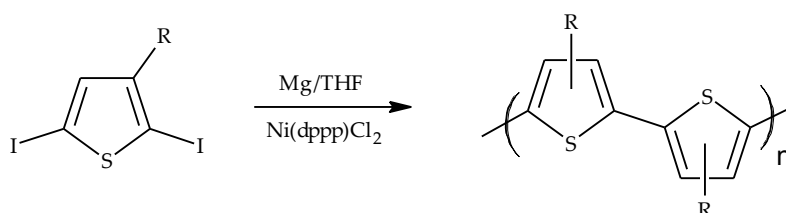
Per quanto riguarda la procedura di sintesi che impiega agenti ossidanti, per diversi anni la polimerizzazione con FeCl_3 è stata la tecnica maggiormente impiegata.

La prima sintesi con tale agente ossidante si deve a Sugimoto e Yoshino che misero a punto la seguente reazione:



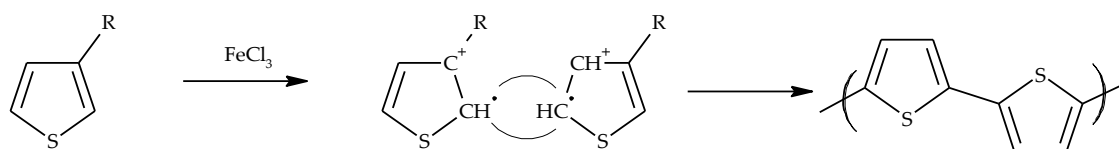
In cui il tiofene disciolto in cloroformio era polimerizzato per via ossidativa con FeCl_3 (48).

Per quanto riguarda la sintesi dei poli-(3-alciltiofeni), la polimerizzazione venne effettuata secondo il cross-coupling di Kumada, secondo uno schema analogo a quello impiegato per i politiofeni non sostituiti. Le varianti sono rappresentate dalla natura di alogenuri e del catalizzatore:



Un'ulteriore strategia di sintesi, analoga a quella vista per i tiofeni non sostituiti, è quella che vede l'impiego di agenti ossidanti come il FeCl_3 , MoCl_5 , RuCl_3 . I polimeri preparati con FeCl_3 presentavano un peso molecolare compreso tra 30.000 e 300.000 Da (48) (38).

La reazione avviene per coupling 2,5' delle unità tiofeniche, che consiste nell'ossidazione dei 3-alciltiofeni a radicali cationi seguita dalla propagazione di catena (38).



Se da una parte questi metodi consentono un maggiore controllo sintetico, riducendo o eliminando le interazioni tra gli atomi di carbonio dei monomeri tiofenici adiacente nelle posizioni 2 e 4 (legame α - β) durante l'accrescimento della catena, essi tuttavia non risolvono il controllo regiochimico (49).

La prima polimerizzazione regiospecifica è attribuibile a McCullough e Lowe (50) e risale al 1992. Si tratta di una reazione in un unico stadio a partire dal 2-bromo-3-alciltiofene, il quale subisce una reazione di litiazione regioselettiva e da una successiva produzione *in situ* del reattivo di Grignard. La successiva polimerizzazione avviene in presenza di un catalizzatore di Ni(II) ovvero Ni(dppe)Cl₂. Circa il 98% del polimero prodotto appare essere regioregolare secondo una sequenza testa-coda-testa-coda(HT-HT). Il poli(3-alciltiofene) possiede inoltre proprietà di conducibilità elettrica, cristallinità e ottica non lineare migliori rispetto ai corrispondenti polimeri regiorandom.

Rieke et al. (51) hanno sviluppato un'altra procedura sintetica per la sintesi di politiofeni regioregolari per reazione con 2,5-dibromo-3-alciltiofene con Zn altamente reattivo che porta ad un intermedio metallato avente elevata regiospecificità; mediante trattamento successivo con il catalizzatore di cross-coupling NiCl₂(dppe) si ottiene il poli(3-alciltiofene) regioregolare HT-HT.

Sintesi elettrochimica.

Nonostante i progressi raggiunti dalla sintesi chimica, fino ad ora i polimeri tiofenici con le migliori proprietà di coniugazione e di conduttività sono stati preparati mediante polimerizzazione elettrochimica (39).

Oltre all'elettropolimerizzazione anodica del monomero, che è il metodo maggiormente impiegato per la sintesi dei politiofeni coniugati, PTh può essere preparato per elettroriduzione del (2-bromo-5-tienil)trifenilnicelbromuro in acetonitrile. Questo metodo - inizialmente proposto per la sintesi di poli(p-fenilene) - è stato esteso ai PTh. Il principale svantaggio di questo metodo è che il polimero è prodotto in forma neutra, e ciò porta rapidamente a una passivazione dell'elettrodo, limitando lo spessore dei film polimerici a circa 100 nm (39).

L'elettropolimerizzazione anodica del monomero presenta vari vantaggi rispetto alla sintesi chimica, quali l'assenza di catalizzatore, la deposizione diretta del polimero conduttivo sulla superficie dell'elettrodo, la facilità di controllo dello spessore, nonché la possibilità di eseguire una prima caratterizzazione del processo di crescita del polimero direttamente *in situ*.

L'elettropolimerizzazione del ditiofene venne menzionata per la prima volta nel 1980 e, da allora, un gran numero di studi si sono avvicinati nella definizione delle condizioni di tale elettrosintesi. Infatti natura del solvente, il suo grado di anidricità, la temperatura, la concentrazione del monomero e la natura e la concentrazione dell'elettrolita di supporto possono influenzare in maniera decisiva le proprietà del polimero (39).

L'intero meccanismo dell'elettropolimerizzazione non è noto con accuratezza, anche se si suppone che la reazione avvenga secondo uno schema analogo a quello riportato in Fig. 1.15, secondo il quale durante il primo step ossidativo si genera un radicale catione, che subisce un processo di coupling e successiva deprotonazione a dare ditiofeni. Essi, elettroattivi al potenziale di lavoro, reiterano il ciclo, determinando la crescita e la deposizione del film polimerico sull'elettrodo lavorante.

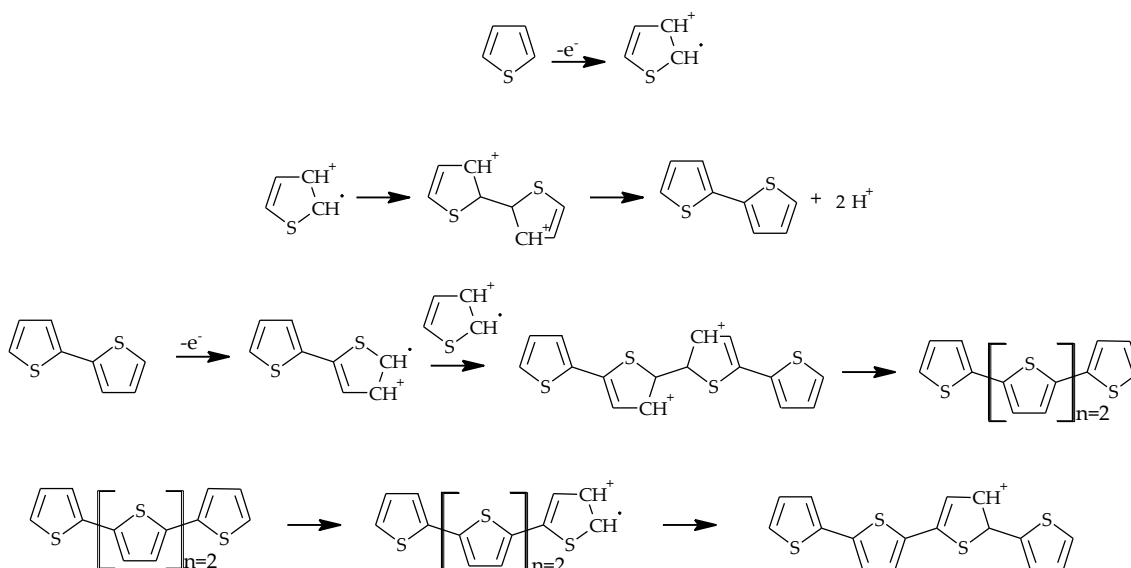


Figura 1.15 Meccanismo di polimerizzazione del tiofene.

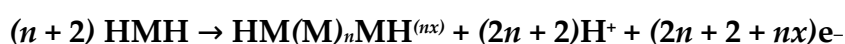
In base alla struttura molecolare, l'ossidazione elettrochimica di tiofeni e oligotiofeni porta alla formazione di radicali cationi stabili che reagiscono come intermedi per la propagazione del processo di polimerizzazione. La tecnica elettrochimica utilizzata per la polimerizzazione è la voltammetria ciclica (CV) oppure la cronoamperometria, con formazione dei polimeri conduttori a partire da uno step iniziale in cui si osserva la formazione di radicali cationi, e che coincide con una fase cosiddetta di nucleazione durante la quale il film inizia a formarsi. Questo processo può essere seguito attraverso CV, facendo ciclare il potenziale elettrochimico tra valori prossimi al potenziale di ossidazione del monomero fino al potenziale di riduzione del polimero così generato.

PTh è stato depositato con successo su un elettrodo di Pt, a partire da una soluzione concentrata di monomero tiofenico in acetonitrile. Le proprietà del film in questo sistema solvente sono state ampiamente studiate, e si è accertato che – tra le possibili condizioni operative - la natura del controione influenza principalmente le proprietà elettrochimiche del film. Il potenziale di

ossidazione è generalmente uguale a +1,7 V rispetto ad Ag/AgCl in CH₃CN/Bu₄NPF₆ 0.1 M, e questo rende particolarmente complessa la polimerizzazione del monomero, in quanto il film diviene suscettibile di processi di sovraossidazione.

Nel 1995, Shi et al. (52) riuscirono ad effettuare la polimerizzazione a potenziali sensibilmente meno anodici, operando a circa +1,3 V vs Ag/AgCl, in una soluzione di monomero in borofluoroetilene (BFEE), tuttavia il meccanismo di questo processo non è noto con certezza.

E' stato osservato in diverse circostanze (53) che la formazione del polimero richiede un consumo di carica pari a 2 F·mol⁻¹ (ovvero due elettroni per molecola di monomero) e la carica addizionale è impiegata per la parziale e reversibile ossidazione del film polimerico. La formazione del film e la sua ossidazione avvengono contemporaneamente, perché il potenziale di ossidazione del monomero è spesso più elevato del potenziale redox relativo al doping del polimero. La reazione completa può essere descritta come segue:



Dove HMH è il monomero presente in soluzione, (2n + 2) indica il numero di elettroni coinvolti nella reazione, e nx è il numero di elettroni necessario per il doping del film polimerico. La carica parziale x rappresenta il livello di doping, ed è generalmente compresa tra 0,2 e 0,3. Questo significa che una carica positiva è delocalizzata tra tre e cinque anelli tiofenici. Sperimentalmente infine è stato stimato che il livello di doping può essere calcolato sulla base delle valutazioni della carica (Q_d) che passa nel sistema elettrosintetizzato e quella inerente il processo redox di doping e dedoping del polimero (Q_r), ove si supponga una resa della polimerizzazione del 100% (53):

$$x = 2Q_r / (Q_d - Q_r)$$

Inoltre in elettroanalisi sono stati proposti diversi derivati politiofenici nella costruzione di sensori (determinazione di specie organiche e ioni metallici), oppure ancora come componenti delle lingue elettroniche.

1. **Cosnier S.** Anal. Bioanal. Chem. 2003, Vol. 377, pp. 507-520.
2. **Lange U. et. al.** Anal. Chim. Acta. 2008, Vol. 614, pp. 1-26.
3. **Camurlu P.** RSC Adv. 2014, Vol. 4, pp. 55832-55845.
4. **Guimarda N. K. et. al.** Prog. Polym. Sci. 2007, Vol. 32, pp. 876-921.
5. **Levi M. D. et al.** Journal of Power Sources. 2008, Vol. 180, pp. 902-908.
6. **Bredas J. L. et al.** Acc. Chem. Res. 1985, Vol. 18, pp. 309-315.
7. **Dai L.** Conducting Polymers. Intelligent Macromolecules for Smart Device from Materials Synthesis to Device application. s.l. : Springer, 2004, Vol. XVI.
8. **Tourillon G.** Polythiophene and its derivatives. Handbook of Conducting polymers. New York : Marcel Dekker, 1986, Vol. 1, pp. 293-350.
9. **Zanardi C. et al.** Anal. Bioanal. Chem. 2013, Vol. 405, pp. 509-531.
10. **Dhand C. et al.** Biosensors and Bioelectronics. 2011, Vol. 26, 6, pp. 2811-2821.
11. **Ramanavčius A. et. al.** Electrochimica Acta. 2006, Vol. 51, pp. 6025-6037.
12. **Angeli A.** Gazz. Chim. Ital. 1916, Vol. 46, pp. 279-283.
13. **Diaz A. F. et al.** J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, pp. 635-636.
14. **Street G.** Handbook of conducting polymers. s.l. : Marcel Dekker, 1986, pp. 265-291.
15. **Kern J. M. et al.** Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. 1989, pp. 657-658.
16. **Hernandez R. et al.** The Journal of Physical Chemistry. 1984, Vol. 88, pp. 3333-3337.
17. **Omastová M. et al.** Chemical Papers. 2012, Vol. 66, 5, pp. 392-414.
18. **Viau L. et al.** Electrochimica Acta. 2014, Vol. 137, pp. 298-310.
19. **Ansari R.** Journal of Chem. 2006, Vol. 3, 4, pp. 186-201.

20. **Waltman R. J. et al.** J. Chem. 1986, Vol. 64, pp. 76-95.
21. **Imisides M. D. et al.** Electroanalysis. 1991, Vol. 3, pp. 879-884.
22. **Cheung K. M. et al.** Polymer. 1988, Vol. 29, pp. 1709-1711.
23. **Sadki S. et al.** Chem.Soc. Rev. 2000, Vol. 29, pp. 283-293.
24. **Gros P.** Electrochim. Acta. 2000, Vol. 46, pp. 643-650.
25. **Higashimura H.** Oxidative Coupling Reaction. Polymer Science: a Comprehensive Reference. s.l. : Matyjaszewski M. and Moller M., 2012, Vol. 5, pp. 141-173.
26. **Street G. B.** Polypyrrole from powers to plastics. [aut. libro] Marcel Dekker. Handbook of Conducting Polymers. New York : Skotheim T. A., 1986, Vol. 1, pp. 265-291.
27. **Rapi S. et al.** Synthetic Metals. 1988, Vol. 24, pp. 217-221.
28. **Castillo-Ortega M. M. et al.** Synthetic Metals. 1989, Vol. 28, pp. 165-170.
29. **Planche M.F.** Journal of Applied Polymer Science. 1994, Vol. 52, pp. 1867-1877.
30. **Omastová M.** Synthetic Metals. 2010, Vol. 160, pp. 701-707.
31. **Saravanan C. et al.** Macromolecular Chemistry and Physics. 2006, Vol. 207, pp. 342-348.
32. **Pron A.** The Journal of Chemical Physics. 1985, Vol. 83, pp. 5923-5927.
33. **Myers R. E.** Journal of Electronic Materials. 1986, Vol. 15, pp. 61-69.
34. **Wallace G. G. et al.** Conductive electroactive polymers: intelligent materials systems. 2. Boca Raton, FL USA : CRC Press., 2003, pp. 51-88.
35. **Dhawan S S. J.** Bull. Mater. Sci. 1993, Vol. 16, 5, pp. 371-380.
36. **Saville P.** Polypyrrole Formation and Use, DRDC Atlantic TM. 2005.
37. **Chen X. B. et al.** Polymer Engineering & Science. 1995, Vol. 35, pp. 642-647.
38. **Manca P.** Tesi di Dottorato XXII ciclo. s.l. : Università degli Studi di Sassari.
39. **Roncali J.** Chem. Rev. 1992, Vol. 92, pp. 711-717.
40. **Roncali J.** Chem. Rev. 1997, Vol. 97, pp. 173-205.
41. **Heinze J. et al.** Chem. Rev. 2010, Vol. 110, pp. 4724-4771.
42. **Liu R. C. et al.** Chinese Sci. Bull. 2009, Vol. 54, pp. 2028-2032.
43. **Chujo Y.** Coniugated polymer synthesis. s.l. : Wiley VCH, 2010.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

44. Yamamoto T. et al. J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. 1980, Vol. 18, pp. 9.
45. Lin J. W.P. et al. J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed. 1980, Vol. 18, pp. 2869.
46. Kumada M. et al. J. Am.Chem. Soc. 1972, Vol. 94, 12, pp. 4374–4376.
47. Lin J. W. P. and Dudek L. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1980, Vol. 18, pp. 2869-2873.
48. Fichou D. Handbook of oligo and polythiophene. s.l. : Wiley-VCH, 1999.
49. Chujo Y. Coniugated polymer synthesis: Methods and Reactions. s.l. : Wiley-VCH, 2010.
50. McCullough R. et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1992, pp. 70-72.
51. Rieke R. D. et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, Vol. 117, 1, pp. 233-244.
52. Shi G. Q. et al. Science. 1995, Vol. 267, pp. 994-996.
53. Blanchard P., Cravino A., Levillain E. Electrochemistry of Oligothiophenes and Polythiophenes. [book auth.] Perepichka I.F. Handbook of thiophene based materials. s.l. : John Wiley and Sons Ltd, 2009, pp. 419-449.

Capitolo 2

PARTE SPERIMENTALE, RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1 Tecniche elettroanalitiche

2.1.1 Voltammetria ciclica.

La voltammetria ciclica (CV) è forse la tecnica elettroanalitica più versatile per lo studio di specie elettroattive. Questa sua dote, unitamente alla facilità di misura, ha portato ad un ampio uso della CV nel campo dell'elettrochimica, della chimica inorganica, organica e della biochimica. La voltammetria ciclica è spesso la prima forma di caratterizzazione elettrochimica di un composto, di un materiale biologico oppure ancora della superficie di un elettrodo. Consiste nell'applicare una rampa (solitamente lineare) di potenziali ad un opportuno elettrodo lavorante, immerso in una soluzione quiescente. Opportune inversioni del senso di scansione del potenziale permettono di ottenere un responso corrente-tensione che solitamente è informativo delle caratteristiche redox del sistema considerato. Lo strumento che presiede all'imposizione del potenziale controllato sull'elettrodo lavorante è un potenziostato ed utilizza una configurazione a tre elettrodi. L'elettrodo di lavoro è cortocircuitato sia con un elettrodo di riferimento (comunemente a calomelano saturo o Ag/AgCl) nell'ambito di un circuito potenziometrico, sia con un controelettrodo altamente polarizzabile (grafite, Pt, Hg) in un circuito amperometrico in cui fluisce la quasi totalità della corrente generata dall'esperimento.

Solitamente la rampa di potenziali è applicata a partire da un potenziale (prossimo al potenziale nernstiano del sistema) ove non si registra alcun sostanziale passaggio di corrente, e da lì muovendosi in direzione della porzione della finestra catoanodica d'interesse. Solitamente l'inversione del

verso di scansione avviene immediatamente dopo aver travalicato un picco di corrente, associabile a processi di tipo faradico. A questo punto la polarità di scansione viene invertita lasciando generalmente immutato il modulo. L'elettrodo lavorante è così sfruttato dapprima come anodo e, invertendo la polarità, come catodo (o viceversa, se si vuole prima ridurre la specie elettroattiva). Il responso che si ottiene è una curva corrente/tensione, detta voltammogramma. La morfologia del voltammogramma risultante sarà quindi indicativa del grado di reversibilità del processo elettromotore, della sua elettronicità in quelle condizioni, e permetterà di stimare ad esempio grandezze come il potenziale formale della coppia redox ed il campo di stabilità redox della specie presente in soluzione.

I parametri più indicativi di un voltammogramma sono le ampiezze del picco di corrente anodica (i_{pa}) e di corrente catodica (i_{pc}), il potenziale di picco anodico (E_{pa}) e il potenziale di picco catodico (E_{pc}).

Una coppia redox in cui entrambe le specie scambiano rapidamente elettroni con l'elettrodo di lavoro è definita elettrochimicamente reversibile. Il potenziale di riduzione formale (E^0) è quello medio tra E_{pa} e E_{pc} .

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (\text{equazione 1})$$

Il numero di elettroni (n) trasferiti nel corso della reazione per un processo reversibile può essere determinato dalla separazione tra i potenziali di picco:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{0,059}{n} \quad (\text{equazione 2})$$

I voltammogrammi permettono di osservare rapidamente il comportamento redox in un ampio intervallo di potenziali.

La corrente di picco per un sistema reversibile è descritta dall'equazione di Randles-Sevcik:

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

$$i_p = (2,69 * 10^5) * n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \text{ (equazione 3)}$$

Dove i_p è la corrente del picco, n il numero degli elettroni, A è l'area dell'elettrodo (cm^2), D è il coefficiente di diffusione ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), C è la concentrazione della specie ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e v è la velocità di scansione ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$).

Nel caso di fenomeni di quasi reversibilità elettrochimica si osserva un lento scambio di elettroni tra le specie redox e l'elettrodo di lavoro. In questo caso le equazioni viste in precedenza non sono applicabili, ed i responsi sono caratterizzati da una separazione tra i potenziali di picco superiore a quella indicata dall'equazione 2. La quasi reversibilità può sfumare progressivamente in situazioni di completa irreversibilità, caratterizzata dalla sostanziale assenza del picco associato al processo elettromotore principale.

La corrente faradica che fluisce in ogni momento all'interno di una cella è una misura diretta della reazione elettrochimica che avviene all'elettrodo. Inoltre, la stessa corrente dipende da due fattori: la velocità con cui il materiale passa dalla soluzione all'elettrodo, regolata dalle leggi di trasporto di massa, e la velocità alla quale gli elettroni possono essere scambiati sulla superficie elettrodica. Questi due processi influenzano il flusso di corrente. Il trasporto della massa verso la superficie dell'elettrodo può avvenire fondamentalmente attraverso tre meccanismi: diffusione, migrazione e convezione.

Il movimento di materia in funzione di un gradiente di concentrazione è chiamato diffusione. La velocità di diffusione di tali specie dipende, oltre che dal *gradiente di concentrazione*, anche dal *coefficiente di diffusione* D della sostanza oggetto del fenomeno. Oltre che dalla natura della specie, D varia al variare della temperatura e delle grandezze fluidodinamiche ad esse connesse, come ad esempio la viscosità del sistema solvente. Esistono diversi modelli che regolano i fenomeni diffusivi. Quello della diffusione lineare semiinfinita, che

presuppone un elettrodo piano infinitamente esteso immerso in una soluzione che si estende infinitamente attorno ad esso, riguarda solo diffusioni che avvengono in direzione normale al piano dell'elettrodo. Questo modello è descritto matematicamente dalle due leggi di Fick. La prima garantisce la proporzionalità tra il numero di moli di sostanza che diffonde verso una superficie piana nell'unità di tempo ed il gradiente di concentrazione di tale specie che si muove lungo la direzione normale alla superficie. La seconda legge di Fick esprime la dipendenza della concentrazione dal tempo e dalla distanza dall'elettrodo. La rappresentazione matematica della I e della II legge di Fick è la seguente:

$$\frac{dN}{dt} = D \cdot A \cdot \frac{\partial C(x;t)}{\partial x} \quad (\text{equazione 4})$$

$$\frac{\partial C(x;t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x;t)}{\partial x^2} \quad (\text{equazione 5})$$

dove:

D : coefficiente di diffusione della specie (cm^2s^{-1});

A : area della superficie (cm^2);

$\frac{dN}{dt}$: flusso della specie lungo la direzione normale alla superficie quando $A=1$.

Il movimento di particelle cariche in conseguenza ad un campo elettrico locale prende il nome di *migrazione*. Gli ioni si muovono all'interno della soluzione sotto l'influenza di un gradiente di potenziale elettrico. Il contributo della migrazione al flusso totale di corrente è proporzionale alla carica dello ione, alla concentrazione, al coefficiente di diffusione e all'intensità del gradiente di campo elettrico sperimentato dallo ione.

L'analisi teorica di responsi elettrochimici ottenuti con una determinata tecnica è complicata dalla concomitanza di molteplici fattori che determinano il

trasporto di materia. Gli esperimenti elettrochimici possono essere progettati in modo tale da eliminare i contributi del potenziale elettrostatico e la velocità idrodinamica al flusso generale delle specie elettroattive, limitando così il trasporto della massa al solo contributo della diffusione. Le correnti derivanti da questi esperimenti possono essere per tale motivo classificate a diffusione controllata.

I contributi dovuti alla migrazione possono essere efficacemente eliminati aggiungendo alla soluzione un elettrolita inerte in concentrazione 10 - 100 volte superiore a quella che caratterizza l'analita. In tal modo, gli effetti relativi alla migrazione dell'analita sono fortemente limitati. Infine, contributi convettivi (di natura meccanica o termica) possono essere minimizzati lavorando in soluzioni quiescenti e sostanzialmente termostate.

I solventi utilizzati sono scelti in base alla finestra catoanodica dei potenziali che sono capaci di fornire: CH_2Cl_2 , CH_3CN , DMF forniscono generalmente una finestra sufficientemente ampia per le comuni esigenze elettroanalitiche. L'elettrolita di supporto deve essere chimicamente inerte nei confronti dei partner dei processi elettrodici, solubile nel solvente prescelto e deve possedere un elevato grado di purezza e di anidrit  (ove si operi in solvente non acquoso.), nonch  un'elevata finestra catoanodica di potenziale. Nel caso di solventi polari si possono utilizzare sali inorganici come NaClO_4 oppure NaBF_4 , ma   diffuso l'uso di sali di tetraetilammonio (perclorato, esafluorofosfato, fluoborato) per solventi poco polari.

La voltammetria ciclica fa uso di elettrodi stazionari, generalmente costituiti da metalli come Pt, Au, amalgama Hg/Au, o dischi di carbone vetroso di diametro di circa 2-4 mm, che quindi soggiacciono alle leggi della diffusione lineare semiinfinita. Il tipo di elettrodo lavorante scelto   funzione di numerosi parametri come il tipo di solvente e la natura del depolarizzatore.

2.1.2 Cronoamperometria.

Si tratta di una semplice tecnica elettroanalitica che misura l'intensità della corrente che attraversa l'elettrodo lavorante in funzione del tempo qualora il potenziale passi da un valore $E(t_0)$, al quale non fluisce corrente significativa in soluzione, ad un valore $E(t)$ al quale si ha un tangibile decorso della reazione elettrodica. È particolarmente indicata per indagini di tipo meccanicistico, ad esempio per il calcolo della costante cinetica standard omogenea $K_{s,h}$; ponendosi ad un qualsiasi valore di potenziale tale che, per qualsiasi grado di reversibilità del processo, la concentrazione della specie elettroattiva tenda a zero nel tempo, il processo sarà comunque controllato dalla velocità di diffusione della suddetta specie, e la corrente varierà in funzione del tempo secondo l'equazione di Cottrell:

$$i(t) = n \cdot F \cdot D_0^{1/2} \cdot C_0^b \cdot \pi^{-1/2} \cdot t^{-1/2} \quad (\text{equazione 6})$$

Ove

n : numero di elettroni;

F : costante di Faraday;

C_0^b : concentrazione della specie elettroattiva nel corpo della soluzione;

L'andamento teorico descritto da Cottrell non viene rispettato né a tempi eccessivamente brevi, né a tempi piuttosto lunghi. La finestra di tempo disponibile per le osservazioni, nelle migliori condizioni sperimentali (geometria ottimale della cella e dell'elettrodo) è sempre compresa nell'intervallo tra 20 μ S ÷ 200 S, ma spesso è di 2 o 3 ordini di grandezza più ristretta.

Nel caso in cui la sovratensione applicata non comporti il consumo totale della specie elettroattiva, si distingueranno due casi in funzione della reversibilità del

processo; per una reazione reversibile, l'andamento della corrente è dato dalla relazione:

$$i(t) = \frac{n^*F^*D_0^{1/2} * C_0^b * \pi^{-1/2} * t^{-1/2}}{1 + \left(\frac{D_0}{D_R}\right)^{1/2} \frac{nF}{CRT} * (E - E^0)} \quad (\text{equazione 7})$$

D_0 coefficiente di diffusione della specie ossidata;

D_R coefficiente di diffusione della specie ridotta.

Le curve corrente/tempo che si ottengono saranno parametriche nel valore del potenziale, e per potenziali sufficientemente negativi il denominatore tenderà ad 1 e varrà l'equazione di Cottrell. Inoltre lo stadio lento del processo globale è la diffusione, mentre il rapporto tra la concentrazione della specie ossidata e quella ridotta sull'elettrodo sarà governato dall'equazione di Nernst. Il prodotto $i * t^{1/2}$ è costante, per qualsiasi potenziale imposto all'elettrodo ed è proporzionale all'elettronicità n del processo.

Qualora il trasferimento di carica fosse non reversibile e la sovratensione non sia sufficiente a raggiungere la regione di corrente limite, l'andamento della corrente dipenderà in maniera non semplice dai parametri cinetici di trasferimento di carica e dal potenziale elettrodico.

2.2 Strumentazione e reagenti.

2.2.1 Strumentazione.

Tutte le prove elettrochimiche sono state effettuate su sistema computerizzato AUTOLAB PGSTAT 12 (Echochemie, The Netherlands) interfacciato con un personal computer in ambiente Windows 7, usando il software di gestione NOVA.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (^1H NMR) sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro Bruker Avance III 400 operante a 400 MHz in soluzione di CDCl_3 o CD_2Cl_2 , usando $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ o il segnale residuo del solvente come standard interno.

Il punto di fusione è stato registrato tramite un apparecchio BÜCHI 530.

2.2.2 Reagenti.

I monomeri: pirrolo (98%, Sigma Aldrich), 2,2'-bitiofene (2,2'-BT) (Lancaster), 3,4-etilendiossitiolfene (EDOT) (Sigma Aldrich), 4,4'-dibromo-2,2'-ditiofene ($\text{Br}_2\text{-BT}$) (TCI Chemicals) sono stati utilizzati tali e quali; mentre il 4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis(2-metil-3-butin-2-olo) (4,4'-BiET-BiAlcool-BT), il 4-(4'-bromo-2,2'-bitiofene)-N,N'-difenilnilina (Br-BT-TPA), il 4-(4'-etinil-2,2'-bitiofene)-N,N'-difenilnilina (ET-BT-TPA) ed il 4,4'-bis(4-etinil-carbossifenil)bitiofene (BT-ET-PhCOOH) sono stati sintetizzati da questo gruppo di ricerca.

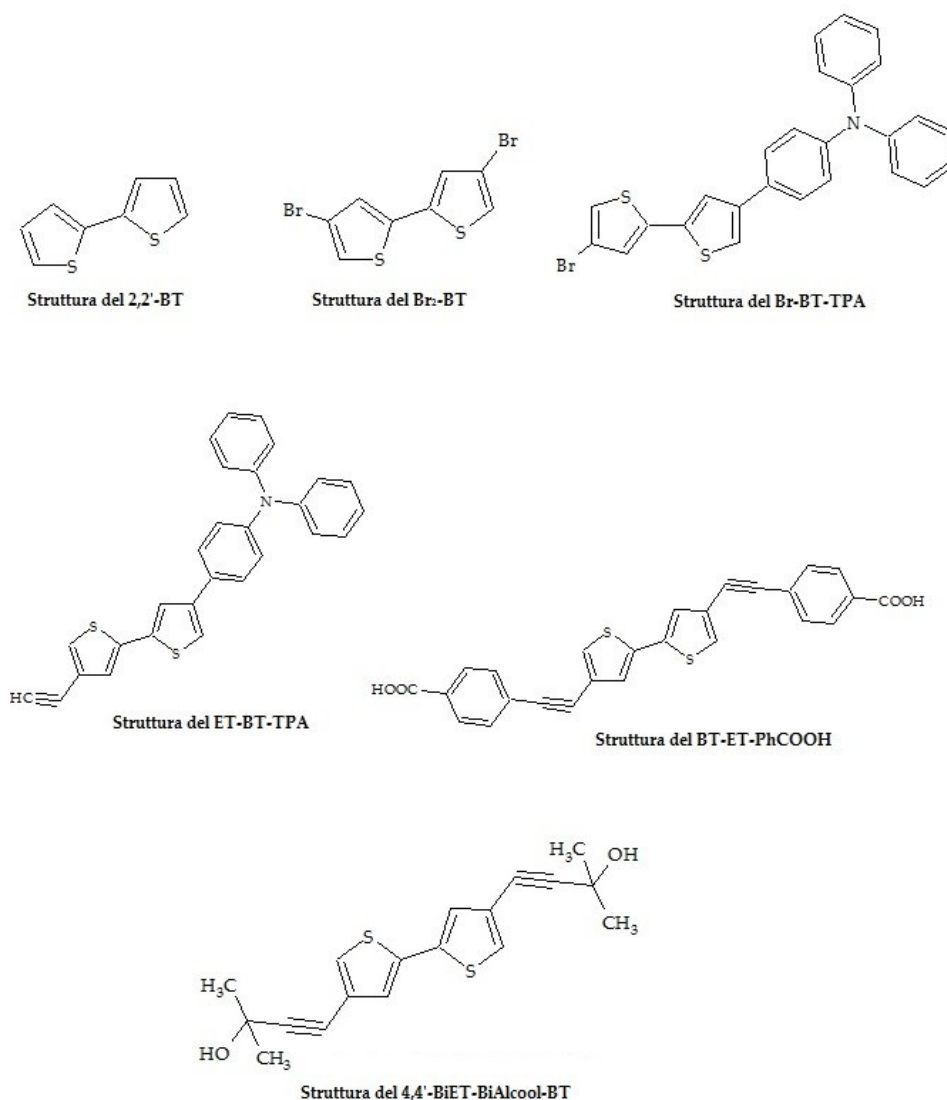


Figura 2.1. Struttura del 2,2'-bitiofene; 4,4'-dibromo-2,2'-bitiofene; 4-(4'-bromo-2,2'-bitiofene)-N,N'-difenililina; 4-(4'-etinil-2,2'-bitiofene)-N,N'-difenililina; 4,4'-bis(4-etinil-carbossifenil)bitiofene; 4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis(2-metil-3-butin-2-olo).

I mediatori redox (ferrocianuro di potassio $K_4[Fe(CN)_6]$, ferricianuro di potassio $K_3[Fe(CN)_6]$ e *p*-benzoquinone) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich.

Gli elettroliti di supporto utilizzati nello studio sono litio perclorato ($LiClO_4$, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich) e tetraetilammonio esafluorofosfato ($TEAPF_6$, Fluka, puriss, electrochemical grade).

Gli enzimi: Aldeide Deidrogenasi (ALDH) (lyophilized powder, 0,8 units/mg), Diaforasi (Diaph) (from *Clostridium kluyveri*, lyophilized powder, 4,5 units/mg), Tirosinasi (Tyr) (from mushroom, ≥ 1000 unità/mg) e Glucosio ossidasi (GOx) (from *Aspergillus niger*, Type II, $\geq 15,000$ units/g solid) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich.

Gli standard per le prove di calibrazione sono: catecolo (TCI Chemicals), glucosio (Carlo Erba) e 5-idrossimetil-2-furaldeide (Sigma Aldrich).

I reagenti impiegati per l'immobilizzazione enzimatica sono: N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)-carboimmide (EDC) (>98%), N-idrossisuccinimide (NHS) (>98%) tutti acquistati dalla TCI chemicals; mentre la glutaraldeide (GA) (Grade I, 25% in H₂O), l'albumina di siero bovino (BSA) e la N-cicloesil-N'-(2-morfolinetil)-carbodiimmide-meto-*p*-toluensolfonato (CMC) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich.

I reagenti impiegati per le sintesi sono l'acido-2-tiofenboronico, il 2,5-dibromo-3-formiltiofene, il 4,4'-dibromo-2,2'ditiofene (tutti TCI chemicals), l'acido 2,5-dibromo-3-tiofenoico (Fluochem), l'acido 4-iodobenzoico, il 2-metil-3-butin-3-olo (entrambi reattivi Sigma Aldrich).

I catalizzatori usati sono: [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocene]palladio(II) Pd(dppf)Cl₂, tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) Pd(PPh₃)₄ e ioduro rameoso CuI, tutti forniti dalla Sigma Aldrich.

I solventi utilizzati per le attività di sintesi e caratterizzazione non elettrochimica sono metanolo, toluene, cloroformio, acetato di etile, etere etilico, etere di petrolio, N,N-dimetilformammide, diisopropilammina, tutti acquistati dalla Sigma Aldrich ed utilizzati tali e quali.

I solventi usati per le prove elettrochimiche sono invece CH₃CN (Aldrich, electrochemical grade, H₂O <0.0050%), CH₂Cl₂ (Aldrich, electrochemical grade, H₂O <0.0050%) entrambi confezionati e conservati sotto Ar.

Altri reagenti, quali β -Nicotinammideadeninucleotide, reduced disodium salt hydrate ($\geq 98\%$), β -Nicotinammideadeninucleotide ($\geq 95\%$), KMnO₄, NaOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, MgSO₄, NaH₂PO₄ (98% \pm 102%) e Na₂H₂PO₄ (98% \pm 102%), sono tutti stati acquistati dalla Sigma Aldrich ed utilizzati tali e quali.

2.3 Procedure per la costruzione dei biosensori.

2.3.1 Procedura operativa degli esperimenti di voltammetria ciclica e di cronoamperometria.

Tutti gli esperimenti di voltammetria ciclica e di cronoamperometria sono stati eseguiti in una cella a bicchiere a tre elettrodi, dotata di sistema di degasaggio, come rappresentato in figura 2.2.

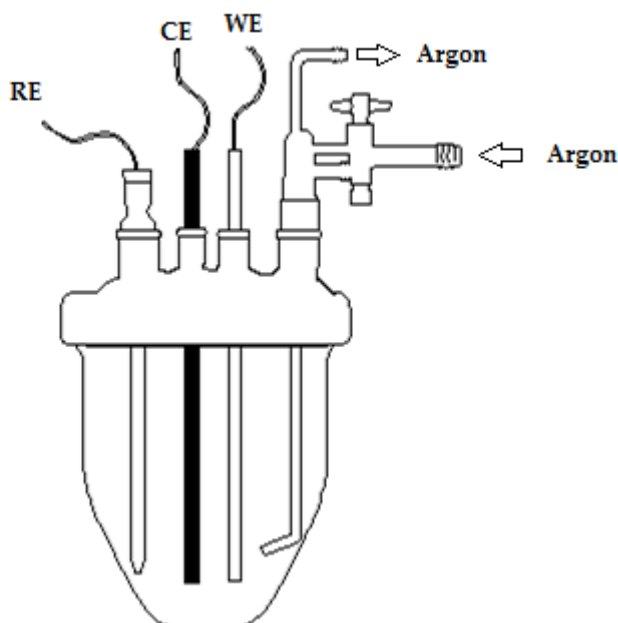


Figura 2.2. Schema illustrativo di una cella elettrochimica a tre elettrodi.

dove

- WE: Pt o Au (disco, 2 mm di diametro o Pt 60 μm di diametro);
- RE: Ag/AgCl;
- CE: rete di Pt o barretta di grafite.

Nella cella, precedentemente asciugata in stufa a 100°C, è stata trasferita una soluzione di elettrolita di supporto solubilizzato in un opportuno solvente. Elettrolita di supporto e solvente sono stati scelti di volta in volta in funzione dell'esperimento da eseguire, e sono specificati di seguito per i diversi casi.

Prima della polimerizzazione l'elettrodo di lavoro è stato pulito con Al_2O_3 (0,3 μm), lavato con acetone e infine sottoposto a trattamento ad ultrasuoni.

Prima di ciascun esperimento, nella soluzione elettrolita/solvente è stato fatto gorgogliare Ar anidro per 20 minuti, ed è quindi stato registrato il responso del fondo. Quest'ultimo è considerato accettabile solo se si è in assenza di responsi catoanodici che mostrino corrente di picco non superiore a 10 volte la deviazione standard del segnale medio della linea di base. Dopo la

registrazione del responso del fondo, nel sistema solvente è stato solubilizzato il monomero scelto, e nella soluzione è stato fatto gorgogliare Ar anidro per altri 15 minuti.

Tutte le prove elettrochimiche, ad eccezione delle prove di determinazione dei polifenoli, sono state eseguite sotto atmosfera inerte.

2.3.1.1 Film politiofenici.

L'elettrodeposizione dei film di politiofene è stata effettuata, ove non diversamente precisato, su un elettrodo a disco di Pt e, nel caso dell'EDOT, del Br-BT-TPA e del ET-BT-TPA, anche su elettrodo a disco di Au (entrambi di 2 mm di diametro). Tutte le prove elettrochimiche relative alla caratterizzazione dei monomeri tiofenici impiegati, alla loro elettropolimerizzazione e alla caratterizzazione dei film sono state eseguite in un sistema solvente CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M oppure CH₂Cl₂/ TEAPF₆ 0,1 M. La concentrazione di monomero utilizzata era pari a 0,01 M per 2,2'-BT e Br₂-BT e a 5*10⁻³ M per tutti gli altri monomeri tiofenici.

Le caratterizzazioni voltammetriche dei politiofeni depositati, così come la neutralizzazione ove necessaria, sono state effettuate nello stesso sistema solvente usato per la polimerizzazione, in assenza di monomero.

2.3.1.2 Film di polipirrolo.

Per l'elettrodeposizione del film di polipirrolo sono stati utilizzati: come elettrodo lavorante un disco di Pt (diametro 2 mm), come elettrodo di riferimento Ag/AgCl, e come controelettrodo un elettrodo a rete di Pt. La caratterizzazione del monomero e la polimerizzazione sono state condotte in soluzione acquosa, utilizzando come elettrolita di supporto K₄[Fe(CN)₆] o K₃[Fe(CN)₆] o LiClO₄, come specificato di volta in volta nella descrizione delle

singole prove. I film di polipirrolo elettrogenerati sono stati neutralizzati e caratterizzati in soluzione di tampone fosfato 0,1 M a pH 7,5.

2.3.1.3 Determinazioni amperometriche.

Le determinazioni su soluzioni di glucosio, catecolo, sono state effettuate in una soluzione di tampone fosfato 0,1 M, pH=7, preparata solubilizzando 0,1160 g di NaH_2PO_4 e 0,1450 g di $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ in 250 mL di acqua ultrapura. Le determinazioni su soluzioni di 5-idrossimetil-2-furaldeide sono state eseguite in una soluzione di tampone fosfato 0,1 M pH = 7,5.

-WE:Pt o Au (2mm diametro);

- RE: Ag/AgCl;

- CE: rete di Pt.

2.3.1.4 Determinazione dello spessore dei film polimerici.

Lo spessore dei film di politiofene è stato determinato in base al valore della carica di deposizione (Q_{dep}) attraverso la seguente relazione (1):

$$d(\text{nm}) = \alpha \left(\frac{\text{cm}^2 \cdot \text{nm}}{\text{mC}} \right) * \frac{Q_{\text{dep}} \text{mC}}{A(\text{cm}^2)} \text{ equazione 8}$$

Dove A = area elettrodo di lavoro;

α = parametro caratteristico, dipendente dalla natura del monomero e dalla natura dell'elettrolita utilizzato (ovvero del controione, che è fornito dall'elettrolita).

Sebbene in passato, per film polimerici a base tiofenica sia stato usato un valore medio di α pari a 2 (2) attualmente, alla luce di una nuova serie di correlazioni tra misure di spessori di film depositati e della carica di deposizione durante l'elettropolimerizzazione, viene ora accettato ed utilizzato un valore di α pari a

2,5 nm mC*cm⁻² (1) (3). Lo spessore dei film politiofenici ottenuti nel corso di questo lavoro è stato determinato nel seguente modo:

$$d(\text{nm}) = 2.5 * \frac{Q_{dep}}{(\pi * r^2)} \text{ equazione 9}$$

dove r è il valore del raggio elettrodo espresso in cm.

Lo spessore del film di polipirrolo è stato determinato secondo la seguente equazione (4):

$$\delta_p = \frac{M * Q_p}{(2 * F * \rho * A)} \text{ equazione 10}$$

dove δ_p : spessore del film (cm);

F: costante di Faraday (96485 C* mol^{-1});

M: peso molecolare del pirrolo (67,1 g* mol^{-1});

ρ : densità del film di polipirrolo (1,5 g* cm^{-3});

A: superficie dell'elettrodo (cm²);

Q_p : densità di carica (C);

Il numero 2 corrisponde al numero di elettroni scambiati per unità di pirrolo.

2.3.2 Metodiche per la preparazione delle soluzioni enzimatiche e degli agenti di coupling (5).

La soluzione di CMC e GOx per la modifica dei film di poli(2,2'-bitiofene) e poli(4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis(2-metil-3-butin-2-olo)) è stata preparata solubilizzando 7,5 mg di CMC in 2,5 mL di acqua distillata contenente 30 mg di glucosiosidasi.

La soluzione enzimatica di tirosinasi per la modifica dei film di PEDOT, poli(Br-BT-TPA) e poli(ET-BT-TPA) è stata preparata solubilizzando 20 mg di tirosinasi in 0,5 mL di tampone fosfato 0,1 M pH=7. Nel caso dei film polimerici di

poli(BT-ET-PhCOOH), la soluzione enzimatica è stata preparata solubilizzando 10 mg di tirosinasi in 1 mL di tampone fosfato 0,1 M pH=7.

Le soluzioni di aldeide deidrogenasi per la modifica del film di polipirrolo e poli(2,2'-bitiofene) sono state preparate solubilizzando quantità variabili (1÷19 mg = 1÷15 U) di enzima in 0,5 mL di tampone fosfato 0,1 M pH 7,0; quelle di diaforasi sono state preparate solubilizzando una quantità opportuna di enzima (1÷ 3,33 mg = 4,5 ÷ 15 U) in 0,5 mL di tampone fosfato 0,1 M, pH 8,0.

La soluzione di EDC 0,4 M/NHS 0,1 M è stata preparata solubilizzando 0,35 mL di EDC e 0,0575 g di NHS in 5 mL di soluzione di tampone fosfato 0,1 M pH=7.

La soluzione di glutaraldeide all'1 % è stata preparata diluendo 40 µL di glutaraldeide al 25% in 1 mL di tampone fosfato 0,1 M pH=7,5. Per i film polimerici di poli(BT-ET-PhCOOH) è stata utilizzata una soluzione più diluita, solubilizzando 2,11 µL di glutaraldeide in 3 mL di tampone fosfato 0,1 M pH=7.

2.4 Biosensori per la determinazione del glucosio mediante l'impiego dell'enzima glucosio ossidasi.

La necessità di acquisire esperienza nel settore della biosensoristica ci ha suggerito di rivolgere inizialmente la nostra attenzione verso lo studio di dispositivi per la determinazione del glucosio. Tale decisione deriva dal fatto che, da un lato, il glucosio è uno dei costituenti principali del miele e, dall'altro, sono noti in letteratura biosensori per la sua determinazione, basati sull'attività catalitica dell'enzima glucosio ossidasi. D'altra parte, è noto l'utilizzo di polimeri conduttori come trasduttori per la costruzione di biosensori. In tale ambito, questo gruppo di ricerca ha raggiunto negli ultimi anni una consolidata esperienza nella sintesi elettrochimica e caratterizzazione di politiofeni. Per tale motivo si è deciso, come primo approccio, di sfruttare le competenze in questo settore e mettere a punto un sensore enzimatico a risposta amperometrica per la determinazione del glucosio. I biosensori per la determinazione del glucosio sono stati preparati attraverso immobilizzazione dell'enzima glucosio-ossidasi su film ottenuti per polimerizzazione elettrochimica di monomeri tiofenici. In particolare sono stati utilizzati i seguenti monomeri: 2,2'-bitiofene, 2,2'-bitiofene insieme ad acido 3-tiofencarbossilico e (4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis-(2-metil-3-butin-2-olo)). Dopo aver depositato il film polimerico sulla superficie elettrodica, vi è stato immobilizzato sopra l'enzima attraverso la tecnica del cross-linking. Come agenti d'immobilizzazione sono stati utilizzati CMC, secondo quanto riportato da Liu C. et al. (5), oppure una miscela di BSA e GA. Il *p*-benzoquinone è stato invece impiegato come mediatore in soluzione. I biosensori costruiti sono stati quindi testati su campioni reali.

2.4.1 Caratterizzazione elettrochimica di monomeri e polimeri a base tiofenica.

La polimerizzazione elettrochimica del 2,2'-bitiofene è stata eseguita su elettrodo lavorante di Pt da 2mm di diametro, in una soluzione di acetonitrile contenente una concentrazione di monomero pari a 0,01 M ed utilizzando come elettrolita di supporto TEAPF₆ 0,1 M. Il responso di voltammetria ciclica riportato in figura 2.3 mostra un processo anodico a +1,34 V, attribuibile all'ossidazione del frammento tiofenico, con un processo catodico associato a circa 1 V.

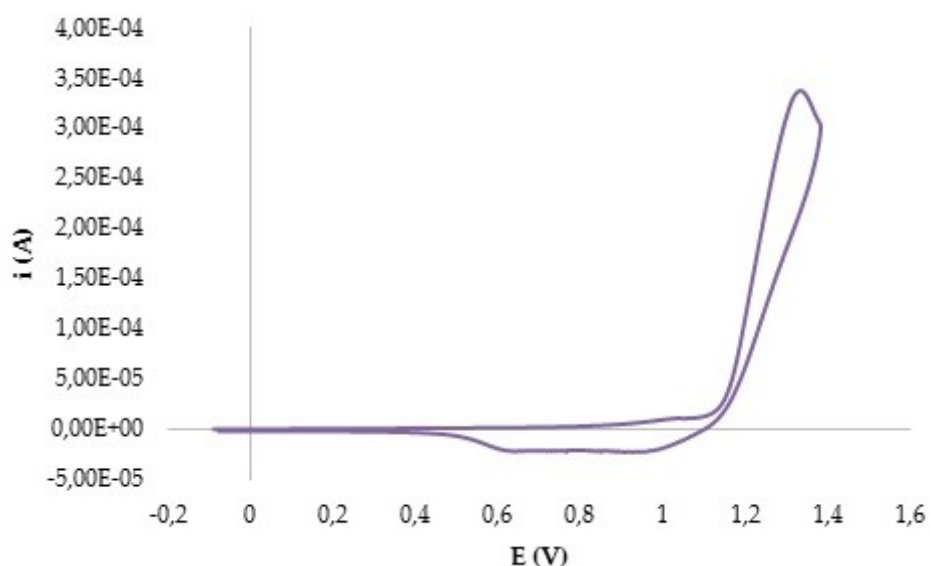


Figura 2.3. Voltammetria ciclica di una soluzione di 2,2'-BT 0,01 M in CH₃CN/TEAPF₆ 0,1. WE: Pt, RE: Ag/AgCl, CE: barretta di grafite. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Scansioni successive (figura 2.4) evidenziano un aumento dell'intensità del picco a +1,34 V, indice di un processo di polimerizzazione in corso, con contemporanea formazione di un film di colore arancio scuro sulla superficie dell'elettrodo. Nelle scansioni successive alla prima è inoltre evidente la presenza di un nuovo processo anodico a +1,08 V attribuibile alla formazione dei frammenti oligomerici.

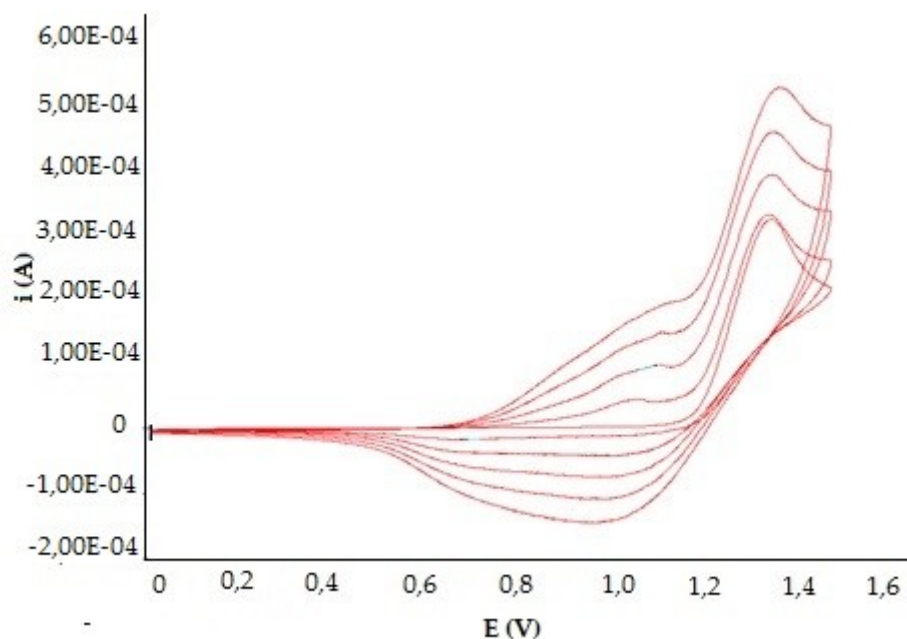


Figura 2.4. Scansioni di voltammetria ciclica ripetute (cinque) di una soluzione di 2,2'-BT 0,01 M in CH_3CN e TEAP 0,1 M. WE: Pt, RE: Ag/AgCl, CE: barretta di grafite.
 $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Una volta verificata la capacità del 2,2'-bitiofene a polimerizzare per via elettrochimica, un deposito di poli(2,2'-BT) è stato realizzato su analogo elettrodo di Pt per via cronoamperometrica polarizzando WE a +1,33 V vs. Ag/AgCl. Il tempo di deposizione prescelto è quello necessario ad ottenere una densità di carica Q pari a $100 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$, in modo tale da depositare un film polimerico avente uno spessore confrontabile con quello dei polimeri politiofenici impiegati per l'immobilizzazione della GOx riportati in letteratura (5).

Il polimero è stato neutralizzato a 0 V per 60 s nella soluzione di partenza priva del monomero. La caratterizzazione voltammetrica (figura 2.5), nello stesso sistema solvente utilizzato per la polimerizzazione, evidenzia un processo di doping a +1,10 V e uno - poco risolto - a ca. +0,90V cui è associato un processo di dedoping a potenziali compresi tra +0,60 e +1,0 V.

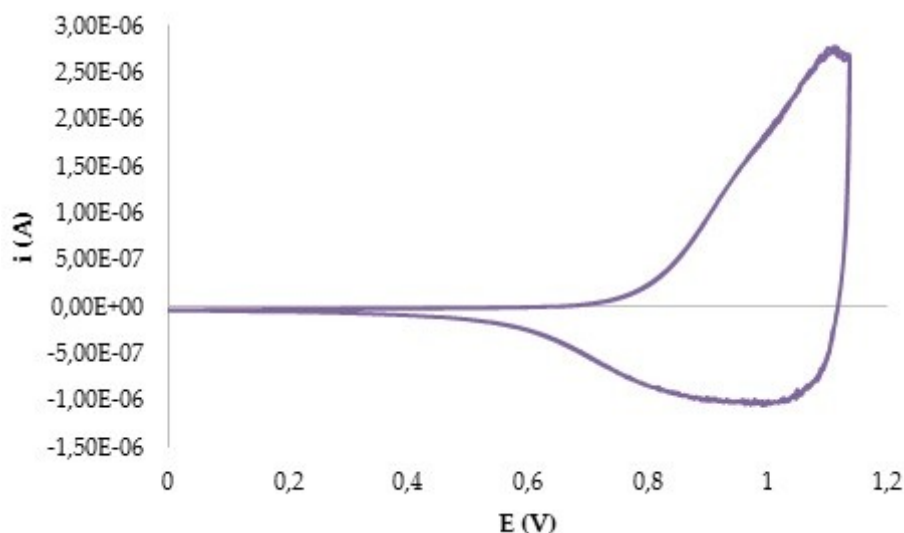


Figura 2.5. Caratterizzazione di un film di poli(2,2'-BT) su Pt in CH₃CN/TEAPF6 0,1 M.
 $Q = 100 \text{ mC} \cdot \text{cm}^{-2}$. $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

In analogia a quanto riportato in letteratura (5), in cui l'enzima GOx viene bloccato su un copolimero ottenuto dalla polimerizzazione dell'acido tiofen-3-acetico (T3CA) e de 3-metiltiofene, si è pensato di sintetizzare un copolimero utilizzando però al posto del 3-metiltiofene il 2,2-bitiofene.

In prima analisi è stata valutata la tendenza alla polimerizzazione dei singoli monomeri. Sono state effettuate delle prove in voltammetria ciclica utilizzando soluzioni a differenti concentrazioni del solo T3CA e del solo 2,2'-BT. Per entrambi è stato osservato un picco di ossidazione relativo al frammento tiofenico. Per il T3CA il picco è stato registrato ad un potenziale pari a +1,0 V, mentre per il 2,2'-BT a circa +1,30 V. Inoltre, osservando la superficie dell'elettrodo dopo le prove in voltammetria ciclica è stata notata la presenza di un film rosso, più o meno scuro in base alla concentrazione iniziale del monomero in soluzione e al numero di scansioni catoanodiche effettuate.

La tentata sintesi del copolimero ottenuto combinando il 2,2'-BT e il T3CA è stata studiata impiegando differenti soluzioni contenenti rapporti di concentrazione variabili dei due monomeri: a) 2,2'-BT 0,001 M / T3CA 0,005 M,

b) 2,2'-BT 0,001 M/ T3CA 0,01 M, e c) 2,2'-BT 0,01 M / T3CA 0,01 M. La sovrapposizione dei voltammogrammi registrati per ciascuna soluzione (figura 2.6) mostrano, in ciascun caso, un picco ben distinto a circa +1,30 V attribuibile all'ossidazione del 2,2'-BT. L'intensità del picco infatti aumenta all'aumentare della concentrazione del 2,2'-BT (voltammogrammi rosso e blu), mentre quando questo monomero è presente in difetto rispetto al T3CA (voltammogramma verde e marrone) l'intensità del picco è molto meno marcata, facendo intendere quindi che la polimerizzazione per ossidazione del frammento tiofenico T3CA non avvenga, e ciò ci ha impedito di poter mettere a punto un biosensore in grado di poter esser confrontabile con quello descritto da Liu e collaboratori (5).

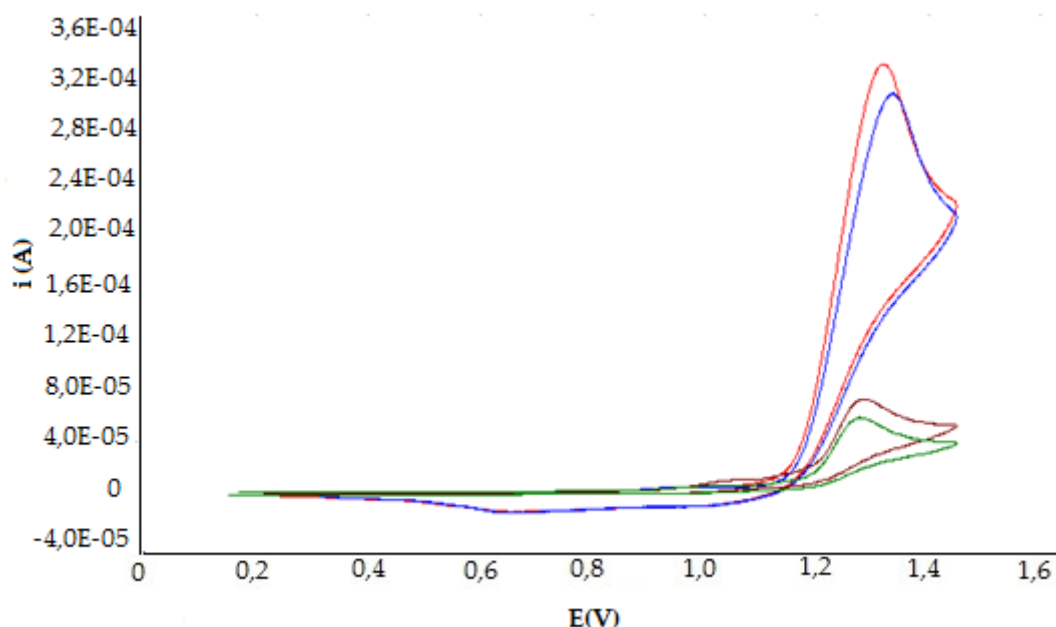


Figura 2.6. Voltammetria ciclica del 2,2'-BT e del T3CA in CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M. WE: Pt, RE: Ag/AgCl, CE: barretta di grafite. $v= 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Linea blu: 2,2'-BT 0,01 M; verde: 2,2'-BT 0,001M/ T3CA 0,005 M; rossa: 2,2'-BT 0,01 M/T3CA0,01 M; marrone: 2,2'-BT 0,001M/T3CA 0,01M.

Infine, è stata caratterizzato in voltammetria ciclica il 4,4'-(BiET-BiAlcool-BT), utilizzando una concentrazione 0,01 M in un sistema solvente costituito da

CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M. Il voltammogramma (figura 2.7) permette di osservare un picco anodico a +1,40 V (attribuibile all'ossidazione del frammento tiofenico) cui è associato un picco di ritorno a +1,10 V. Scansioni successive intorno al picco a 1,40 V evidenziano l'incremento dell'intensità di corrente con il crescere del numero di scansioni e la contemporanea formazione di un film.

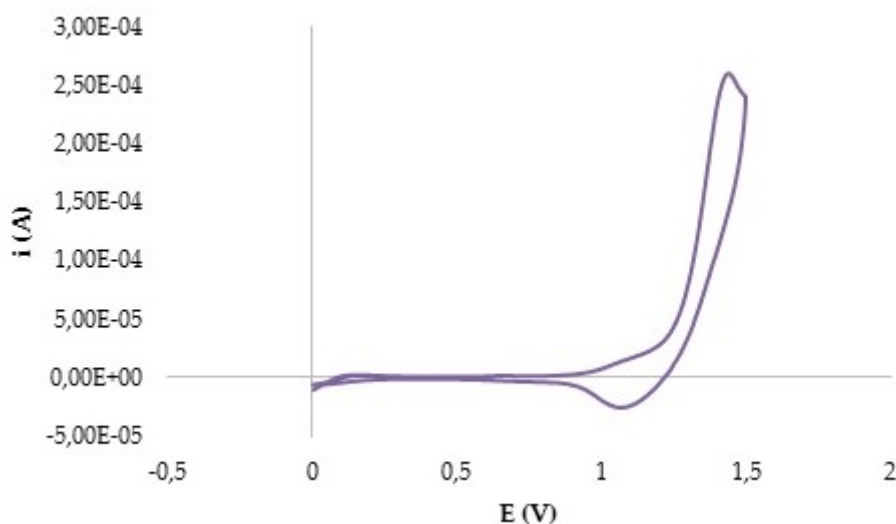
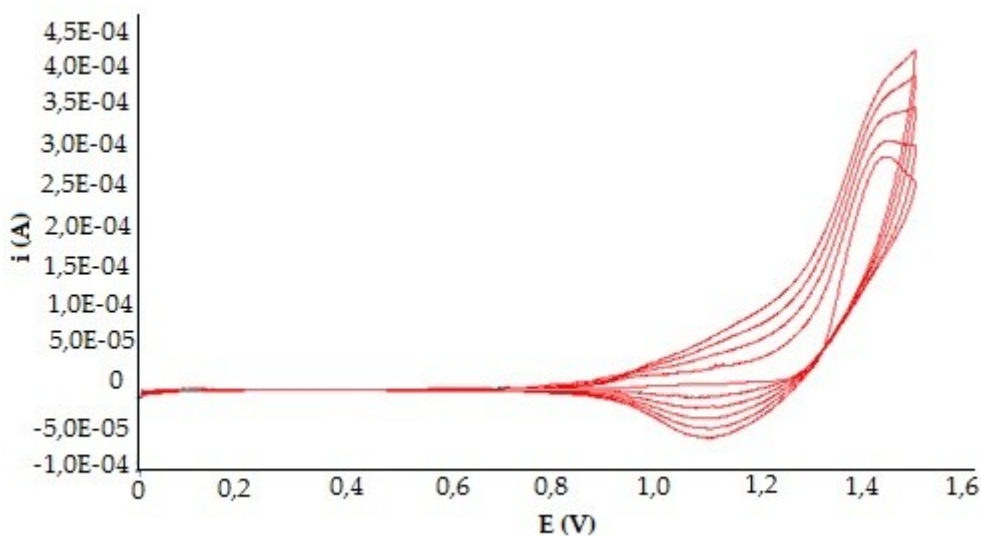


Figura 2.7. Voltammetria ciclica del 4,4'-bis(2-metil-3-butin-2-ol)-2,2'-bitiofene in concentrazione 0,01 M in CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M. WE: Pt, RE: Ag/AgCl, CE: barretta di grafite. $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Figura 2.8. Scansioni ripetute 5 del 4,4'-bis(2-metil-3-butin-2-ol)-2,2'-bitiofene in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAFP}_6$ 0,1 M. WE: Pt, RE: Ag/AgCl, CE: barretta di grafite. $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

I film di poli(4,4'-(BiET-BiAlcool-BT)) sono stati depositati su elettrodo di Pt al valore di potenziale di +1,35 V per 130 s, e poi neutralizzati a 0 V per 60 s. La figura 2.9 riporta la caratterizzazione di un film di poli(4,4'-(BiET-BiAlcool-BT)) con carica pari a $12 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$, effettuata in una soluzione di $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAFP}_6$ 0,1 M, in assenza di monomero. Il voltammogramma ha evidenziato un processo ossidativo (doping) a +1,20 V ed un processo attribuibile al dedoping del film a +1,10 V.

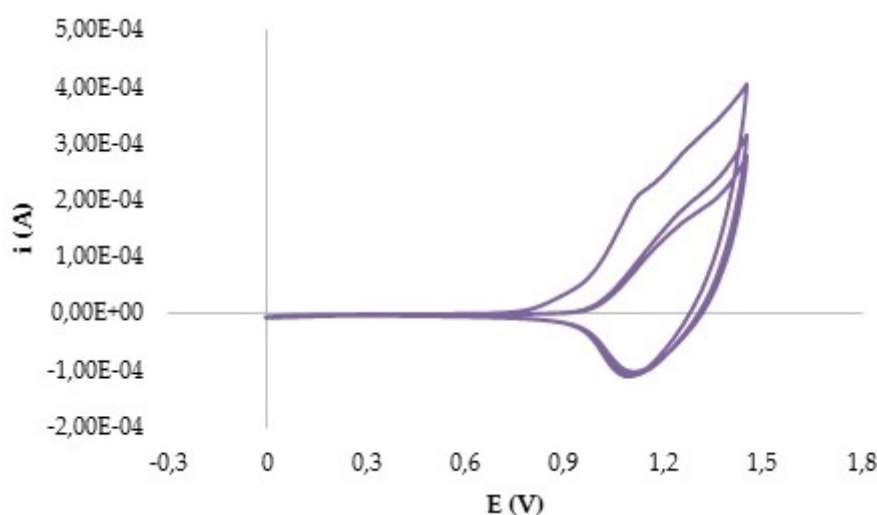


Figura 2.9. Caratterizzazione di un film di poli 4,4'-bis(2-metil-3-butin-2-ol)-2,2'-bitiofene su Pt in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAFP}_6$ 0,1 M. $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Stante i risultati ottenuti nello step di caratterizzazione elettrochimica di monomeri e polimeri a base tiofenica, e di elettropolimerizzazione dei monomeri selezionati, si è quindi proceduto ad effettuare, sugli elettrodi modificati con i relativi film polimerici, le prove di immobilizzazione enzimatica della GOx. Si sono studiati due approcci diversi, dapprima quello realizzato con l'agente condensante CMC, indi quello con il sistema reticolante BSA/GA.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

2.4.2 Immobilizzazione dell'enzima con CMC.

L'immobilizzazione dell'enzima GOx sugli elettrodi modificati con film di poli(2,2'-bitiofene) e poli(4,4'-bis(2-metil-3-butin-2-ol)-2,2'-bitiofene), aventi spessore rispettivamente pari a 7,96 μm e 955 nm, è stata dapprima effettuata immergendo per 12 ore ciascun elettrodo in una soluzione contenente l'enzima e l'agente condensante CMC, preparata secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.3.2.

I biosensori così ottenuti sono stati caratterizzati in una soluzione di tampone fosfato a pH 7, contenente *p*-benzochinone in concentrazione 10^{-3} M. Il voltammogramma riportato in figura 2.10 evidenzia la riduzione del *p*-benzochinone a -0,30 V e la sua riossidazione a ca. +0,40 V.

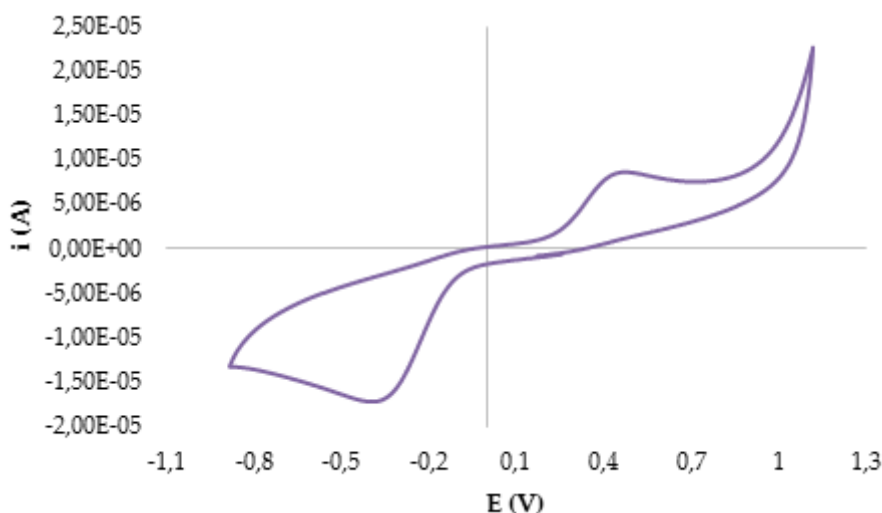
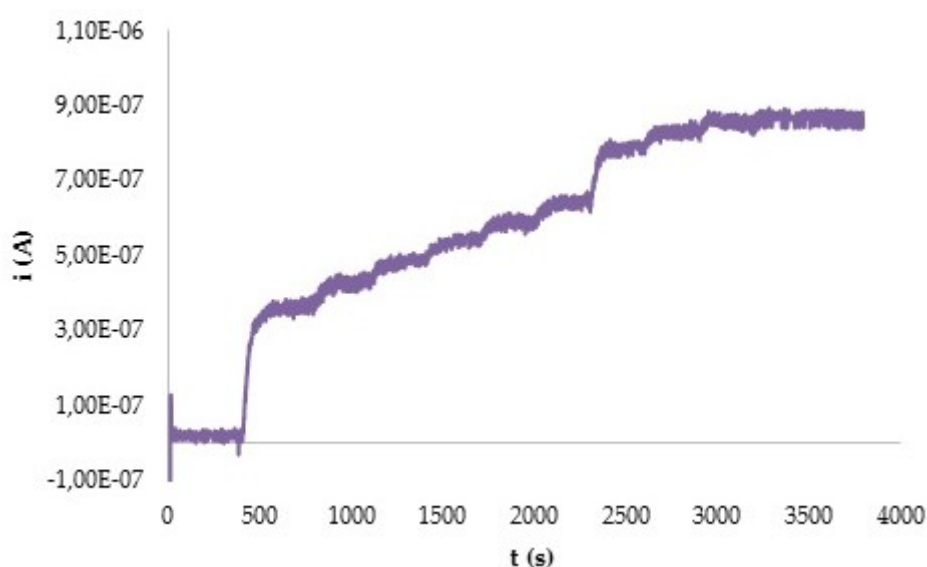


Figura 2.10. Voltammetria ciclica del biosensore Pt/poli (2,2'-BT)/GOx/CMC in tampone fosfato pH 7,0 e *p*-benzochinone 10^{-3} M.

Sulla base del responso voltammetrico (figura 2.10) e sulla base dei dati presenti in letteratura, le determinazioni amperometriche su soluzioni contenenti concentrazioni crescenti di glucosio sono state effettuate sotto agitazione ad un

valore di potenziale di +0,40 V. In queste condizioni il mediatore si trova nella sua forma ossidata, necessaria a garantire il ripristino del ciclo catalitico. Prima di iniziare la determinazione analitica, si è atteso che la corrente di fondo raggiungesse un valore costante. Si è quindi proceduto con aggiunte successive di una soluzione 0,2 M di β -D-glucosio a 20 mL di tampone fosfato pH 7,0. Le aggiunte sono state pari a 20 μ L per i primi 5/6 punti e 100 μ L per quelli successivi, con un intervallo di tempo di ca. 200 s tra un'aggiunta e la successiva, coprendo in tal modo un intervallo di concentrazione compreso tra $2 \cdot 10^{-4}$ M e $8,8 \cdot 10^{-3}$ M. L'andamento corrente/tempo per i due biosensori, uno a base di poli(2,2'-BT) e l'altro a base di poli(BiET-BiAlcool-BT) è riportato rispettivamente nelle figure 2.11 e 2.13. Le corrispondenti rette di calibrazione (figure 2.12 e 2.14) evidenziano come, in entrambi i casi, la variazione di corrente in funzione dell'incremento di concentrazione di analita sia lineare in un intervallo di concentrazione superiore ad un ordine di grandezza, con valore di R^2 prossimo a 1 in entrambi i casi.



Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Figura 2.11. Risposta del biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC in tampone fosfato 0,1 M pH 7, 0 e *p*-benzochinone 10^{-3} M alle aggiunte multiple di glucosio (concentrazione finale di analita compresa tra $2 \cdot 10^{-4}$ M e $3,2 \cdot 10^{-3}$ M) .

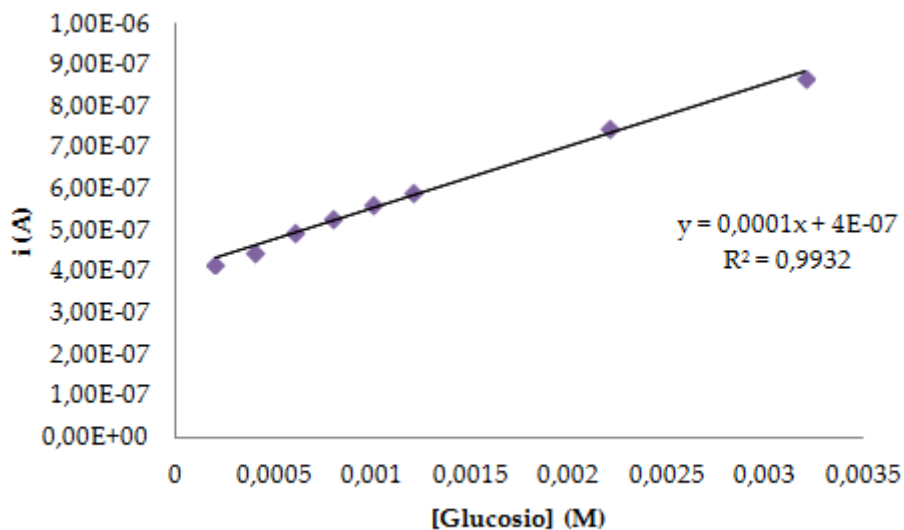


Figura 2.12. Retta di calibrazione del biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC in tampone fosfato 0,1 M pH 7, 0 e *p*-benzochinone 10^{-3} M.

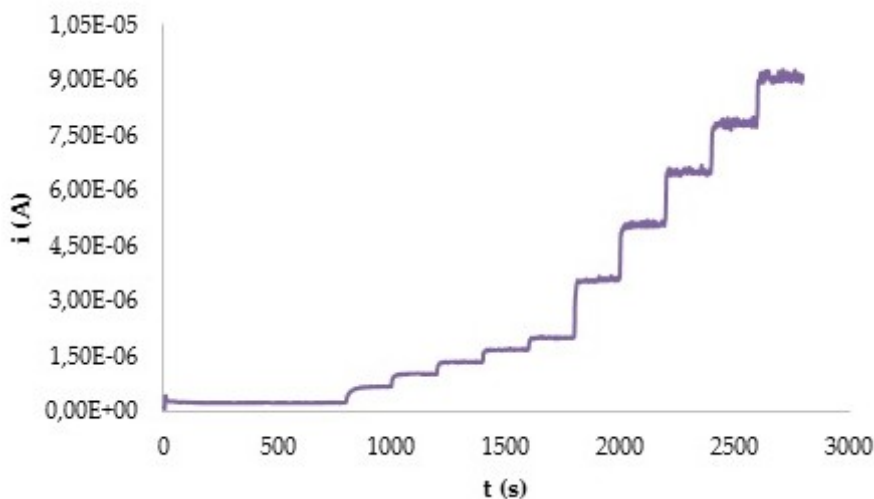


Figura 2.13. Risposta del biosensore Pt/poli(4,4'-BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC in tampone fosfato 0,1 M pH 7, 0 e *p*-benzochinone 10^{-3} M alle aggiunte multiple di glucosio (concentrazione finale di analita compresa tra $2 \cdot 10^{-4}$ M e $6 \cdot 10^{-3}$ M) .

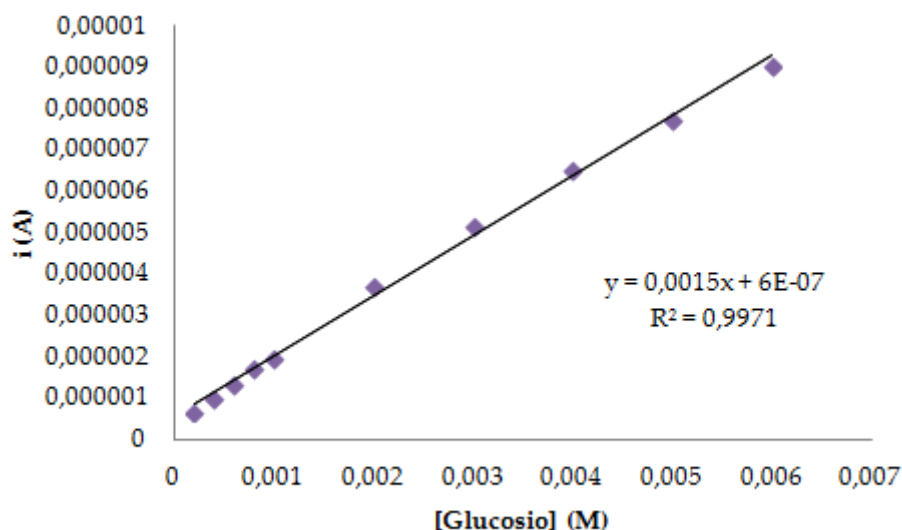


Figura 2.14. Retta di calibrazione del biosensore Pt/poli(4,4'-BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC in tampone fosfato 0,1 M pH 7, 0 e *p*-benzochinone 10^{-3} M.

Una volta valutato l'intervallo di concentrazione e la linearità nella risposta, i biosensori sono stati testati su campioni reali di succhi di frutta commerciali al gusto di pera, pesca ed albicocca. Onde evitare errori sistematici dovuti dalla potenziale interferenza della matrice, la determinazione del contenuto di glucosio nei campioni analizzati è stata effettuata attraverso il metodo delle aggiunte multiple di standard.

Tutte le misure sono state effettuate in triplicato, aggiungendo 200 μ L di succo in 20 mL di tampone fosfato pH 7,0 e, aggiungendo volumi pari a 20 μ L per le prime 6 aggiunte e 100 μ L per le aggiunte successive di una soluzione di glucosio 0,2 M.

La figura 2.15 riporta la risposta in termini di corrente al variare della concentrazione di glucosio aggiunto per ciascun campione (pera, pesca ed albicocca) in tre diverse sessioni analitiche. Il valore dell'intercetta della retta per un valore di corrente pari a zero ha permesso di calcolare la concentrazione

di analita in ciascun campione, tenendo conto del fattore di diluizione. In particolare, i valori medi di concentrazione di glucosio per i singoli campioni è risultato pari a: $0,18 \pm 0,02$ M per il succo di pera, $0,19 \pm 0,01$ M per il succo di pesca, $0,24 \pm 0,02$ M per il succo di albicocca.

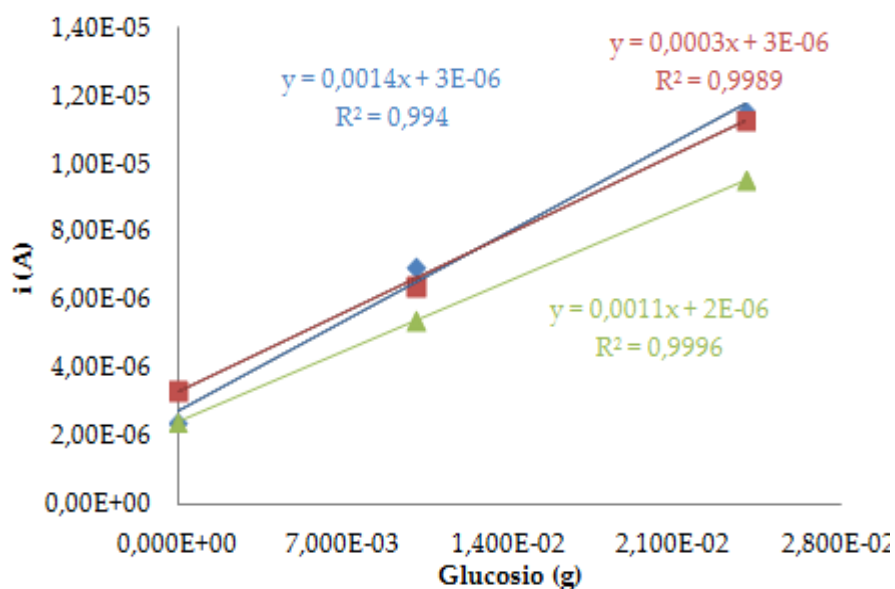


Figura 2.15. Tipiche rette di calibrazione per aggiunte multiple di standard nella determinazione del glucosio in succhi di frutta tramite il biosensore Pt/Poli(2,2'-BT)/GOx/CMC. contenente Solvente: 20 mL di tampone fosfato a pH= 7 + 200 μ L di succo, aggiunte di 20 μ L (primi sei punti) e 100 μ L punti successivi di glucosio 0,2 M.
 Blu: succo pera; Verde: succo pesca; Rosso: succo albicocca.

In tabella 2 sono riportati i valori medi delle concentrazioni di glucosio misurati per ciascun succo in ogni sessione analitica, impiegando il biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC.

Biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC

CONCENTRAZIONE GLUCOSIO (M)				
	1^ calibrazione	2^ calibrazione	3^ calibrazione	Valore medio
Succo pera	0,203	0,162	0,176	0,18±0,02
Succo pesca	0,184	0,186	0,209	0,19±0,01
Succo albicocca	0,238	0,264	0,215	0,24±0,02

Tabella 2. Concentrazione di glucosio misurate nelle tre sessioni analitiche con il biosensore

Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC per ciascun succo di frutta.

La concentrazione di glucosio negli stessi campioni è stata valutata utilizzando anche il biosensore a base di poli(4,4'-BiET-BiAlcool-BT). Anche in questo caso ciascuna prova di calibrazione è stata effettuata in tre diverse sessioni analitiche.

La variazione della concentrazione in funzione delle aggiunte standard di glucosio è riportata nella figura 2.16.

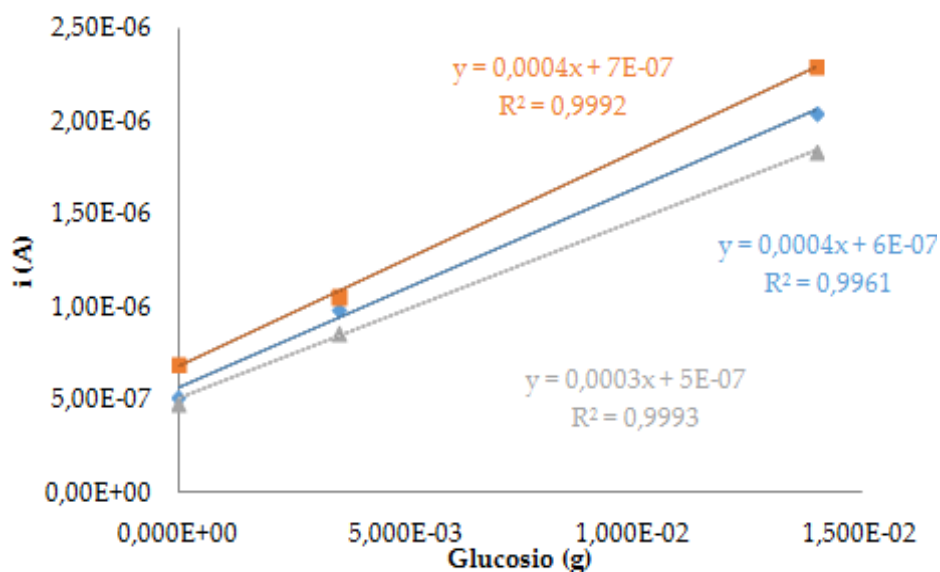


Figura 2.16. Tipiche rette di calibrazione per aggiunte multiple di standard nella determinazione del glucosio in succhi di frutta tramite il biosensore Pt/Poli(4,4'-BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC, in 20 mL di tampone fosfato a pH= 7 + 200 μ L di succo, aggiunte di 100 μ L punti di glucosio 0,2 M. Blu: succo pera; Grigio: succo pesca; Arancione: succo albicocca.

Biosensore Pt/poli(BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC				
CONCENTRAZIONE GLUCOSIO (M)				
	1^ calibrazione	2^ calibrazione	3^ calibrazione	Valore medio
Succo pera	0,167	0,140	0,208	0,17 \pm 0,01
Succo pesca	0,168	0,209	0,294	0,22 \pm 0,03
Succo albicocca	0,217	0,285	0,332	0,28 \pm 0,05

Tabella 3. Concentrazione di glucosio misurate nelle tre sessioni analitiche con il biosensore Pt/poli(BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC per ciascun succo di frutta.

Le medie dei risultati ottenuti sono state confrontate statisticamente attraverso il test di Student a due code. La differenza fra le medie osservata appare essere non significativa per $p < 0,05$.

2.4.3 Immobilizzazione dell'enzima con BSA/GA.

Allo scopo di verificare la possibilità di utilizzare un diverso agente di immobilizzazione al posto del CMC, è stato costruito un biosensore del tipo Pt/poli(2,2'-BT)/GO_x in cui il compito di immobilizzare l'enzima fosse affidato al sistema BSA/GA. Tale sistema è comunemente utilizzato per l'immobilizzazione degli enzimi sulla superficie di un trasduttore. L'elettrodeposizione del polimero è stata effettuata stavolta su un elettrodo di Pt del diametro di 60 µm, in maniera analoga a quanto riportato nella sezione iniziale del presente capitolo, tuttavia - lavorando in queste condizioni - non si è riusciti ad ottenere dei film di poli (2,2'-BT) con spessore comparabile a quello depositato nel caso del biosensore preparato usando il CMC.

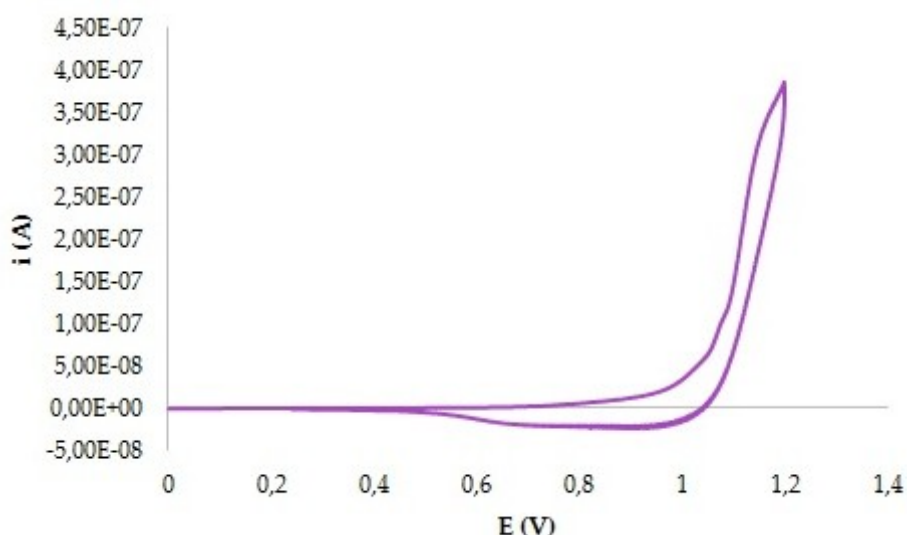


Figura 2.17. Voltammetria ciclica di una soluzione di CH₃CN, TEAPF₆ 0,1 M e 2,2'-bitiofene 0,01 M. E= 0 ÷ +1,30 V, v= 100 mV*s⁻¹.

La caratterizzazione del film ha evidenziato un processo di doping a +1,08 V a cui è associato un processo di dedoping a potenziali compresi tra +0,93 ÷ +0,68 V.

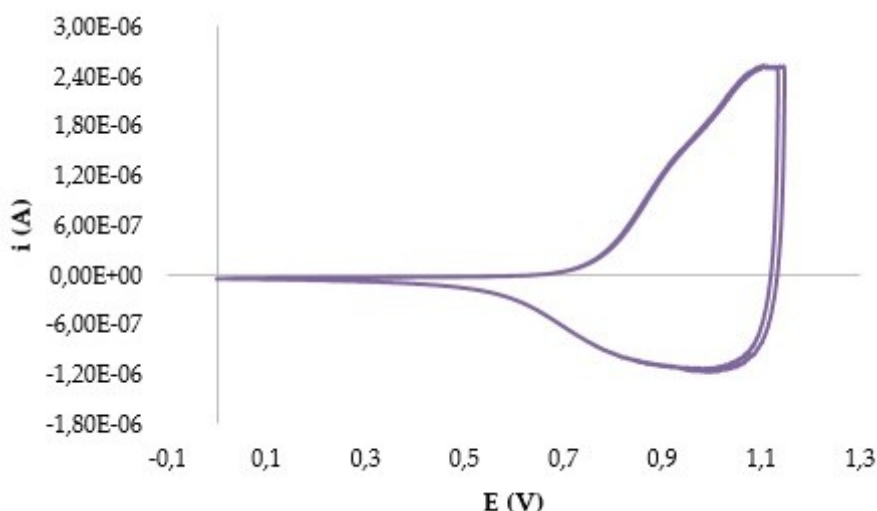


Figura 2.18. Caratterizzazione del film di poli(2,2'-BT) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. $E = 0 \div +1,15$ V, $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'immobilizzazione enzimatica è stata effettuata immergendo l'elettrodo modificato (10 dip) in soluzioni di GOx a concentrazione analoga a quella utilizzata per la preparazione dei biosensori descritti precedentemente (5,11 U/0,5 mL). La soluzione è stata preparata solubilizzando 30 mg di enzima in 2,5 mL di tampone fosfato a pH = 7. Il biosensore è stato quindi immerso in una soluzione acquosa di BSA al 2% e, dopo 5 minuti, in una soluzione acquosa di GA all'1%. Dopo asciugatura all'aria per 30 minuti, il funzionamento del dispositivo è stato testato in cronoamperometria, polarizzando il biosensore ad un potenziale di +0,40 V vs Ag/AgCl in 20 mL di una soluzione 10^{-3} M in *p*-benzoquinone in tampone fosfato a pH 7, sulla quale vengono effettuate aggiunte multiple di una soluzione standard di analita. , Il potenziale di WE è quello necessario a garantire la riossidazione del *p*-benzoquinone. Dopo aver aspettato che la corrente si stabilizzasse, sono state effettuate le aggiunte di volumi standard (50 μL) di β -D-glucosio 0,2 M, ad intervalli di circa 200 s (ossia dopo un tempo idoneo affinché l'elettrodo raggiungesse le condizioni di

corrente in stato stazionario), registrando il valore di corrente dopo ciascuna aggiunta dopo aver agitato la soluzione (Figura 2.19).

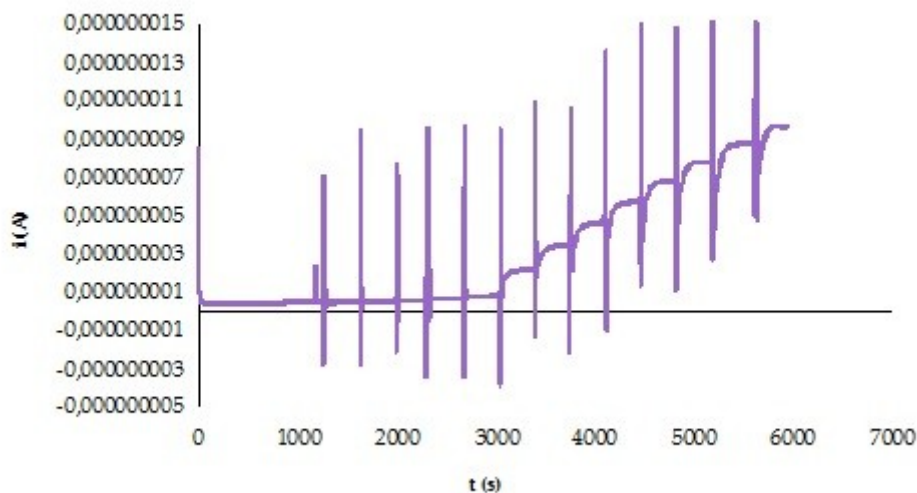


Figura 2.19. Risposta del biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC in tampone fosfato 0,1 M pH 7,0 e *p*-benzochinone 10^{-3} M alle aggiunte multiple di 50 μ L di glucosio 0,2 M (concentrazione finale di analita compresa tra $1 \cdot 10^{-6}$ M e $3,8 \cdot 10^{-3}$ M).

La curva di calibrazione del biosensore (figura 2.20) evidenzia una risposta lineare nel range di concentrazione compreso tra 10^{-6} e $4 \cdot 10^{-3}$ M, con un valore di R^2 prossimo ad 1.

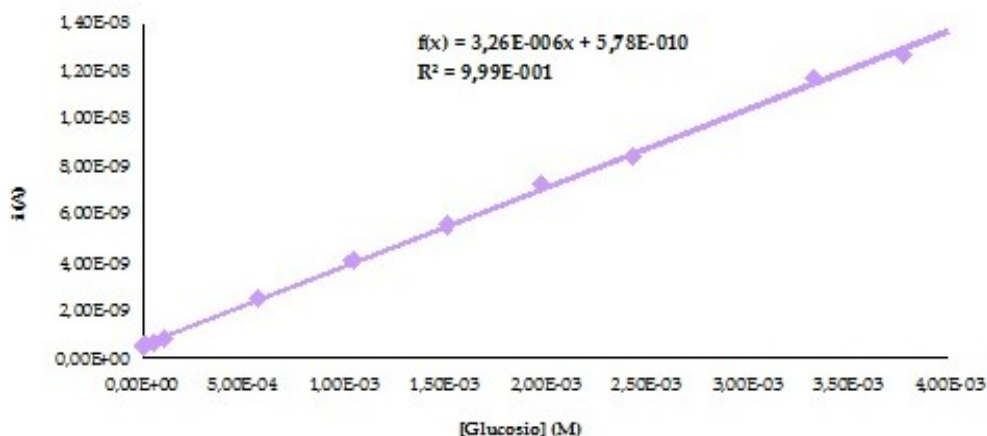


Figura 2.20. Retta di calibrazione relativa al biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/BSA/GA.

Il biosensore risulta essere molto riproducibile su calibrazione di soluzioni standard di glucosio effettuate in sessioni analitiche differenti ed anche la linearità risulta esser eccellente su oltre due ordini di grandezza di concentrazione. (figure 2.20 e 2.21).

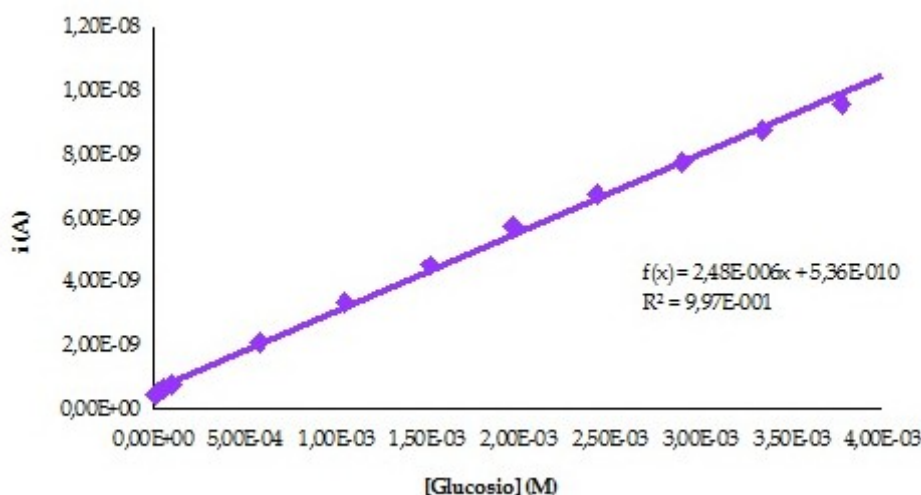


Figura 2.21. Replica dopo tre giorni della retta di calibrazione biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/BSA/GA con soluzioni di glucosio in Tampone fosfato pH 7,0 ad E= +0,4 V.

Anche questo biosensore è stato testato su campioni reali (gli stessi succhi di frutta utilizzati in precedenza). La quantificazione, ottenuta mediante metodo delle aggiunte multiple di standard, ha evidenziato valori analitici sovrapponibili a quelli misurati in precedenza con gli altri biosensori (Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC e Pt/poli(BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC). La tabella 4 mette a confronto le concentrazioni di glucosio misurate con il biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/BSA/GA con i valori analitici ottenuti utilizzando i precedenti biosensori.

	Biosensore 1	Biosensore 2	Biosensore 3
Succo pera	0,18±0,02	0,17±0,01	0,19±0,01
Succo pesca	0,19±0,01	0,22±0,03	0,22±0,01
Succo albicocca	0,24±0,02	0,28±0,05	0,27±0,01

Tabella 4. Concentrazione di glucosio misurate in diversi succhi di frutta con tre diversi biosensori Pt/GOx. Biosensore 1: (Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/CMC;) Biosensore 2: Pt/poli(BiET-BiAlcool-BT)/GOx/CMC; Biosensore 3: Pt/poli(2,2'-BT)/GOx/BSA/GA. N = 3, quantificazione realizzata mediante metodo delle aggiunte multiple di standard.

Com'è possibile osservare, la BSA e la glutaraldeide sono anch'essi efficaci nella immobilizzazione enzimatica, portando a biosensori con potenziali possibilità per la determinazione del glucosio. Nel ritenere con questi risultati esaurita la funzione propedeutica di questo studio, si è deciso di non procedere oltre con la validazione della metodica analitica per passare quindi al tentativo di messa a punto di biosensori per la determinazione della 5-idrossimetil-2-furaldeide.

2.5 Biosensori per la determinazione della 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF).

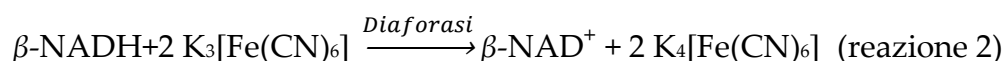
2.5.1 Approcci per la costruzione del biosensore.

Per la costruzione del biosensore per la determinazione dell'HMF è stato fatto pressoché esclusivamente riferimento all'unico spunto di letteratura pertinente, un lavoro di Lomillo et al. (6), che sfrutta l'attività catalitica di un sistema bienzimatico, basato sugli enzimi aldeide deidrogenasi e diaforasi, per la determinazione della 5-idrossimetil-2-furaldeide nel miele. Gli enzimi vengono immobilizzati per intrappolamento in un doppio film di polipirrolo durante l'accrescimento per via elettrochimica del polimero.

L'enzima ALDH, in presenza di un cofattore, la β -Nicotinammideadenindinucleotide (β -NAD⁺), catalizza la reazione di ossidazione delle aldeidi ad acidi carbossilici, con conseguente riduzione del cofattore secondo la reazione riportata di seguito:



La determinazione diretta del prodotto richiede l'imposizione di potenziali di ossidazione piuttosto elevati; essi sarebbero tali da determinare la contemporanea ossidazione di altre specie chimiche eventualmente presenti nel bulk della soluzione. Per ovviare a tale inconveniente è stato introdotto un secondo enzima, la diaforasi che, in presenza di un mediatore redox reversibile, permette l'ossidazione del cofattore a potenziali più bassi e consente quindi di determinare indirettamente la quantità di aldeide effettivamente ossidata nel corso della prima reazione:



La coppia redox scelta è il sistema $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$.

Per questa parte del lavoro di dottorato sono stati adottati diverse tecniche per l'immobilizzazione enzimatica del mediatore e del cofattore:

- intrappolamento in un doppio film polimerico;
- intrappolamento in un singolo film di polipirrolo;
- deposizione del film polimerico e cross-linking con albumina da siero bovino (BSA) e glutaraldeide (GA).

2.5.2 Intrappolamento enzimatico nel film di polipirrolo.

L'immobilizzazione dell'enzima può essere ottenuta con diverse tecniche, ovvero:

- adsorbimento;
- cross-linking con agenti leganti (es. BSA e GA);
- intrappolamento nel film polimerico in accrescimento;

Di queste, l'adsorbimento e il cross-linking sono per la loro rapidità e semplicità di esecuzione, quelle maggiormente utilizzate. L'immobilizzazione con queste due tecniche può essere effettuata in modo tale da ridurre la probabilità di danneggiare la struttura quaternaria delle proteine, preservandone quindi l'attività.

L'intrappolamento in film polimerici è – al contrario - una procedura più lunga e complessa rispetto alle precedenti. L'enzima, solubilizzato nella soluzione in cui è disciolto il monomero, è inglobato all'interno del film in accrescimento. Spesso però il solvente e/o le condizioni di pH in cui è effettuata l'elettrodeposizione non sono compatibili con la persistenza dell'attività

biologica dell'enzima. Inoltre, l'intrappolamento dell'enzima nella matrice polimerica rende più difficoltoso il raggiungimento del sito catalitico da parte dell'analita, con conseguente allungamento dei tempi di risposta o, in generale, un non ottimale funzionamento del biosensore. L'intrappolamento enzimatico evita però fenomeni di rilascio dell'enzima dalla superficie del trasduttore verso la soluzione, che sono maggiormente probabili nel caso di fissaggio per adsorbimento oppure per cross-linking.

In considerazione della complessità del sistema che intendevamo utilizzare (due enzimi, un cofattore e un mediatore redox), si è ritenuto più adeguato adottare a riguardo la tecnica di immobilizzazione per intrappolamento nel film polimerico in accrescimento. In particolare, come monomero polimerizzabile è stato utilizzato il pirrolo, in analogia a quanto riportato in letteratura (6) e l'immobilizzazione è stata effettuata tramite due approcci differenti: approccio *monolayer* e approccio *bilayer*. In entrambi i casi i film polimerizzati sono stati neutralizzati e caratterizzati in una soluzione di tampone fosfato a pH 7,5, in modo da evitare la degradazione degli enzimi.

Tutte le determinazioni amperometriche sono state effettuate polarizzando l'elettrodo ad un opportuno potenziale sino alla stabilizzazione della corrente di fondo, ed effettuando poi aggiunte di analita, lasciando trascorrere tra due aggiunte successive un tempo sufficiente a ottenere un valore stabile di corrente.

Nell'approccio *monolayer* tutti e quattro i componenti (due enzimi, mediatore e cofattore) vengono inglobati in un unico film polimerico. La possibilità di inglobare i vari componenti relativi al sistema di riconoscimento biologico in un unico step è vantaggioso dal punto di vista pratico. Tuttavia il fatto che il

polimero inglobi anioni e molecole di dimensioni differenti può determinare la formazione di un film poco uniforme dal punto di vista morfologico, con probabile diminuzione della conducibilità.

Nell'approccio *bilayer* il mediatore ed il cofattore vengono inglobati in un primo film polimerico, mentre i due enzimi vengono fissati in un secondo film polimerico che viene fatto crescere sul primo. In questo modo le molecole di analita possono raggiungere con relativa facilità il sito attivo dell'ALDH. Inoltre la conduttività dei film polimerici consente il passaggio degli elettroni da uno strato all'altro e permette di coinvolgere nelle reazioni enzimatiche sia il cofattore che il mediatore immobilizzati in prossimità dell'elettrodo. Infine il mediatore, a stretto contatto con la superficie del trasduttore, può essere riossidato con maggiore semplicità applicando un opportuno potenziale di ossidazione, permettendo quindi la chiusura del ciclo catalitico.

Per quanto riguarda gli esperimenti descritti successivamente sia per l'approccio monolayer che per quello bilayer, i potenziali applicati per la polimerizzazione cronoamperometrica e la neutralizzazione sono stati definiti sulla base della caratterizzazione voltammetrica esplorativa delle specie presenti in soluzione.

2.5.2.2 Approccio monolayer.

Sulla base della nostra personale esigenza di capire come funzionasse ciascuna parte del biosensore bioenzimatico (ruolo del mediatore, dell'ALDH e del cofattore) si è pensato inizialmente di adottare un approccio monolayer per studiare singolarmente o in maniera collettiva il comportamento dei vari costituenti del biosensore. L'approccio monolayer prevede che cofattore,

mediatore ed enzimi siano immobilizzati in un unico step nel film di polipirrolo durante la polimerizzazione del monomero.

ALDH.

In una prima fase è stato costruito un elettrodo che contenesse solo polipirrolo, ALDH (direttamente responsabile della reazione redox a carico del substrato aldeidico) e cofattore β -NAD⁺ (necessario per l'attività catalitica dell'ALDH, come descritto nella reazione 1). L'ALDH è stato sempre immobilizzato nel film polimerico durante la fase di elettrodeposizione. Il cofattore è stato invece a) aggiunto nella soluzione prima dell'analisi oppure b) immobilizzato direttamente nel film in crescita.

Cofattore in soluzione.

È stata effettuata una voltammetria ciclica della soluzione acquosa contenente pirrolo (0,05 M) e LiClO₄ (0,1 M) (figura 2.22); essa mostra un processo anodico a +0,90 V, dovuto all'ossidazione del monomero pirrolico. La caratterizzazione voltammetrica è stata condotta in assenza della componente enzimatica, per evitare di sottoporre quest'ultima a non necessari stress redox che ne avrebbero potuto danneggiare l'attività.

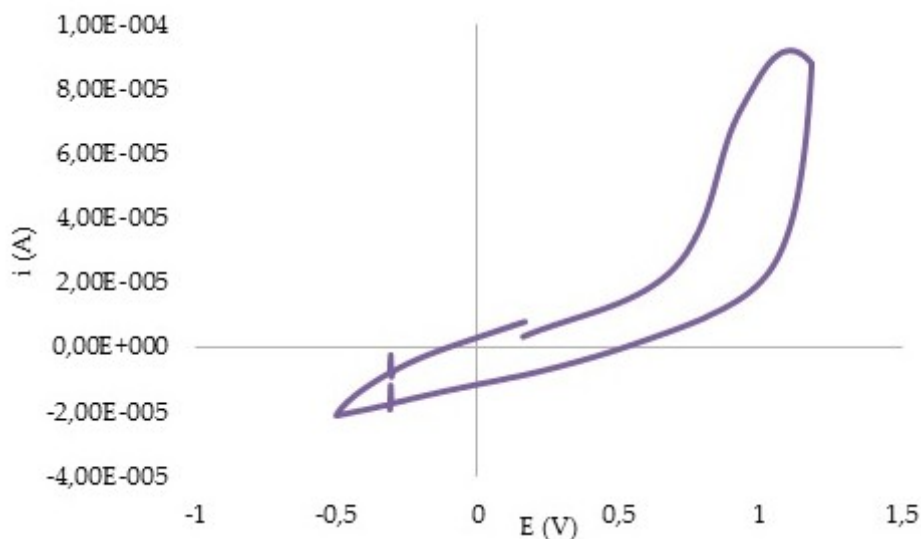


Figura 2.22. Voltammetria ciclica del sistema pirrolo 0,05 M e LiClO₄ 0,1 M in soluzione acquosa, E=-0,50V ÷ +1,20 V, v=100 mV*s⁻¹.

Una volta valutato il potenziale di ossidazione del pirrolo, alla soluzione è stato aggiunto ALDH, in concentrazione pari a 1U*mL⁻¹.

La polimerizzazione è stata effettuata per via cronoamperometrica polarizzando l'elettrodo a +0,92 V per 300 s (figura 2.23) ed il film ottenuto è stato neutralizzato a E=+0,70 V per 300 s, e quindi caratterizzato in tampone fosfato pH 7,5.

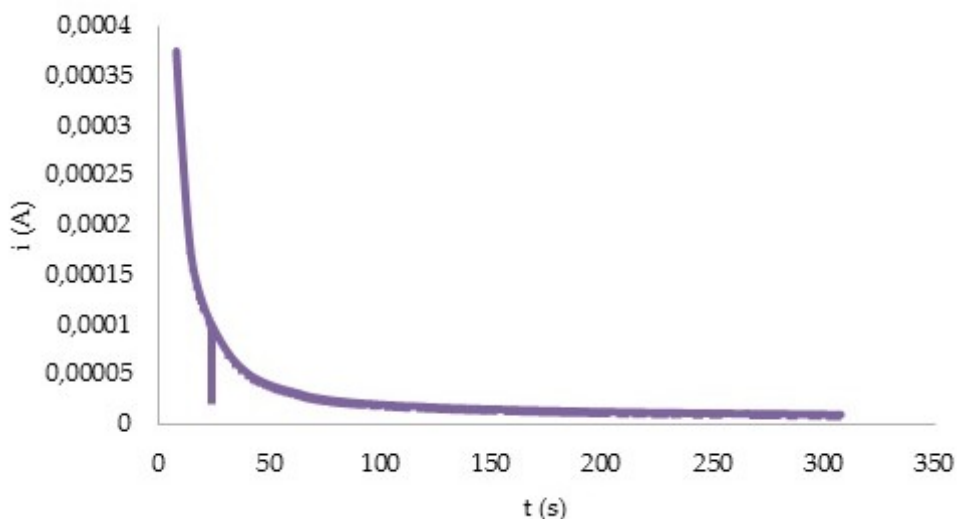


Figura 2.23. Deposizione cronoamperometrica a +0.92 V del film di polipirrolo/ ClO_4^- /ALDH in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5.

La caratterizzazione (figura 2.24) del film in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5 mostra un processo di doping a +0,80 V ed un largo processo di dedoping che va da -0,21 a -0,40 V.

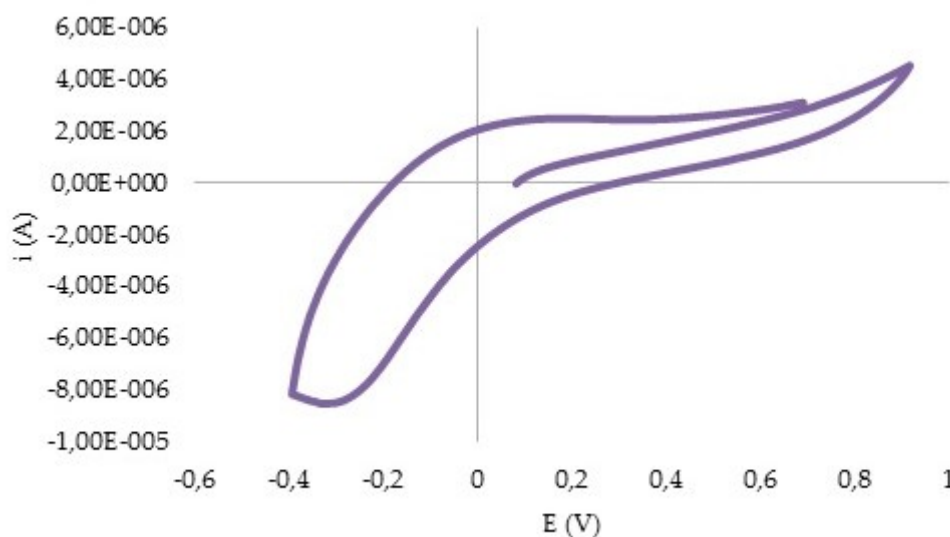


Figura 2.24. Caratterizzazione del film di polipirrolo/ ClO_4^- /ALDH $1 \text{ U}^* \text{ mL}^{-1}$ in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5.

Alla soluzione di tampone fosfato pH 7,5 è stata quindi addizionata una quantità di cofattore β -NAD⁺ tale da avere una concentrazione in cella pari a 0,003 M. Utilizzando il biosensore Pt/PPy/ClO₄/ALDH è stata effettuata una voltammetria ciclica su questo sistema che - com'è possibile osservare dalla figura 2.25 - lascia intravedere un nuovo processo anodico a +0,45 V, attribuibile alla riossidazione del β -NAD⁺. Il picco, assente nella prima scansione, compare invece nei cicli successivi.

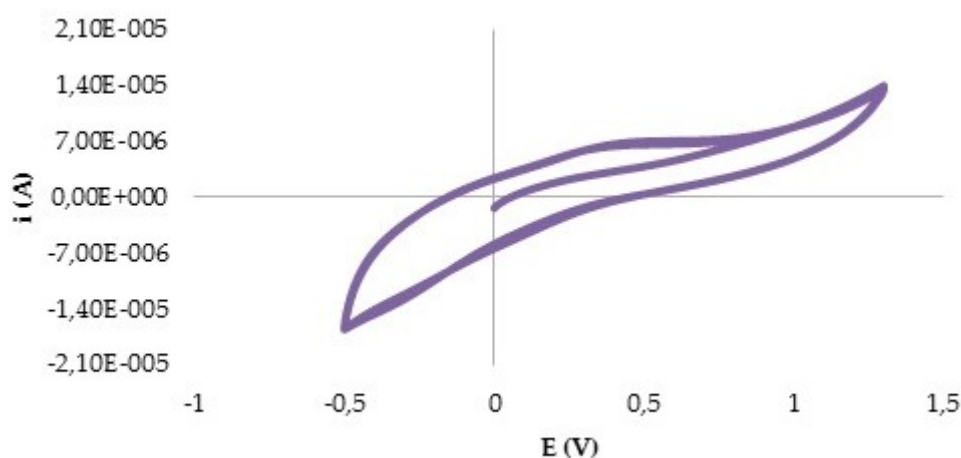


Figura 2.25. Caratterizzazione del film di Pt/PPy/ClO₄/ALDH in tampone fosfato pH 7,5 e β -NAD⁺ 0,003 M.

A questo punto il biosensore Pt/PPy/ClO₄/ALDH è stato testato, in presenza in soluzione del β -NAD⁺, mediante voltammetria ciclica in un intervallo di potenziali tra -0,50 e +1,30 V in tampone fosfato pH 7,5 con aggiunte crescenti di HMF, rendendo la soluzione finale progressivamente 10⁻⁴, 10⁻³, 5*10⁻³ M in analita. La calibrazione è stata eseguita in condizioni potenziodinamiche in modo tale da valutare in tempo reale processi di ossidazione o riduzione a carico dell'aldeide. Confrontando i diversi voltammogrammi registrati per le varie concentrazioni di HMF (figura 2.26), e il voltammogramma riportato in figura 2.37, non si osservano nuovi processi anodici o catodici. Le apparenti

variazioni di corrente relative ai processi ossidativi a +0,50 V non sono correlabili con l'ossidazione del gruppo aldeidico.

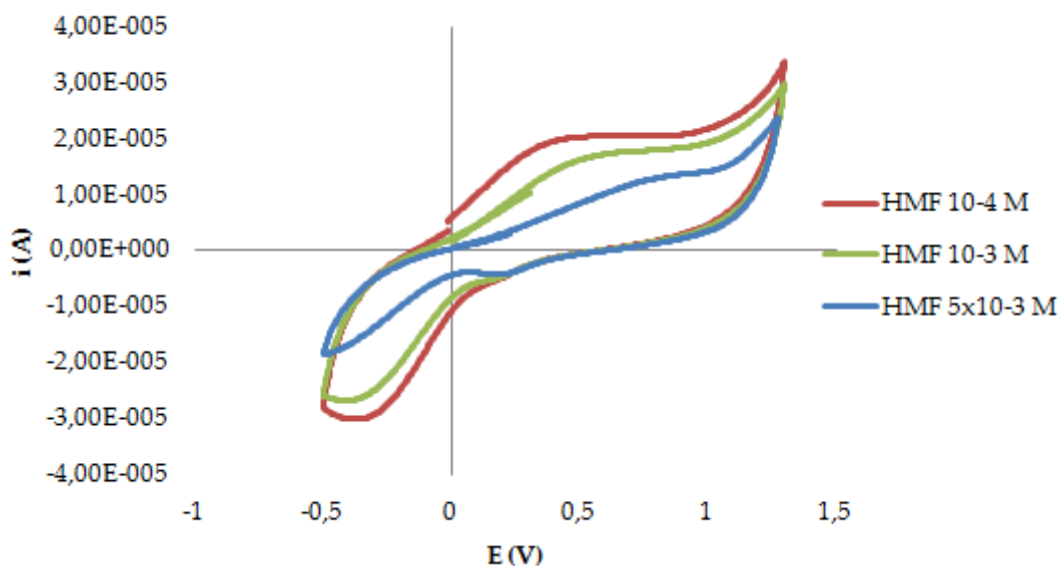


Figura 2.26. Calibrazione del biosensore Pt/Ppy/ ClO_4^- /ALDH in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,5 e $\beta\text{-NAD}^+$ 0,003M; $E = -0,50\text{V} \div +1,30\text{V}$, $v = 100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $[\text{HMF}] = 10^{-4}, 10^{-3}, 5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$.

La correlazione grafica delle intensità delle correnti in funzione delle concentrazioni del substrato aggiunto, riportata in figura 2.27, evidenzia una volta più in maniera inoppugnabile l'inadeguatezza del sensore ora messo a punto per la determinazione dell'HMF.

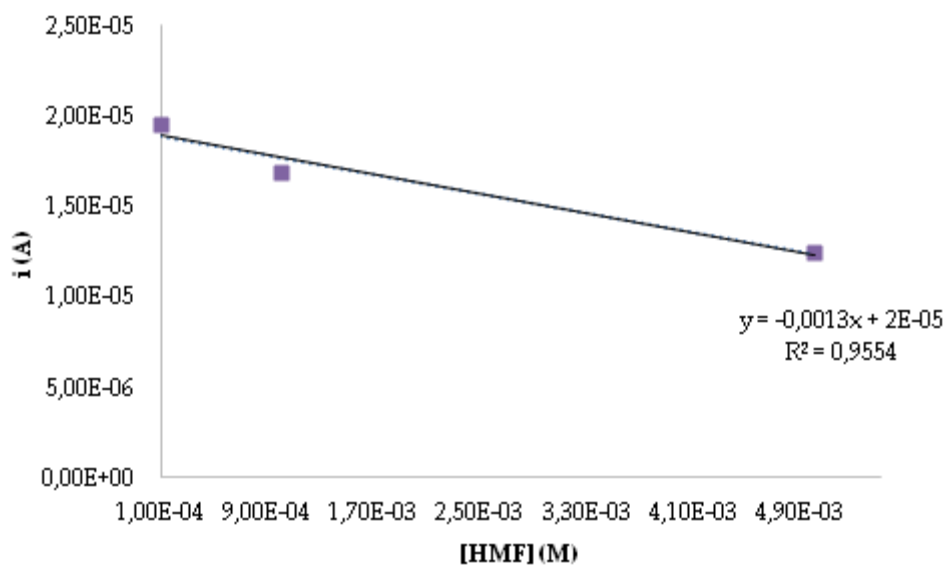


Figura 2.27. Dipendenza tra la risposta del biosensore e la concentrazione di HMF nel range $1 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$ M.

Cofattore immobilizzato.

In una seconda prova l'elettrodo di Pt è stato modificato mediante deposizione di un unico film di polipirrolo/LiClO₄/ALDH/ β -NAD⁺. Dopo una preliminare voltammetria ciclica esplorativa sul sistema pirrolo 0,05 M e LiClO₄ 0,1 M, di aspetto del tutto analogo a quello osservato in prove precedenti (figura 2.22), è stato aggiunto l'enzima in concentrazione pari a 1 U*mL⁻¹ ed è stata effettuata direttamente la polimerizzazione a E= +1,0 V. Il polimero ottenuto è stato neutralizzato (come da esperimenti condotti in precedenza) a E= +0,60 V in tampone fosfato a pH 7,5 e quindi caratterizzato nella stessa soluzione. L'andamento del voltammogramma relativo alla caratterizzazione (figura 2.28) presenta un processo di doping a +0,80 V e uno di dedoping a -0,32 V. Per quanto riguarda il cofattore, l'assenza del picco relativo al processo di ossidazione è probabilmente attribuibile ad una sovrapposizione con il doping

polimerico, in quanto, generalmente, durante le voltammetrie cicliche è stato sempre osservato intorno a +0,60 V.

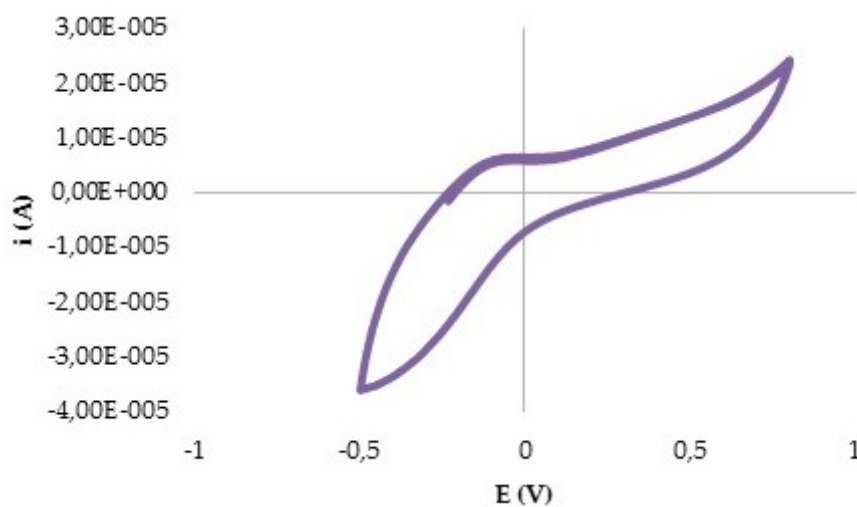


Figura 2.28. Caratterizzazione voltammetrica del biosensore Pt/Ppy/CIO₄/ALDH/ β -NAD⁺ in tampone fosfato pH 7,5; E= -0,50 V ÷ + 0,80 V v=100 mV*s⁻¹.

Anche in questo caso la calibrazione del biosensore a +0,60 V non ha comunque portato ad apprezzabili variazioni di corrente per aggiunte crescenti di HMF (figura 2.29).

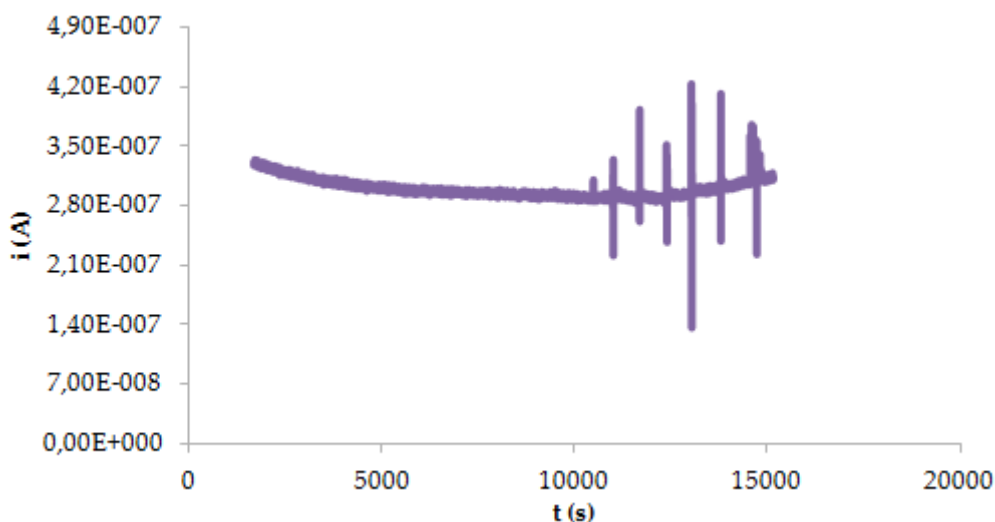


Figura 2.29. Calibrazione del biosensore Pt/Ppy/CIO₄⁻/ALDH/β-NAD⁺ in tampone fosfato pH 7,5; [HMF] = 10⁻⁴ ÷ 5*10⁻³ M; E= +0,60 V.

ALDH e Diaforasi.

Dopo aver verificato che l'immobilizzazione indipendente dell'ALDH, componente enzimatico funzionale all'ossidazione dell'HMF nei film di polipirrolo non permette di ottenere un biosensore in possesso di una risposta utile, si è ipotizzato in *extrema ratio* che ALDH e Diaforasi possano in qualche modo aver necessità d'operare in maniera sinergica, e si è pertanto deciso di bloccarli in un unico film polimerico in presenza sia del mediatore che del cofattore.

Questa volta il biosensore è stato preparato polimerizzando in cronoamperometria a E= +1,10 V una soluzione 0,05 M in pirrolo, 0,003 M in K₄[Fe(CN)₆], 0,003 M in β-NAD⁺, e contenenti ALDH e diaforasi, entrambi in concentrazione pari a 1U*mL⁻¹. Il polimero risultante è stato neutralizzato polarizzando l'elettrodo con esso modificato a E=+0,60 V per 300, indi è stato caratterizzato attraverso voltammetria ciclica in tampone fosfato pH 7,5, nell'intervallo di potenziali tra -0,40V e +1,0 V. Il film (figura 2.30) mostra un

processo anodico a +0,75 V associabile al doping del polimero, ed un picco a +0,05 V attribuibile a processi di de-doping, come rivelato da scansioni catoanodiche condotte tra -0,40 e +0,50 V, che evidenziano la graduale scomparsa del picco catodico. La calibrazione del biosensore monolayer è stata eseguita a -0,15 V in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5 (figura 2.31).

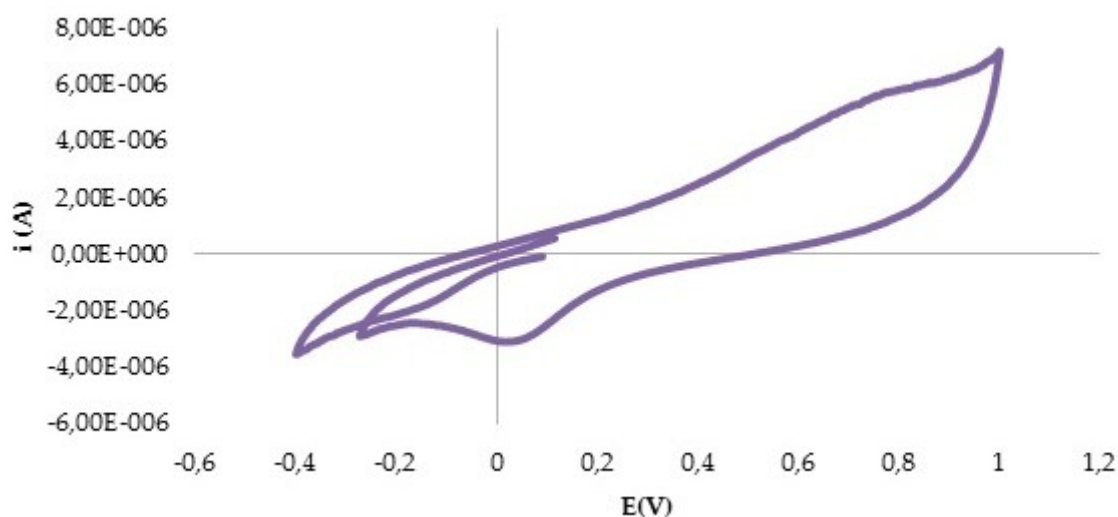


Figura 2.30. Caratterizzazione del film di polipirrolo/ $K_4[Fe(CN)_6]$ / NAD^+ /ALDH/Diaph in tampone fosfato a pH 7.5.

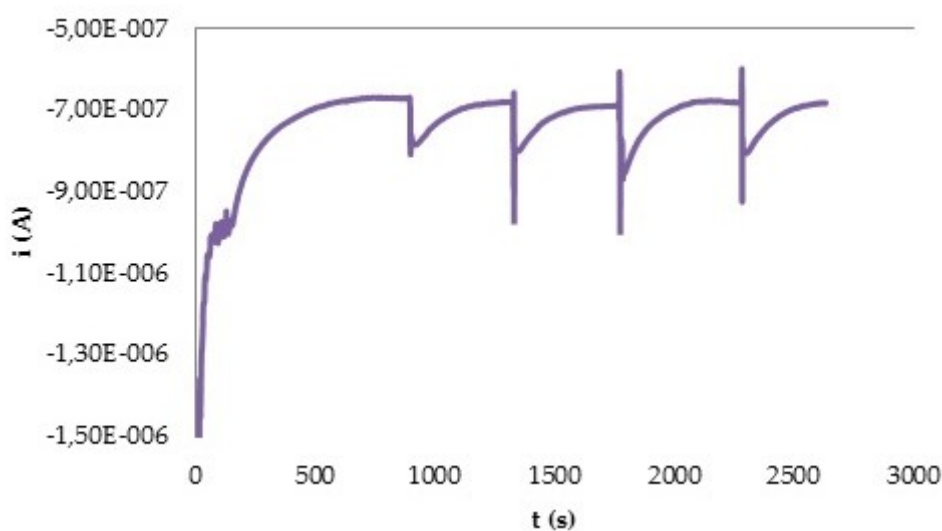


Figura 2.31. Calibrazione del biosensore monolayer Pt/PPy/ $K_4Fe(CN)_6$ / NAD^+ /ALDH/Diaph in Tampone fosfato pH 7,0 con $[HMF] = 10^{-6} \div 10^{-5}$ M; $E = -0,15$ V con $[HMF] = 10^{-6}$ M \div 10^{-5} M.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Come evidenziato dalla curva di calibrazione riportata in figura 2.31, le aggiunte di quantità crescenti di HMF non hanno portato ad alcuna variazione significativa della corrente monitorata dal biosensore. È stato per tale motivo deciso di adottare un approccio bilayer.

2.5.2.1 Approccio bilayer.

Il primo film di polipirrolo è stato generato da una soluzione contenente, oltre al monomero, il mediatore redox ($K_4[Fe(CN)_6]$) e il cofattore (β -NADH). Su questo primo film ne è stato depositato un secondo a partire da una soluzione contenente ancora pirrolo, $LiClO_4$ come elettrolita di supporto, e gli enzimi ALDH e diaforasi. Entrambi i film sono stati caratterizzati in tampone fosfato a pH 7,5.

ALDH e Diaforasi.

In particolare, il primo film di polipirrolo è stato depositato su un elettrodo a disco di Pt per polimerizzazione di una soluzione acquosa di pirrolo 0,05 M, in presenza di $K_4[Fe(CN)_6]$ 0,01 M e NADH 0,003 M. La scelta del cofattore nella forma ridotta è dettata dal fatto che ai potenziali applicati per la polimerizzazione il cofattore si trova nella forma ossidata, ovvero nella forma attiva perché il ciclo enzimatico abbia luogo. Il voltammogramma della soluzione contenente monomero, mediatore e cofattore (figura 2.32) presenta un primo picco anodico a +0,33 V, a cui è associato un picco di ritorno a +0,14 (sistema catoanodico attribuibile alla coppia $[Fe(CN)_6]^{3+}/[Fe(CN)_6]^{4+}$), seguito da un secondo picco anodico poco evidente a +0,62 V, dovuto all'ossidazione del cofattore, e infine da un terzo a +0,90 V dovuto all'ossidazione del monomero pirrolico.

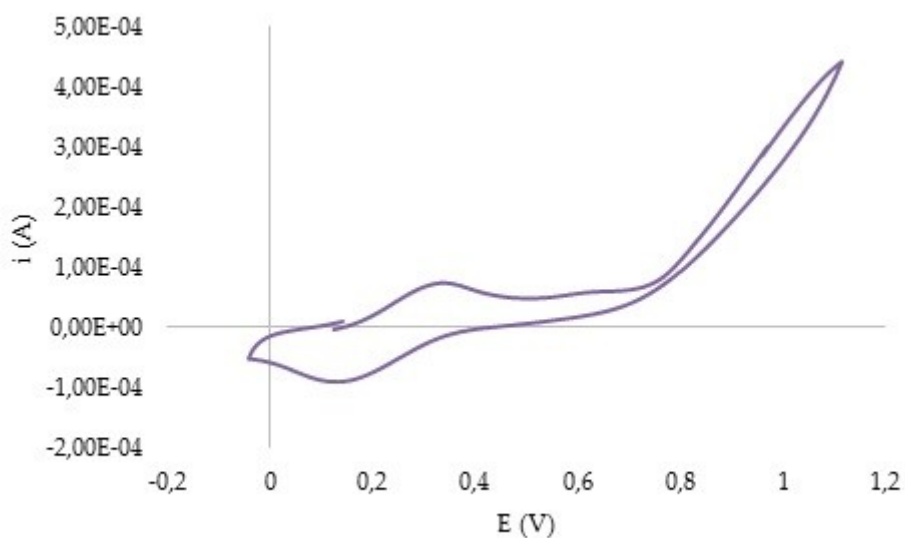


Figura 2.32. CV di una soluzione di pirrolo 0,05 M, $K_4[Fe(CN)_6]$ 0,01 M e NADH 0,003 M a $E = -0,02 \div +1,10$ V $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Il film è stato ottenuto per elettropolimerizzazione imponendo all'elettrodo lavorante un potenziale di +1,0 V per 300 s e quindi neutralizzando il deposito polarizzandolo a +0,70 V per 300s in tampone fosfato a pH 7,5.

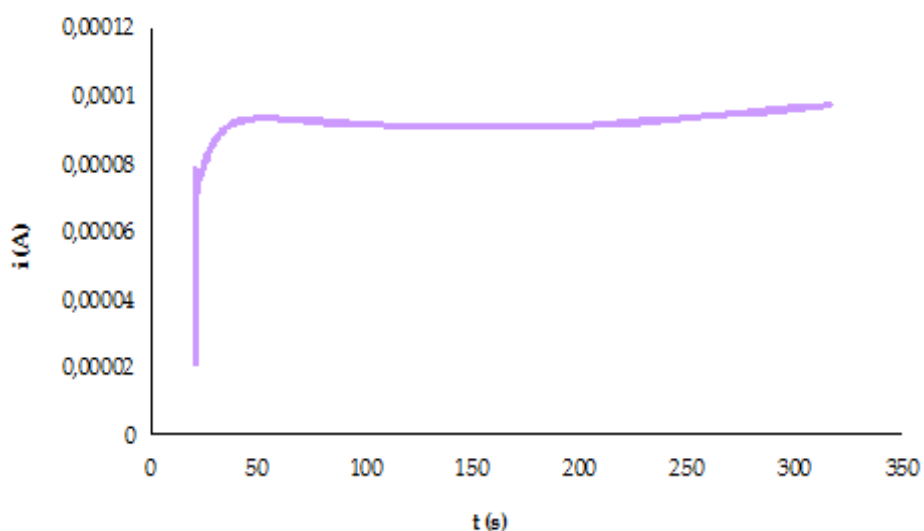


Figura 2.33. Risposta cronoamperometrica dell'elettropolimerizzazione a $E = +1,0$ V per 300 s.

La caratterizzazione del primo film (figura 2.34) mostra la presenza di un primo processo anodico a +0,23 V attribuibile all'ossidazione del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, cui è associato un processo catodico a +0,15 V dovuto alla reazione inversa. Il processo più anodico, tra +0,63 V e +1,0 V è attribuibile al doping del polimero, e probabilmente maschera il processo di ossidazione del cofattore. Analogamente, il corrispondente processo di de-doping, localizzato tra +0,15 V e -0,03 V, si sovrappone al processo di riduzione del mediatore.

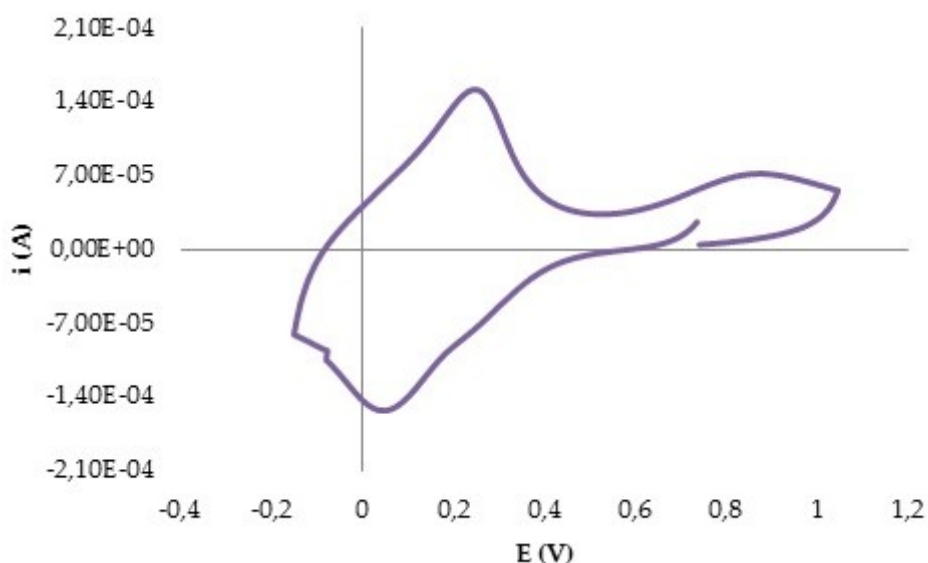


Figura 2.34. Caratterizzazione del film PPy/ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ /NAD⁺ in tampone fosfato pH 7,5 E = -0,20 V ÷ 1,15 V.

La deposizione del secondo film di polipirrolo è stata effettuata per cronoamperometria ad un potenziale di +0,95 V per 180 s sull'elettrodo precedentemente ottenuto (figura 2.35), immerso in una soluzione acquosa di pirrolo 0,05 M, LiClO₄ 0,1 M, ALDH e Diaph (1 U*mL⁻¹) in rapporto 1:1.

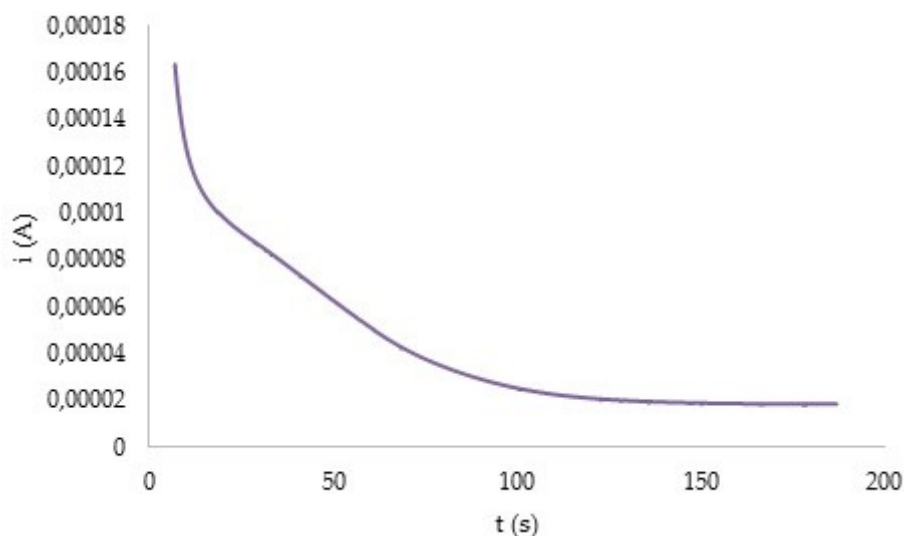


Figura 2.35. Polimerizzazione a $E = +0,95$ V di una soluzione di pirrolo 0,05 M in presenza di LiClO_4 0,1 M, ALDH e Diaph (entrambi $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

La caratterizzazione di questo film (figura 2.36) mostra ancora il processo redox della coppia $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$ ed i processi relativi al doping (+1,0 V) e de-doping (+0,59 V) del polimero risultano evidenti a potenziali leggermente più anodici rispetto a quelli che hanno caratterizzato il primo film. In prossimità del picco relativo all'ossidazione dello ione $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$ si osserva una spalla, tra +0,10 e +0,21 V, probabilmente dovuta agli enzimi inglobati nel film polimerico.

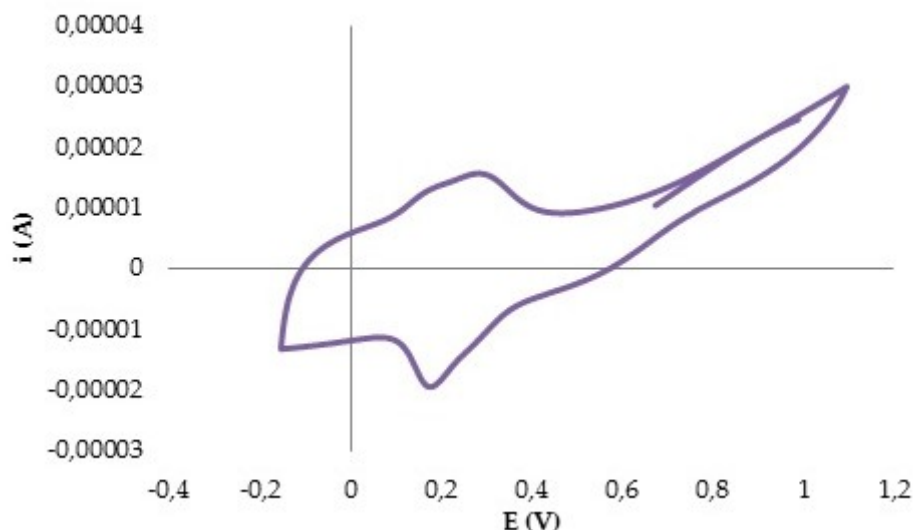


Figura 2.36. Caratterizzazione del biosensore Pt/[Fe(CN)₆]³⁻/NAD⁺/Ppy/ClO₄⁻/ALDH/Diaph in tampone fosfato pH 7,5.

Del biosensore così preparato è stata valutata l'applicabilità nella determinazione dell'HMF. Tutte le misure sono state effettuate in una soluzione di tampone fosfato a pH 7,5, in modo da sfruttare la massima attività catalitica di entrambi gli enzimi. Sulla base di dati di letteratura (6) le determinazioni analitiche sono state effettuate applicando all'elettrodo di lavoro un potenziale pari a -0,15 V. Tale valore dovrebbe essere sufficiente a ripristinare il ciclo catalitico. Le determinazioni effettuate in queste condizioni sperimentali nel range di concentrazione di analita compreso tra 1×10^{-6} e 1×10^{-5} M hanno evidenziato, a differenza di quanto ottenuto sinora nell'approccio monolayer, una risposta congruente del biosensore, ancorchè caratterizzata da una linearità non ottimale, come evidenziato nella figura 2.37 e 2.38.

Successive modifiche dello spessore di uno o di entrambi i film polimerici (primo film di spessore compreso tra i 100 nm e 5 μ m; secondo film di spessore compreso tra i 50 nm e 840 nm) non hanno comportato variazioni sostanziali nella risposta del dispositivo.

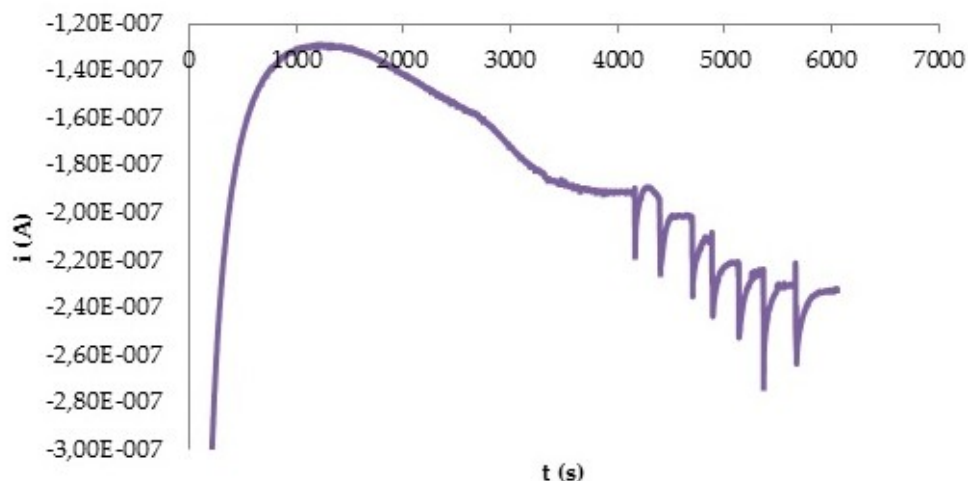


Figura 2.37. Risposta del biosensore bilayer a $E = -0,150$ V in tampone fosfato pH 7,5 per aggiunte ripetute di HMF. Range di concentrazione esplorato: 10^{-6} M \div 10^{-4} M.

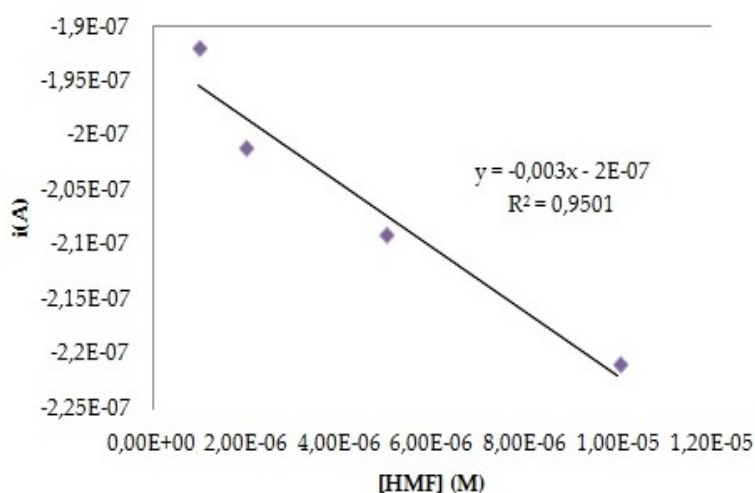


Figura 2.38. Retta di calibrazione del biosensore bilayer per $[HMF] = 1 \cdot 10^{-6}$ e $1 \cdot 10^{-5}$ M

Stante le perfettibili prestazioni del biosensore bilayer sinora messo a punto, si è tentato di ottimizzare i principali parametri operativi. In prima istanza si è cercato di modificare il potenziale di lavoro, nell'ipotesi che il medesimo non fosse congruente al completamento del ciclo enzimatico. Pertanto è stato imposto – come potenziale elettrodico - un valore per cui il mediatore si trovasse perlopiù nella forma ossidata. Sulla base del responso voltammetrico il potenziale di lavoro è stato quindi portato al valore di +0,30 V. In queste

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

condizioni, tuttavia, la corrente (ora anodica...) del responso non si stabilizza e – soprattutto – non è in alcuna maniera correlata alle aggiunte che vengono effettuate (figura 2.39).

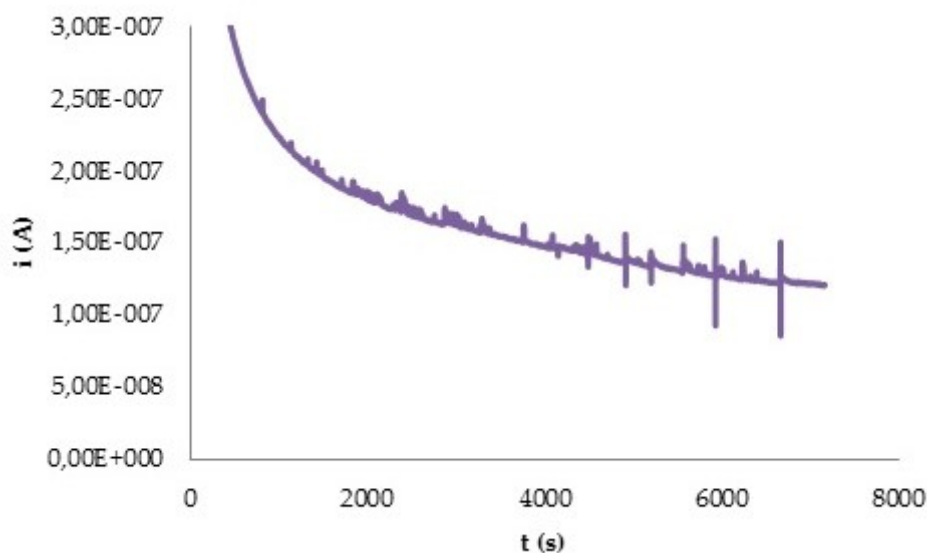


Figura 2.39. Risposta del biosensore bilayer a $E = +0,30$ V in Tampone fosfato pH 7,5 per aggiunte ripetute di HMF. Range di concentrazione esplorato: 10^{-6} M ÷ 10^{-5} M.

Tra i diversi parametri critici nella messa a punto di un biosensore, la concentrazione dei diversi componenti è uno tra quelli di maggior importanza. Per questo motivo sono state effettuate diverse deposizioni, sempre con l'approccio bilayer, cercando di ottimizzare la concentrazione di monomero (tra 0,1 e 0,05 M), cofattore (tra 0,003 e 0,03 M), mediatore (tra 0,003 e 0,01 M), ALDH e Diaforasi (entrambi tra 1 e 30 U/mL), e – come prima accennato - lo spessore complessivo del film polimerico risultante (da 250 nm a 5 μ m)

Il miglior risultato ottenuto da questa procedura di ottimizzazione è riportato nella figura seguente (2.40), cui fa riscontro la curva di calibrazione di cui alla figura 2.41, ottenuta nel sottoinsieme di concentrazioni di HMF tra 2×10^{-8} – 1×10^{-7} M.

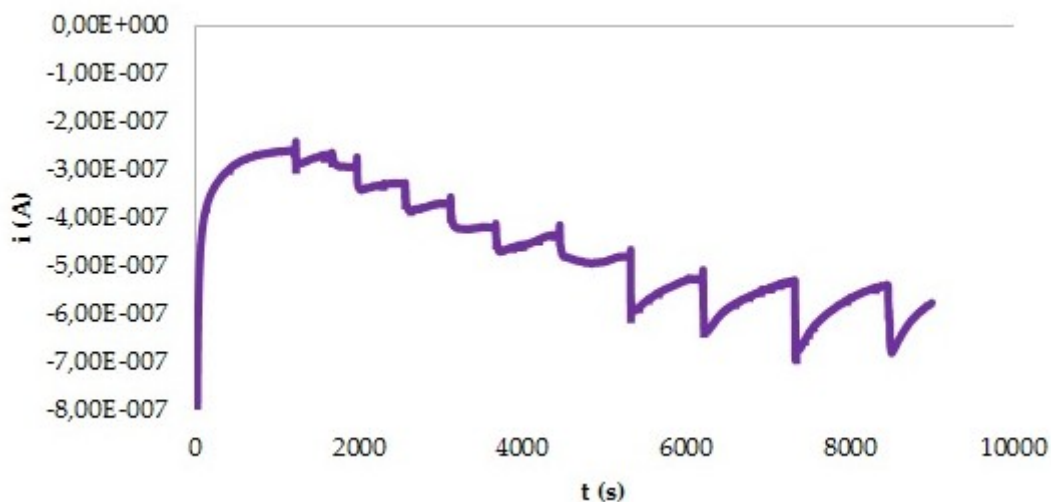


Figura 2.40. Risposta del biosensore Pt/PPy 0,05 M/[Fe(CN)₆]⁴⁻ 0,01 M/ β -NAD⁺ 0,003 M/Ppy 0,05 M/ClO₄⁻0,1 M/ALDH/Diaph 1U*mL⁻¹, in tampone fosfato pH 7,5, in un range di [HMF]=10⁻⁸ – 10⁻⁶ M. E=-0,150 V. Spessore dei film: 5 μ m

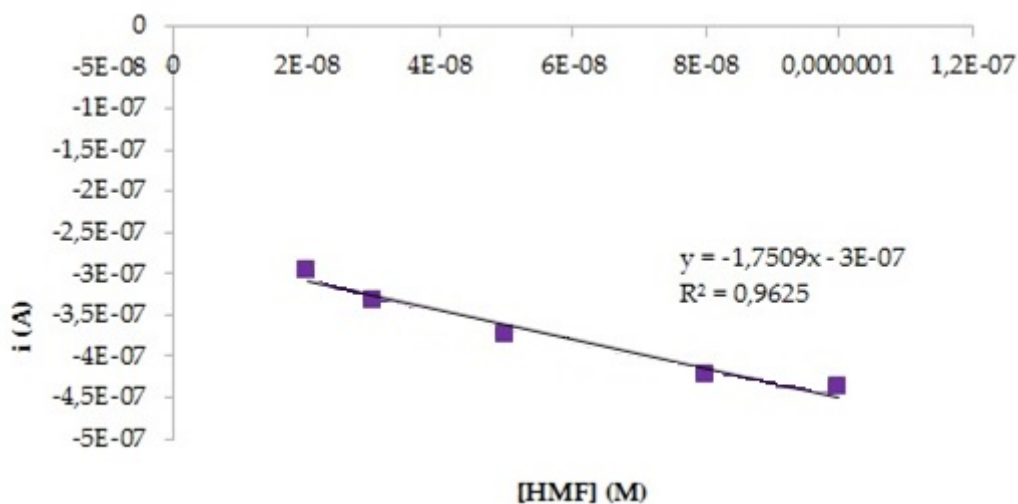


Figura 2.41. Curva di calibrazione del biosensore Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄⁻/ALDH/Diaph nell'intervallo di [HMF]= 2*10⁻⁸ – 1*10⁻⁷ M.

A causa dei risultati poco incoraggianti ottenuti nelle prove precedenti, si è cercato di studiare e comprendere il comportamento del solo enzima ALDH,

responsabile del processo di ossidazione del gruppo aldeidico ed in definitiva promotore del totale funzionamento del biosensore. *ALDH*.

Nel tentativo di comprendere il funzionamento del biosensore, e nella consapevolezza che il ruolo della diaforasi – fondamentale ove si operi in matrice reale – diviene marginale ove si cerchi di valutare la risposta del sensore in termini di aggiunte standard di un unico analita puro - è stato progettato un biosensore bilayer inglobando nel film più interno il mediatore $K_4[Fe(CN)_6]$, mentre nel film più esterno è stato bloccato l'enzima *ALDH* e il cofattore.

La deposizione del secondo film è stata eseguita da una soluzione acquosa contenente pirrolo (0,05 M), $LiClO_4$ (0,1 M), *ALDH* ($1U \cdot mL^{-1}$) e β -NADH ($3 \cdot 10^{-3}$ M).

L'andamento della voltammetria ciclica del primo film è confrontabile con quelle viste nelle precedenti caratterizzazioni di tale sistema solvente/elettrolita. Come consuetudine, la caratterizzazione, è stata fatta in CV in una soluzione di tampone fosfato 0,1 M, pH 7,5, ciclando in un range di potenziali compreso tra -0,20 V e +1,10 V. Il voltammogramma del primo film, riportato in figura 2.42, presenta un processo anodico a +0,90 V attribuibile al doping del polipirrolo. Il picco anodico, a +0,20 V, è dovuto alla reazione di ossidazione del mediatore, cui è associato un picco di ritorno a +0,05 V.

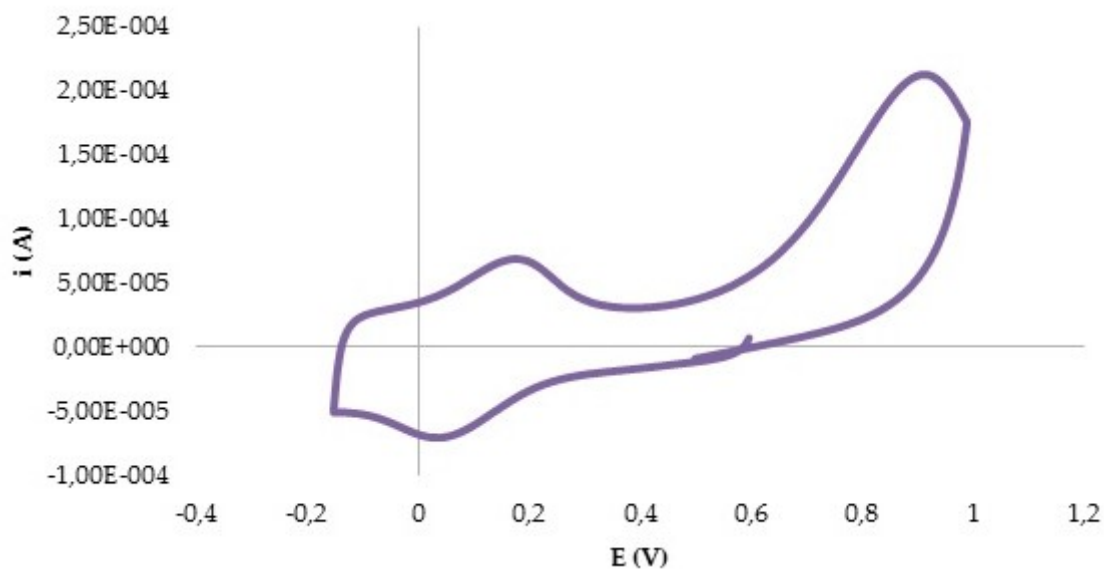


Figura 2.42. Caratterizzazione del film di polipirrolo/ $K_4[Fe(CN)_6]$ in tampone fosfato pH 7,5 ed $E = -0,20 \div +1,0$ V, $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Il secondo film polimerico contenente l'enzima è stato elettropolimerizzato a +1,0 V per 300 s, ed il film depositato è stato quindi neutralizzato.

Il secondo film di polipirrolo è stato ugualmente caratterizzato tramite CV in tampone fosfato, pH 7,5, operando in un intervallo di potenziali tra -0,20 V e +1,10 V a $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Il voltammogramma mostra un processo anodico a +1,0 V (doping). Il picco anodico a +0,21 V e quello di riduzione ad esso associato ($E = +0,18$ V) sono invece attribuibili ai processi redox del sistema $[Fe(CN)_6]^{4+}/[Fe(CN)_6]^{3+}$ (figura 2.43).

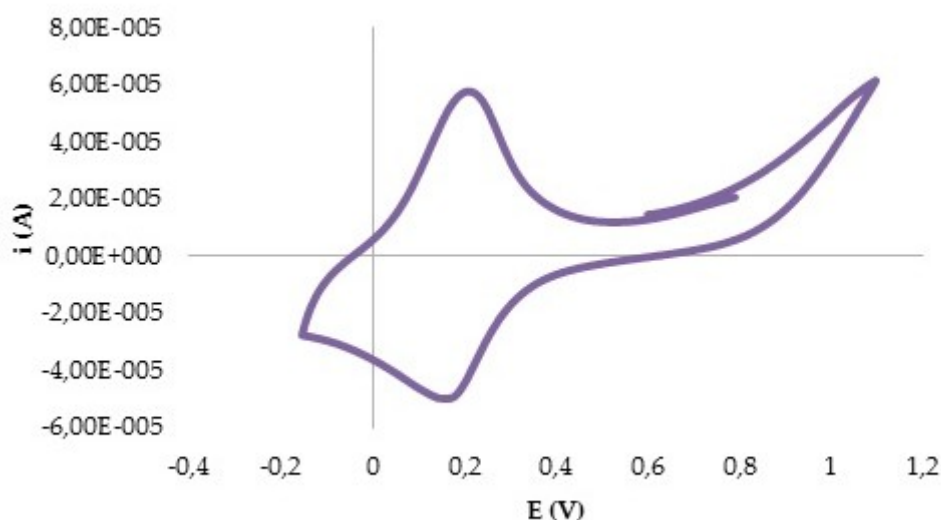


Figura 2.43. Caratterizzazione del biosensore Pt/Ppy/K₄Fe(CN)₆/Ppy/LiClO₄/ALDH/ β -NAD⁺ in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5 E=-0,20 V÷ +1,10 V v= 100 mV*s⁻¹.

Il biosensore così preparato è stato testato polarizzandolo a E= +0,40 V, potenziale al quale il mediatore si trova certamente nella sua forma ossidata, come visibile dalla figura 2.43, e in modo tale da poter essere coinvolto nel sistema enzimatico. La calibrazione è stata effettuata in tampone fosfato pH 7,5 aggiungendo quantità crescenti di HMF ($10^{-6} \div 10^{-5}$ M). La scelta del potenziale di calibrazione è correlata al responso della caratterizzazione del biosensore riportato in figura 2.43.

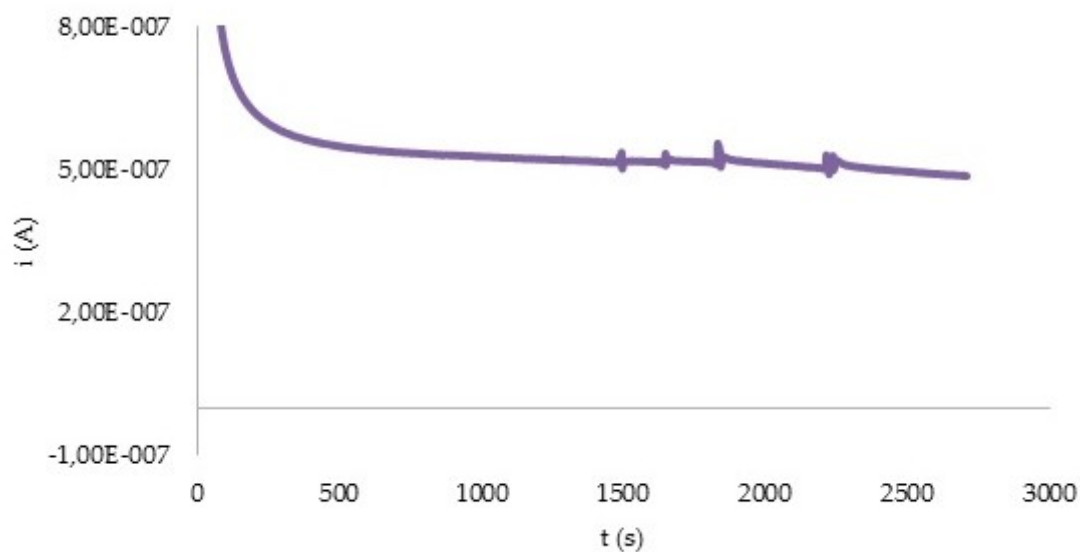


Figura 2.44. Calibrazione biosensore Pt/Ppy/K₄[Fe(CN)₆]/Ppy/LiClO₄/ALDH/NAD⁺ a E= +0,40V.

Anche la modifica del potenziale di polarizzazione elettrodoica non determina purtroppo l'ottenimento di una risposta elettrodoica congruente con le aggiunte di HMF. La figura 2.45, sotto riportata, dà conto dell'andamento ottenuto.

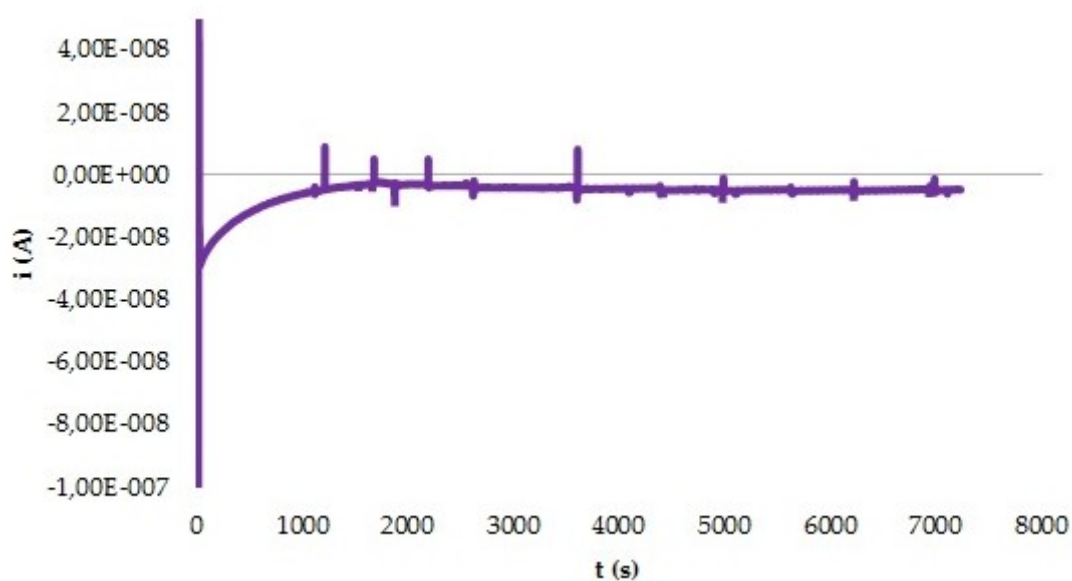


Figura 2.45. Calibrazione biosensore Pt/Ppy/K₄[Fe(CN)₆]/Ppy/LiClO₄/ALDH/NAD⁺ a E= -0,15 V.

Poiché anche le prove effettuate impiegando soltanto l'enzima ALDH non hanno portato all'ottenimento di un biosensore caratterizzato da una risposta plausibile all'analita, si è deciso di procedere direttamente con un approccio sperimentale differente, ovvero l'intrappolamento tramite cross-linking.

2.5.3 Immobilizzazione enzimatica con BSA e GA.

Ipotizzando che le tecniche d'immobilizzazione enzimatica per intrappolamento possano essere non ottimali per questo tipo di biosensori, ed anche sulla base dei risultati soddisfacenti ottenuti nella prima parte della tesi immobilizzando l'enzima GOx (vedi paragrafo 2.3.3 b – biosensore per il glucosio) attraverso la tecnica di cross-linking con BSA e GA, si è deciso di testare questa strategia dapprima per l'ALDH, e poi per la coppia ALDH/diaforasi.

ALDH.

L'elettrodo di Pt è stato modificato con un film di polipirrolo, usando LiClO₄ come elettrolita di supporto. Il voltammogramma della soluzione di pirrolo (0,05 M) e di LiClO₄ (0,1 M) è stato registrato tra -0,50 e +1,20 V. Come mostra la figura 2.46 si nota un processo anodico tra +0,83 e +1,20 V, attribuibile all'ossidazione del frammento pirrolico. La polimerizzazione è stata quindi effettuata per cronoamperometria, imponendo un potenziale costante di +1,0 V all'elettrodo lavorante per 300 s, ed il polimero è stato quindi neutralizzato polarizzando il deposito a 0 V, sempre per 300 s, in tampone fosfato pH 7,5.

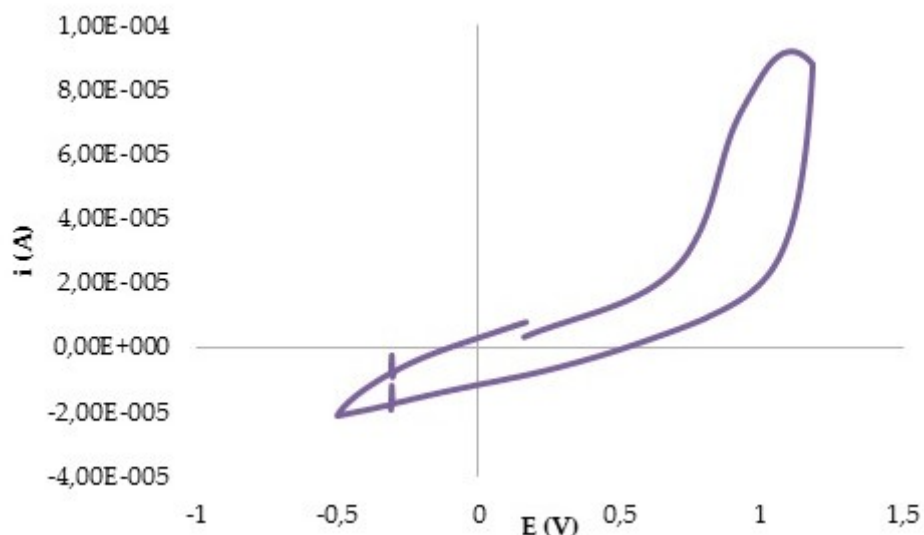
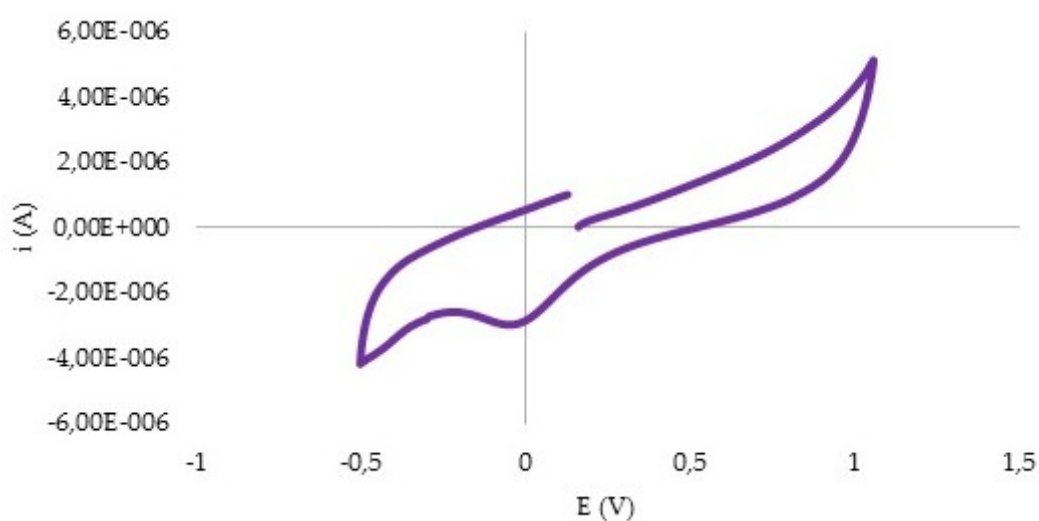


Figura 2.46. Voltammetria ciclica del sistema pirrolo 0,05 M, LiClO₄ 0,1 M in tampone fosfato pH 7,5.

Il film polipirrolico è stato quindi modificato immergendolo dapprima per 10 volte in una soluzione di ALDH (4,5 U/500 μ L) in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5, poi un'unica volta dapprima in una soluzione di BSA 2% e poi in GA 1%. Il biosensore è stato quindi caratterizzato mediante voltammetria ciclica in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,5 ed in presenza di β -NAD⁺ 0,003 M (figura 2.47). Per questo step, facendo riferimento alla reazione 1 si è deciso di non coinvolgere il mediatore.



Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Figura 2.47. caratterizzazione del film Ppy/ ClO_4^- in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5; $E = -0,50 \text{ V} \div +1,10 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Il dispositivo è stato calibrato, attraverso voltammetria ciclica scansionando il potenziale tra $-0,50 \text{ V}$ e $+1,10 \text{ V}$, con aggiunte crescenti di HMF (soluzioni finali pari rispettivamente a 10^{-4} , 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ in analita). Lo scopo dell'esperimento era quello di valutare l'insorgenza di eventuali variazioni morfologiche del voltammogramma, in seguito ad aggiunte progressive di analita. I voltammogrammi, singolarmente registrati per ciascuna concentrazione di HMF e quindi sovrapposti, sono riportati in figura 2.48. Com'è facilmente constatabile dall'osservazione della figura non vi è alcuna variazione della morfologia del responso voltammetrico che possa esser in qualche modo associato alle aggiunte di analita, come poi confermato da analogo esperimento effettuato in cronoamperometria anche su range di concentrazioni di analita inferiori di alcuni ordini di grandezza a quelle utilizzate in CV.

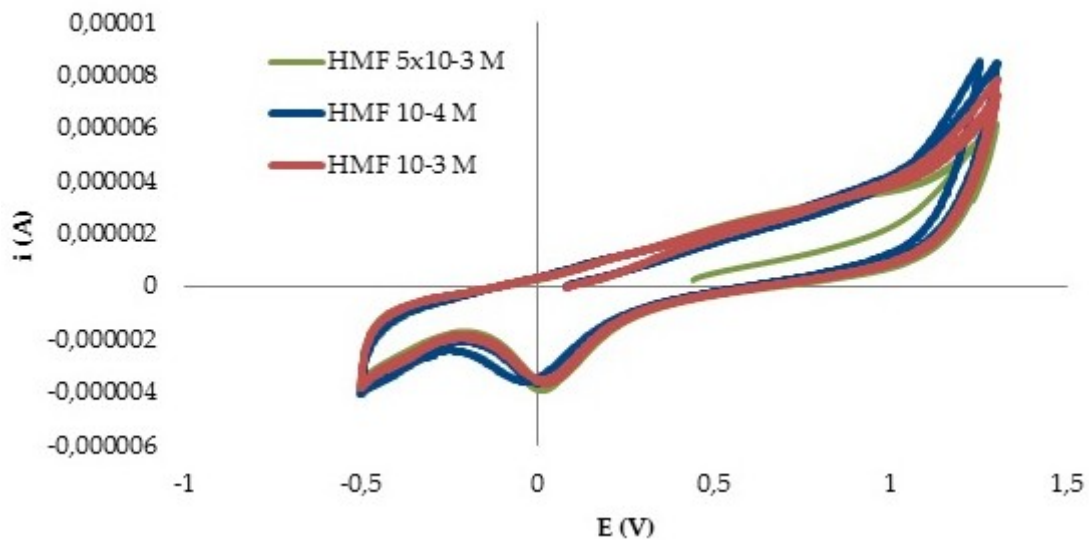


Figura 2.48. Calibrazione del biosensore in voltammetria ciclica nel range di potenziali compreso tra $-0,50 \div +1,10 \text{ V}$. $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, tampone fosfato a pH 7,5 e $\beta\text{-NAD}^+$ $0,003 \text{ M}$, con $[\text{HMF}] = 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

ALDH e Diaforasi.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Dal momento che l'immobilizzazione del solo enzima ALDH tramite cross-linking con BSA e GA non ha fornito evidenze di biosensori funzionanti, si è di nuovo ipotizzato – come già accaduto per i tentativi di immobilizzazione per polimerizzazione single layer - che il funzionamento del dispositivo potesse essere dovuto all'azione sinergica dei due enzimi. Pertanto anche in presenza di agenti cross-linkanti quali BSA e GA si è deciso di costruire un biosensore in cui sia ALDH che la diaforasi fossero contemporaneamente presenti.

È stato quindi depositato su un elettrodo di Pt un film di polipirrolo a partire da una soluzione acquosa di 0,05 M in monomero, 0,01 M in $K_4[Fe(CN)_6]$ e 0,003 M in β -NAD⁺. La figura 2.49 riporta il voltammogramma relativo a questo sistema, in cui è possibile notare la formazione di un nuovo picco a circa +0,60 V dovuto all'ossidazione del NADH, mentre il picco a ca. +0,40 V ed il picco di ritorno associato a +0,1 V sono attribuibili rispettivamente all'ossidazione e alla riduzione del mediatore.

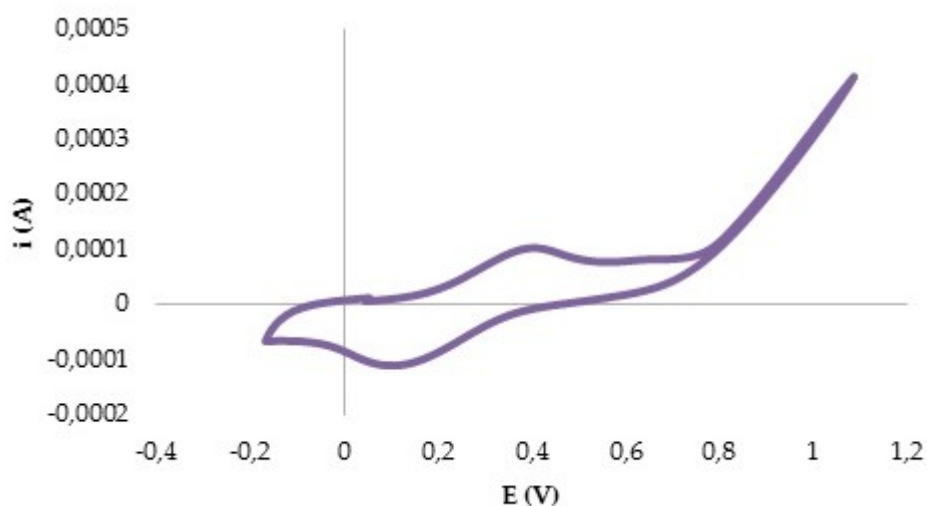


Figura 2.49. Voltammetria ciclica del sistema pirrolo 0,05 M, $K_4[Fe(CN)_6]$, 0,01 M, NADH 0,003 M, $E = -0,2 \div +1,2$ V, $v = 100$ mV*s⁻¹. WE= Pt, RE= Ag/AgCl, CE= Pt.

In funzione di quanto emerso dalla voltammetria ciclica si effettua la polimerizzazione in cronoamperometria a +0,95 V per una durata di 300 secondi. Il film, neutralizzato come nelle prove precedenti e caratterizzato in tampone fosfato a pH 7,5, è stato quindi modificato con i biocatalizzatori.

La deposizione degli enzimi è stata eseguita attraverso immersioni rapide dell'elettrodo modificato in soluzioni contenenti gli enzimi, ALDH e diaforasi (entrambi in concentrazioni pari ad 1 U/mL in soluzioni tampone fosfato rispettivamente a pH = 7 e pH = 8).

I due enzimi sono stati bloccati sulla superficie del polimero tramite cross-linking con albumina di siero bovino (BSA) 2% e glutaraldeide (GA) 1% (preparata diluendo 80 μ L di una soluzione di GA al 25% in 1 mL di tampone fosfato pH 7,5).

Il biosensore è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente per 30 minuti e quindi sottoposto a calibrazione ad un potenziale di -0,15 V utilizzando soluzioni di HMF a concentrazione nota e crescente compresa tra $1 \cdot 10^{-8}$ M e 10^{-4} M (figura 2.50).

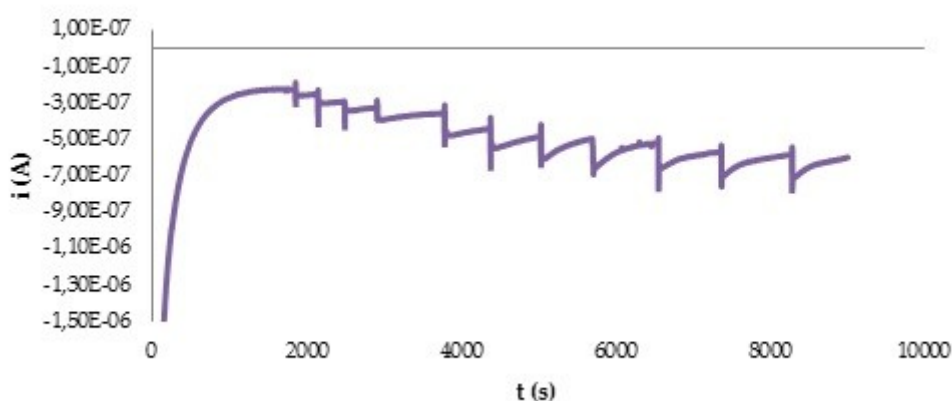


Figura 2.50. Grafico corrente tempo per il biosensore Pt/PPy- $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}/\beta\text{-NAD}^+/\text{ALDH}/\text{Diaph}/\text{BSA}/\text{GA}$ in tampone fosfato pH 7,5 con HMF = $1 \cdot 10^{-8} \div 1 \cdot 10^{-4}$ M a E=-0,15 V.

Come si può notare dalle figure 2.51 e 2.52, la risposta del biosensore sembra limitata a valori di concentrazione bassi (da $2 \cdot 10^{-8}$ a $2 \cdot 10^{-7}$ M), con un range di linearità di solo un ordine di grandezza. Nonostante in letteratura siano riportati diversi contributi relativi a biosensori che rispondono in maniera lineare anche per un solo a ordine di grandezza di concentrazione, si è cercato di estendere l'intervallo di applicabilità, ipotizzando che il numero di unità enzimatiche inglobate fosse insufficiente per l'impiego del dispositivo a concentrazioni d'analita superiori a 10^{-6} M. Si è inizialmente deciso di aumentare il numero di immersioni dell'elettrodo modificato con il film polimerico, passando da 10 fino a 20 dip. Questa prima variazione non ha portato a miglioramenti sensibili nell'intervallo di linearità del biosensore, pertanto si è pensato di aumentare direttamente la concentrazione delle soluzioni enzimatiche (da 1 U/mL fino a 15 U/mL), e quella del cofattore ($3 \cdot 10^{-3} \div 3 \cdot 10^{-2}$). Anche questa seconda variazione non ha purtroppo portato ad un incremento del range dinamico lineare del biosensore.

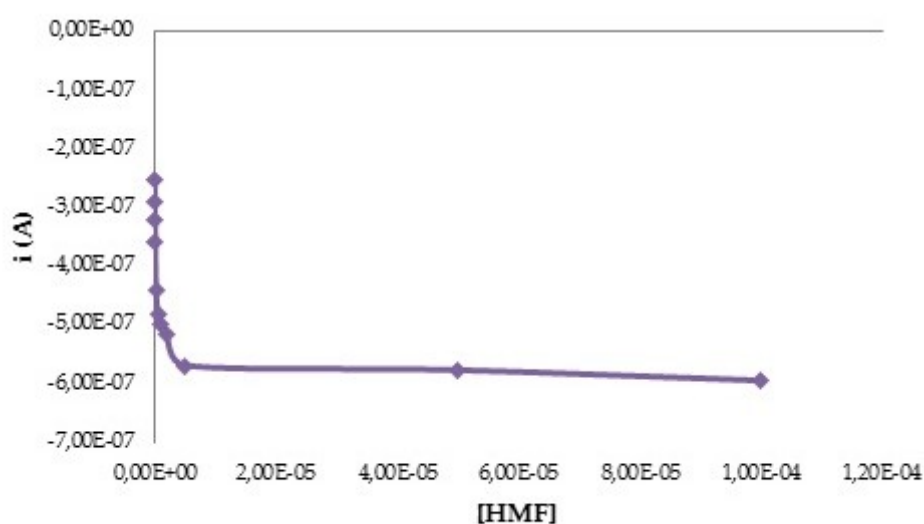


Figura 2.51. Calibrazione biosensore Pt/PPy- $K_4[Fe(CN)_6]$ - β -NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5 con HMF a $E = -0,15$ V.

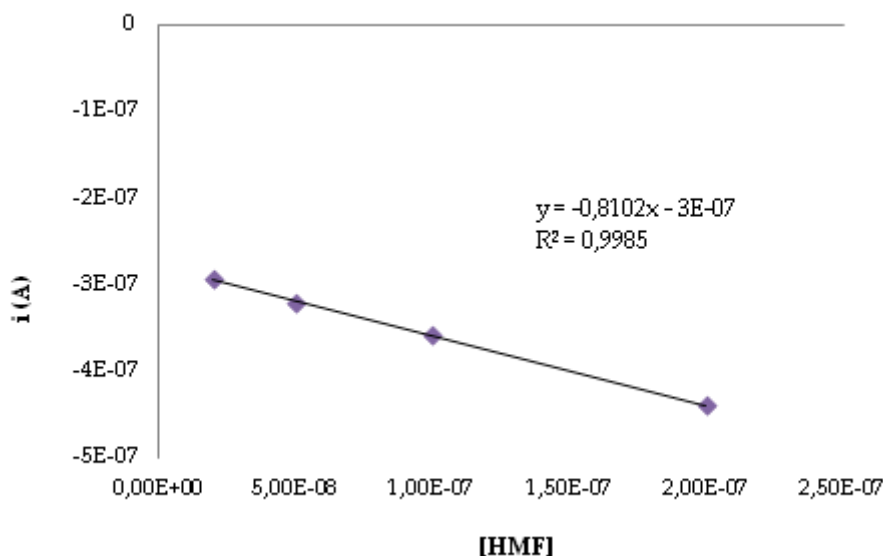


Figura 2.52. Linearità di risposta del biosensore Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA in tampone fosfato 0,1 M pH 7,5 con HMF a E = -0,15 V. [HMF] = 1*10⁻⁸ -2*10⁻⁷ M.

2.5.4 Intrappolamento della componente enzimatica su film di politiofene.

Nel costante tentativo di migliorare le prestazioni analitiche dei biosensori bienzimatici per la determinazione dell'HMF, si è pensato, come possibile alternativa all'impiego di film di polipirrolo, di voler estendere l'indagine anche ad un analogo biosensore ottenuto per sostituzione del film polimerico polipirrolico con analogo politiofenico.

Come substrato tiofenico è stato quindi scelto un monomero commerciale, il 2,2'-bitiofene. La voltammetria ciclica di una soluzione di 2,2'-bitiofene in concentrazione 1*10⁻³ M in CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M è stata effettuata in un range di potenziali tra 0 e +1,35 V. Dal voltammogramma, analogo a quello riportato in figura 2.2 per la costruzione del biosensore per la determinazione del glucosio, è possibile identificare un processo anodico a +1,25 V attribuibile all'ossidazione del frammento bitiofenico a cui è associato un picco di ritorno a

+0,68 V. Scansioni successive del potenziale tra 0 ed +1,35 V hanno mostrato un continuo aumento dell'intensità della corrente, indice di deposizione del film polimerico sulla superficie dell'elettrodo lavorante, il quale appariva infatti ricoperto da uno strato di film avente un colore marrone-arancio.

Il film di politiofene è stato quindi depositato in cronoamperometria imponendo all'elettrodo di lavoro un potenziale di +1,25 V per 600 s, con $Q = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mC} \cdot \text{cm}^{-2}$, e successivamente neutralizzato ad un potenziale di 0 V vs Ag/AgCl in una soluzione di TEAPF₆ 0,1 M in acetonitrile per 60 s; infine, il film è stato dapprima caratterizzato attraverso CV nella stessa soluzione impiegata per la neutralizzazione (figura 2.53), quindi lavato con acqua distillata ed infine usato per l'immobilizzazione enzimatica. Lo spessore del film polimerico è stato calcolato applicando l'equazione 8 presente nel paragrafo iniziale.

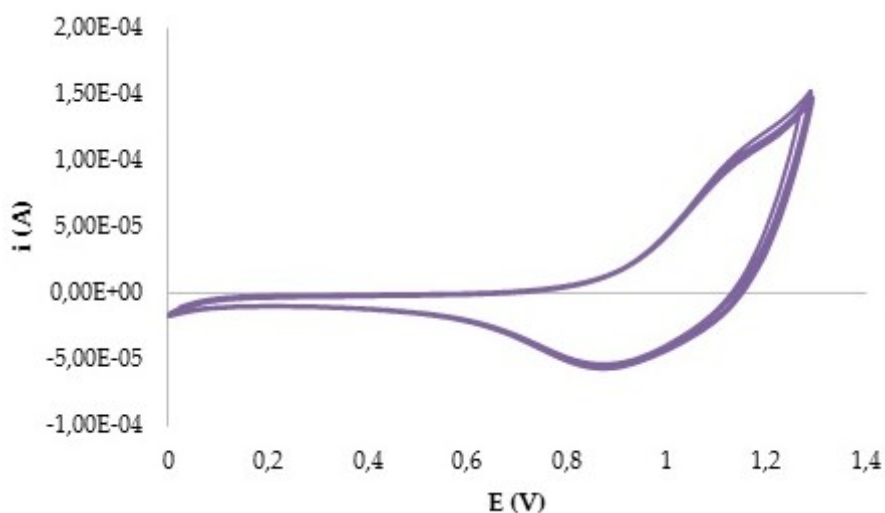


Figura 2.53. Caratterizzazione del film di politiofene in CH₃CN/TEAPF₆ a E = 0- +1,30 V.

Il voltammogramma relativo alla caratterizzazione del politiofene mostra un processo di doping a +1,10 V ed un processo di dedoping a +0,90 V.

L'elettrodo modificato è stato immerso, come precedentemente descritto, nelle soluzioni di ALDH e diaforasi (5÷10 dip) con concentrazione di $15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e di $\beta\text{-NAD}^+$ (5-10 dip) $0,03\text{M}$, di BSA al 2% ed infine di GA all'1%.

Il biosensore è stato impiegato nella calibrazione con soluzioni di HMF a concentrazione nota, immergendolo in 5 mL di tampone fosfato $0,1 \text{ M}$ pH 7,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,01 \text{ M}$ come mediatore. Analogamente a quanto avvenuto per il biosensore usato per la determinazione del glucosio, il mediatore è stato utilizzato in forma solubile e non "bloccato" sull'elettrodo. Nel voltammogramma relativo alla caratterizzazione del biosensore nella soluzione di tampone fosfato contenente il mediatore, i processi ossidativi e riduttivi a carico della specie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ non sono apparsi ben evidenti. Pertanto il potenziale per la calibrazione è stato fissato in relazione al comportamento redox della coppia $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ osservato nelle prove sperimentali effettuate precedentemente impiegando il polipirrolo.

La calibrazione del biosensore mediante aggiunte progressive di HMF nel range di concentrazione 10^{-6} - 10^{-3} M (figura 2.54) non evidenzia alcun tipo di risposta capitalizzabile per la risoluzione della problematica analitica in oggetto.

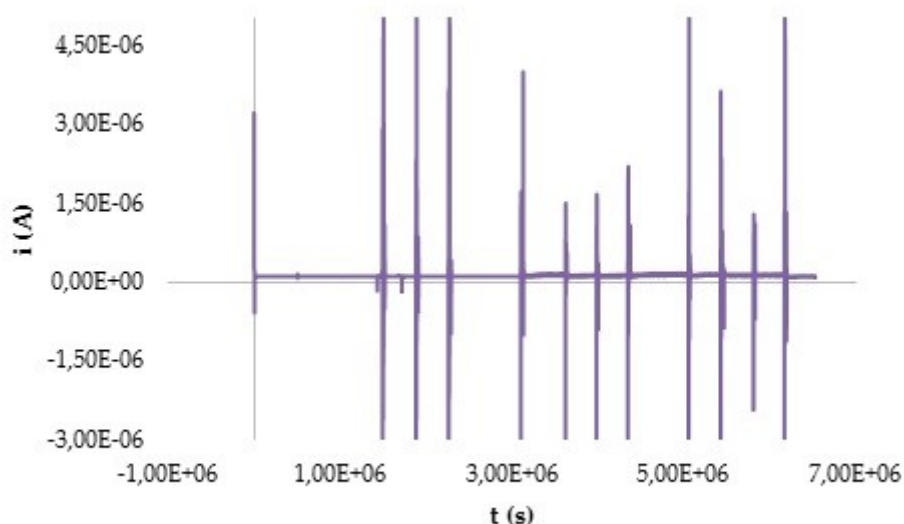


Figura 2.54. Calibrazione biosensore Pt/poli(2,2'-BT)/ALDH/Diaph/ β -NAD⁺/BSA/GA
E=+0,40 V, in tampone fosfato pH 7,5 e K₃[Fe(CN)₆] 0,01 M.

2.5.5 Validazione

Come appare evidente dalla cospicua mole di lavoro sperimentale svolto, il problema relativo alla messa a punto di un biosensore per la determinazione dell'HMF caratterizzato da ampi range di risposta lineare, da robustezza e da durata è decisamente complesso e – nonostante i confortanti risultati raggiunti in questo studio – pare ancora aperto a sviluppi di assoluto interesse. Cionondimeno, sarebbe inopportuno passare sotto silenzio alcuni risultati, sebbene ancora parziali, ottenuti con alcuni biosensori che hanno mostrato una buona affidabilità di comportamento in specifici campi di concentrazione dell'analita. Nello specifico, si tratta del biosensore bilayer Pt/PPy/[Fe(CN)₆]³⁻/NAD⁺/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph, in possesso di una risposta discretamente lineare nel range di concentrazioni di HMF tra 1*10⁻⁶ ed 1*10⁻⁵ M, di un altro biosensore Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph, attivo nel range dinamico lineare tra 2*10⁻⁸ e 1*10⁻⁷ M, e del biosensore Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]- β -NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA che opera con ottima linearità nel range dinamico lineare tra 1*10⁻⁸ e 2*10⁻⁷ M. Quindi, sebbene con una molteplicità di biosensori, gli esiti della ricerca hanno reso disponibili dispositivi in grado di poter operare in maniera quasi senza soluzione di continuità su di un range dinamico ampio circa tre ordini di grandezza ed abbastanza congruenti con le concentrazioni di HMF di potenziale interesse nei mieli (come noto, i range tipici di concentrazione per tale analita nei mieli commerciabili vanno da circa 3*10⁻⁸ M (7) a circa 8.5*10⁻⁴ moli/kg (8). Sulla base di tali considerazioni, ci è sembrato opportuno procedere alla validazione di almeno alcuni di questi sensori, ossia quelli che si distinguevano o per entità del range dinamico lineare o per qualità nella linearità di risposta. Pertanto, si è inteso redigere un protocollo minimale

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

di validazione del biosensore bilayer Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph e del biosensore con la componente enzimatica immobilizzata tramite crosslinking Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA. Per tali dispositivi si è valutato LOD, LOQ, linearità, ripetibilità, precisione intermedia ed esattezza (sia su soluzione standard che in matrice reale), quest'ultima mediante confronto con metodica indipendente di analisi.

2.5.5.1. LOD e LOQ

I parametri in oggetto sono stati valutati in accordo con il metodo ULA1 (9), messo a punto specificamente per metodi di analisi elettrochimica e caratterizzato da una contemporanea minimizzazione degli errori di decisione di tipo 1 e di tipo 2. L'applicazione di tale metodo ha permesso di ricavare i seguenti valori: LOD Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph = 1.5*10⁻⁷ M e LOD Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA = 3*10⁻⁹ M. Il metodo ULA1 prevede che LOQ = 3.3LOD pertanto, per i biosensori in oggetto, LOQ Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph = 5*10⁻⁷ M e LOQ PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA = 1*10⁻⁸ M.

2.5.5.2. Linearità.

L'indagine si è limitata solo all'acquisizione ed alla valutazione dei coefficienti di correlazione R² nel range dinamico lineare considerato. Essi, mentre appaiono essere appena sufficienti per quanto concerne il biosensore Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph, risultano decisamente ottimi per quanto riguarda PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA. Da misure di linearità di risposta condotte in sessioni analitiche differenti si evince una sostanziale riproducibilità del range dinamico lineare definito in sede di valutazione preliminare. Se opportunamente conservati (in frigorifero, alla

temperatura di +4°C), i biosensori risultano conservare la loro linearità di risposta per un lasso di tempo non inferiore alle due settimane dalla loro preparazione.

2.5.5.3 Precisione

La precisione è stata valutata sia in termini di ripetibilità che di precisione intermedia per soluzioni standard di concentrazione poste al centro dei rispettivi intervalli di linearità. Le misure di ripetibilità sono state realizzate conducendo – sul campione in analisi – dieci determinazioni consecutive nell'ambito della stessa sessione analitica. Il coefficiente di variazione percentuale ($CV\%_r$) è risultato essere – per quanto riguarda il biosensore Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄⁻/ALDH/Diaph, pari al 12%, mentre – piuttosto sorprendentemente, visto il livello di concentrazione indagato, inferiore di circa due ordini di grandezza rispetto al biosensore precedente ($5 \cdot 10^{-8}$ vs. $5 \cdot 10^{-6}$ M) – il $CV\%_r$ per il biosensore Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA vale 8.7%. Analogo andamento si riscontra per la precisione intermedia: cinque determinazioni di soluzioni standard di HMF $5 \cdot 10^{-8}$ e $5 \cdot 10^{-6}$ M sono state lette – in cinque sessioni analitiche differenti, tra loro distanti almeno due giorni – rispettivamente con i biosensori Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA e Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄⁻/ALDH/Diaph, ottenendo valori di $CV\%_R$ pari rispettivamente al 12% ed al 17%.

2.5.5.4 Esattezza e prove su matrice reale.

In assenza di campioni di riferimento certificato, l'esattezza dei due biosensori è stata valutata dapprima per analisi ripetute di soluzioni standard di HMF in acqua aventi rispettivamente concentrazioni di $5 \cdot 10^{-8}$ e di $5 \cdot 10^{-6}$ M, confrontando il dato analitico con quello ottenuto per analisi RP-HPLC dei medesimi

campioni utilizzando il metodo messo a punto da (7). I dati ottenuti sono riportati nella tabella 5.

Tabella 5. Esattezza valutata tramite confronto dei dati analitici provenienti dalle analisi di soluzioni standard di HMF e di campioni reali di miele effettuate sia con i biosensori Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA (1) e Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph (2) che con un metodo RP-HPLC descritto in letteratura (7).

	Soluzioni acquose di HMF (n = 5)		Campione reale di miele (n = 5)
	[HMF±SD] (M)	[HMF±SD] (M)	HMF±SD (mg/Kg miele)
Biosensore 1	(6.2±0.5)*10 ⁻⁸	----	18±6
Biosensore 2	----	(6.4±0.8)*10 ⁻⁶	20±4
RP-HPLC	(5.3±0.4)*10 ⁻⁸	(4.9±0.2)*10 ⁻⁶	15±2

Inoltre, un campione di miele di asfodelo di produzione locale (anno 2011) è stato analizzato, previa opportuna diluizione con acqua al fine di rientrare nei rispettivi range di linearità, con i due biosensori e con il metodo cromatografico di riferimento (Tabella 5). I dati ottenuti in matrice reale, ancorchè caratterizzati da livelli di precisione significativamente differenti, oggettivano comunque una non sostanziale difformità da un punto di vista statistico (t-test a due code, p=0.95).

2.5.6 Commenti e conclusioni

L'unico contributo di letteratura pertinente sull'argomento è un lavoro del gruppo di ricerca di Lomillo del 2007 (6) Come peraltro ben traspare dal titolo,

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

questo voleva essere un “contributo preliminare” alla quantificazione di HMF nel miele utilizzando microelettrodi preparati con tecniche microlitografiche. Nella realtà dei fatti, tuttavia, il gruppo di ricerca in oggetto non ha pubblicato alcunchè di successivo sull’argomento, e questo lascia intravedere la possibilità che l’ulteriore sviluppo della ricerca abbia incontrato delle problematiche che hanno pregiudicato il conseguimento di risultati degni di pubblicazione. Rispetto all’approccio di Lomillo, quello condotto in questa Tesi ha alcuni punti di analogia ed altri di significativa difformità. I primi riguardano la scelta dell’approccio bienzimatico (ALDH e diaforasi, come in uno dei due biosensori messi a punto da Lomillo) e del polimero conduttore prescelto (polipirrolo), mentre scelte differenti sono state fatte a livello della natura e delle dimensioni del materiale elettrodico (microelettrodi di Au per Lomillo, elettrodi di dimensioni convenzionali nel presente studio) e nel processo di ottimizzazione del biosensore (affidato ad una metodica di experimental design nel contributo di letteratura, condotto per via tradizionale con un approccio fondamentalmente guidato da evidenze elettrochimiche nel nostro caso). L’ottimizzazione dei parametri operativi sensibili effettuata tramite experimental design ha portato Lomillo ad avere biosensori che rispondono a livelli di concentrazione di HMF compresi tra $1.96 \cdot 10^{-4}$ e $1.67 \cdot 10^{-3}$ M, ossia ordini di grandezza al di sopra del range di concentrazioni misurate dal biosensore Pt/PPy/[FeCN₆]⁴⁻/Ppy/ClO₄/ALDH/Diaph (tra $1 \cdot 10^{-6}$ e $1 \cdot 10^{-5}$ M) e – soprattutto – dal biosensore Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA (che evidenzia una eccellente linearità tra concentrazioni di HMF comprese tra $2 \cdot 10^{-8}$ e $1 \cdot 10^{-7}$ M). Se gli intervalli di linearità hanno ampiezza comparabile a quelli descritti in letteratura (tutti infatti si estendono per poco più di un ordine di grandezza), è interessante notare la significativa differenza tra i livelli di concentrazione sui quali si esplica

la risposta lineare. E' parimenti oggettivo notare la grande differenza di sensibilità analitica tra i biosensori messi a punto in questo studio e quelli riportati in letteratura. Quelli ideati da Lomillo hanno un LOD pari a $1.68 \cdot 10^{-4}$ M, mentre quelli da noi messi a punto oggettivano valori (valutati con il metodo ULA1, che notoriamente non sovrastima la sensibilità del metodo...) compresi tra $1.5 \cdot 10^{-7}$ M $3 \cdot 10^{-9}$ M, ovverosia concentrazioni da tre a cinque ordini di grandezza inferiori! Dal momento che il livello di diluizione minimo per poter garantire una soluzione di miele dotata di viscosità compatibile con le normali procedure di analisi strumentale è almeno di 1:1, ne consegue che il biosensore descritto in letteratura riesce ad avere un LOD in tale soluzione di poco superiore al mg/L. Paradossalmente si può dire che l'applicabilità di questi biosensori alla problematica analitica in oggetto risulta essere più immediata rispetto a quella dei biosensori messi a punto in questo studio, in quanto il range di variabilità della concentrazione di HMF nei mieli commerciabili in EC è modulato superiormente da valori massimi di 40 mg/Kg (o di 80mg/Kg, per mieli prodotti in ambienti tropicali). L'affermazione è comprovata dal fatto che - per poter rientrare nel range di linearità dei nostri biosensori - è stato necessario effettuare diluizioni del campione per diversi ordini di grandezza, e ciò sicuramente ha inficiato - almeno in parte - il livello di qualità del dato analitico in termini sia di esattezza che della precisione intermedia. Infatti i valori tipici di precisione intermedia da noi misurati non sono mai inferiori al 12% lavorando su soluzioni standard di HMF, e possono arrivare anche a superare il 30% su campione reale. Interessanti sono i risultati relativi all'esattezza, valutata per confronto con una metodica indipendente (un metodo RP-HPLC messo a punto in passato dal nostro gruppo di ricerca). La valutazione, effettuata analizzando cinque volte lo stesso campione di miele sia per HPLC che con i due biosensori in esame, ha portato - abbastanza

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

sorprendentemente – a valori analitici che – anche per l'elevata dispersione del dato relativo alle valutazioni con i biosensori – sono risultati essere tra loro statisticamente non distinguibili in un t-test a due code.

In conclusione, l'articolata linea di ricerca finalizzata alla realizzazione di biosensori per la determinazione di HMF ha permesso di mettere a punto tre biosensori bienzimatici basati su ALDH e diaforasi che si sono dimostrati attivi ed in possesso di risposta lineare a concentrazioni di analita comprese tra 10^{-8} M e 10^{-5} M. Tali range di concentrazioni sono significativamente inferiori a quelle che erano state indicate nell'unico studio al momento disponibile in letteratura (6)(5). I biosensori si sono dimostrati stabili, in termini di riproducibilità di risposta e di conservazione della linearità della medesima, per un periodo di almeno due settimane, se conservati nelle migliori condizioni. I valori di LOD e di LOQ, calcolati secondo l'approccio ULA1, sono risultati essere estremamente bassi, soprattutto per quello che attiene il biosensore Pt/PPy-K₄[Fe(CN)₆]-β-NAD⁺/ALDH/Diaph/BSA/GA, in cui la componente enzimatica risulta esser fissata al polimero conduttore tramite cross-linking con BSA e GA, mentre biosensori dotati di risposta lineare per range di concentrazione più elevati sono stati messi a punto mediante la tecnica di intrappolamento dual layer. La sperimentazione inerente all'impiego della tecnica single layer non ha invece sortito nella preparazione di biosensori dotati di alcuna risposta amperometrica. I sensori messi a punto mostrano anche una sufficiente precisione, e sono dotati di una buona esattezza, misurata per confronto dei dati analitici ottenuti anche con metodica indipendente di analisi (RP-HPLC) sia su soluzione standard di analita che su matrice reale.

2.6 Biosensori per la determinazione dei polifenoli.

Sulla base dei positivi risultati preliminari ottenuti nella messa a punto di un biosensore per il glucosio, in cui l'enzima glucosio ossidasi viene immobilizzato mediante la tecnica del cross-linking con glutaraldeide su film di politiofene (ottenuti a partire da un monomero commerciale ed uno di sintesi), si è pensato di costruire un biosensore per la determinazione dei polifenoli che utilizzasse analoghi polimeri conduttori, sui quali il gruppo di ricerca all'interno del quale questa tesi è stata sviluppata ha una più che decennale esperienza. Inizialmente si è cercato di sfruttare alcuni dei monomeri tiofenici sintetizzati in precedenza da questo gruppo di ricerca (Br-BT-TPA ed ET-BT-TPA), sui quali è stata immobilizzata la tirosinasi mediante cross-linking con glutaraldeide.

La scelta di questi specifici monomeri è stata dettata sia da fattori di specifica disponibilità dei monomeri (tutti di non facile e laboriosa sintesi), ma soprattutto dal fatto che la presenza di sostituenti stericamente ingombranti poteva più agevolmente creare – all'interno del network polimerico – “cavità” ove meglio poteva esser ospitato l'enzima. Infine, la riportata applicabilità di questi polimeri per gli scopi del lavoro anche in assenza di loro neutralizzazione poteva avere un ruolo nello stabilizzare – tramite opportune interazioni elettrostatiche – l'enzima immobilizzato all'interno della matrice polimerica.

Per ogni singolo monomero è stato valutato il comportamento elettrochimico attraverso prove di voltammetria ciclica. Sono stati valutati dunque i potenziali di ossidazione dei monomeri bitiofenici e la loro tendenza alla polimerizzazione in condizioni potenziodinamiche e potenziostatiche sia su elettrodi di Pt che su elettrodi di Au. I polimeri sono stati depositati in cronoamperometria in modo

tale da poter avere un miglior controllo della densità di carica e quindi dello spessore del film polimerico.

Come già prima accennato, non si è ritenuto opportuno neutralizzare i film polimerici così ottenuti, che quindi sono stati utilizzati tali e quali dopo la loro elettropolimerizzazione.

I film polimerici depositati su Pt e su Au sono stati successivamente caratterizzati con approcci a potenziale controllato per valutarne la loro conducibilità e la loro stabilità in un range significativo di potenziali elettrodi. Infine gli elettrodi risultanti sono stati modificati depositando sulla superficie dell'elettrodo modificato 15 μL di una soluzione di Tirosinasi, preparata solubilizzando 20 mg di enzima in 0,5 mL di tampone fosfato 0,1 M a pH=7. L'enzima è stato quindi immobilizzato depositando 2 aliquote da 5 μL ciascuna di una soluzione di glutaraldeide al 2,5% (v/v) in tampone fosfato 0,1 M a pH=7 sempre sulla superficie del trasduttore (3). I biosensori preparati sono stati infine conservati a 4°C.

La risposta del biosensore è stata tipicamente valutata sulla base dell'andamento delle correnti di stato stazionario misurate dopo aggiunte multiple di una soluzione standard di catecolo in una soluzione di tampone fosfato 0,1 M a pH 7 (5 mL). E' in questa sede opportuno precisare che, diversamente da quanto descritto per la quasi totalità delle misure in voltammetria ciclica ed in cronoamperometria effettuate durante questo studio, nel caso delle misure analitiche basate sulla risposta della tirosinasi si deve lavorare in presenza di O_2 . L'ossigeno è infatti necessario affinché l'enzima sia in grado di esplicare la propria attività nel processo di ossidazione del catecolo al corrispondente chinone, che viene successivamente ridotto sulla superficie dell'elettrodo (10).

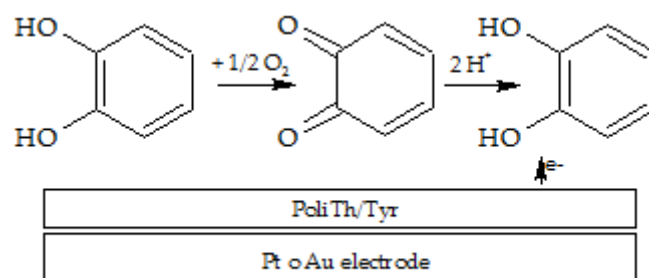


Figura 2.55. Schema generale dell'azione di ossidazione del catecolo per effetto del biosensore a base di tirosinasi.

La risposta amperometrica del biosensore ad aggiunte crescenti di analita è stata valutata in cronoamperometria, polarizzando l'elettrodo a $-0,20$ V vs Ag/AgCl, ovvero al valore di potenziale al quale si osserva la riduzione del chinone prodotto per via enzimatica. Una volta stabilizzato il segnale della corrente per una soluzione di tampone fosfato a pH 7, si procede con l'aggiunta di quantità crescenti di analita, a partire da una soluzione a concentrazione nota. Prima di procedere con l'aggiunta successiva si attende che il segnale della corrente si stabilizzi.

2.6.1 Polimerizzazione elettrochimica di 4-(4'-bromo-2-2'-bitiofenil)-N,N'-difenilnilina (Br- BT-TPA) su disco di Au e su disco di Pt in $CH_2Cl_2/TEAPF_6$ 0,1 M.

La caratterizzazione voltammetrica del Br-BT-TPA su elettrodo lavorante di Au (figura 2.56) mostra la presenza di un picco anodico a $+1,25$ V, attribuibile all'ossidazione del frammento tiofenico, cui è associato un picco di ritorno a $+0,70$ V.

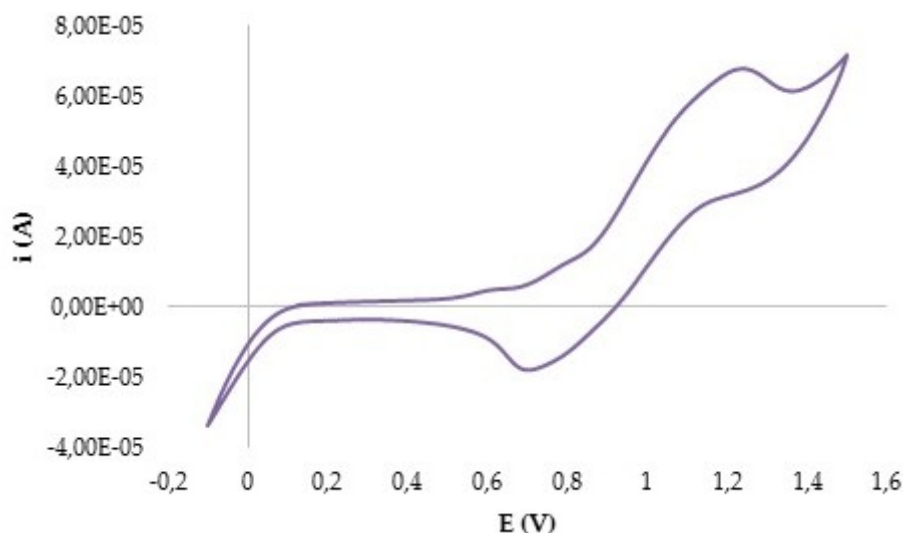


Figura 2.56. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 5×10^{-3} M di Br-BT-TPA in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M. WE=Au, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100\text{mV/s}$.

Scansioni ripetute del potenziale tra -0,2 V e +1,48 V (figura 2.57) hanno evidenziato un incremento della corrente con corrispondente formazione di un film sull'elettrodo. Gli elevati valori di potenziali di ossidazione usati sono dovuti alla difficoltà di polimerizzazione del ditiofene, attribuibile alla presenza del sostituente N,N-difenilnilinico che in qualche modo gioca un ruolo nella formazione di specie oligomeriche solubili nel sistema solvente utilizzato. Lavorando su intervalli di potenziale meno anodici non si osserva infatti la formazione del polimero.

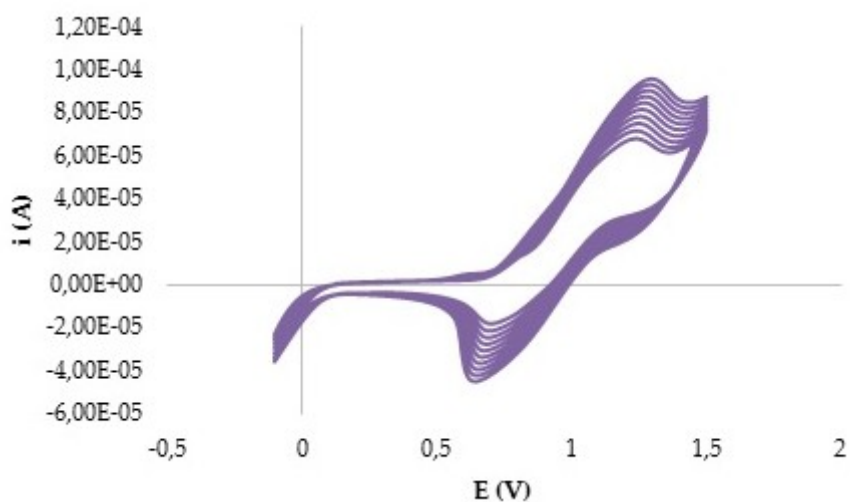


Figura 2.57. Scansioni ripetute del potenziale tra -0.20 V e +1.60 V su elettrodo di Au di una soluzione 5×10^{-3} M di Br-BT-TPA in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M.

La deposizione dei film polimerici su Au è stata effettuata in cronoamperometria, a valori di potenziale tali da garantire l'ossidazione del frammento tiofenico e compresi tra +1,0 V e +1,20 V, per tempi variabili ottenendo film di spessore compreso tra 751 nm e 3,2 μm . I depositi polimerici di poli(Br-BT-TPA) sono stati caratterizzati in una soluzione contenente il solo sistema solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M: si evidenzia un processo di doping che, in funzione dello spessore, è compreso tra +1,10 e +1,30 V, con de-doping tra +0,76 e +0,62 V.

Questo comportamento è dovuto alla maggiore o minore facilità che incontra il controione dell'elettrolita di supporto a penetrare all'interno del bulk polimerico e controbilanciare la carica relativa allo stato dopato. Per questo motivo depositi polimerici più spessi, soprattutto con una morfologia molto densa e compatta, avranno più difficoltà ad andare incontro a fenomeni di ossidazione o di riduzione, e questo si riflette nello spostamento dei potenziali dei rispettivi processi verso valori, rispettivamente, più anodici o più catodici.

A potenziali più anodici si osserva un secondo processo anodico, tra +1,42 V e +1,56 V, con ritorno tra +1,18 e +1,07 V (figura 2.58).

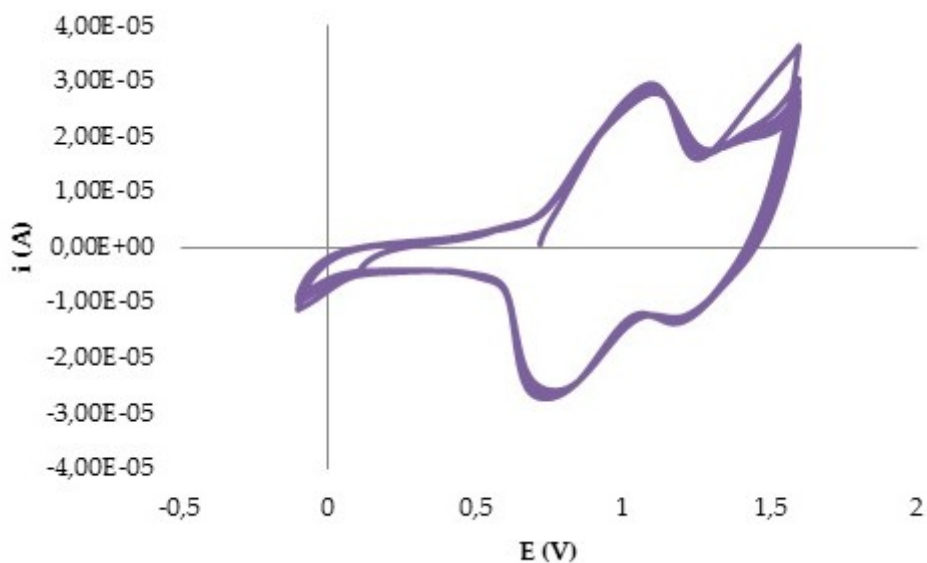


Figura 2.58. Caratterizzazione voltammetrica di un film di poli(Br-BT-TPA) su Au in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. $Q=34 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; spessore=2,7 μm ; $v=100\text{mV/s}$.

Per i film a spessore maggiore è possibile osservare un solo processo anodico a +1,50 V, con processi di scarica associati a +1,10 e +0,38 V (figura 2.59)

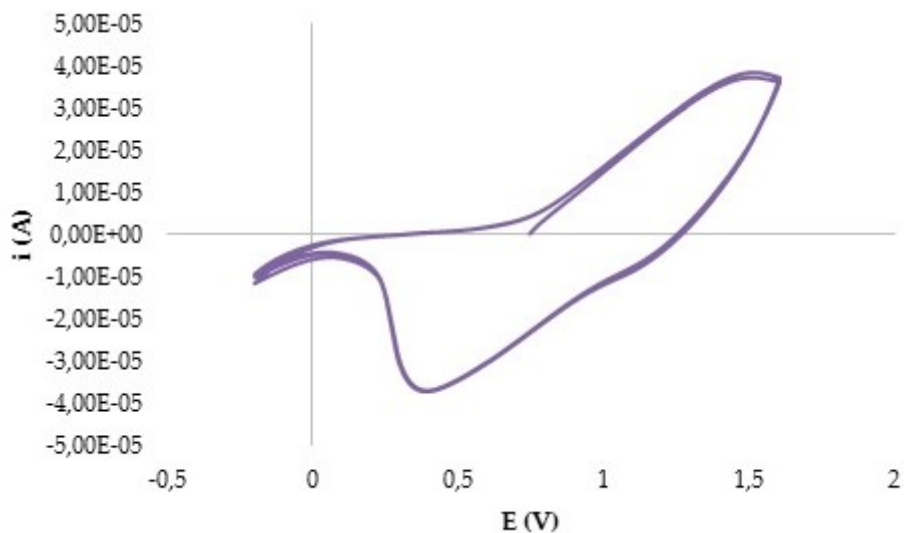


Figura 2.59. Caratterizzazione voltammetrica di un film di poli(Br-BT-TPA) su Au in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. $Q= 41 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; Spessore=3,2 μm ; $v=100\text{mV/s}$.

La caratterizzazione voltammetrica su elettrodo lavorante di Pt del Br-BT-TPA (figura 2.60) mostra un processo anodico poco definito a circa +0,90 V seguito da un secondo picco a +1,12 V, con processi di ritorno associati rispettivamente a +0,87 V e +0,70 V. Caratterizzazioni effettuate nel corso di una precedente Tesi di laurea (11), sempre su elettrodo di Pt ma nel sistema solvente CH₃CN/TEAPF₆, suggeriscono di attribuire questi due processi all'ossidazione del gruppo amminico. Il terzo processo anodico a +1,46 V, con ritorno a +1,26 V, è invece attribuibile all'ossidazione del dimero tiofenico.

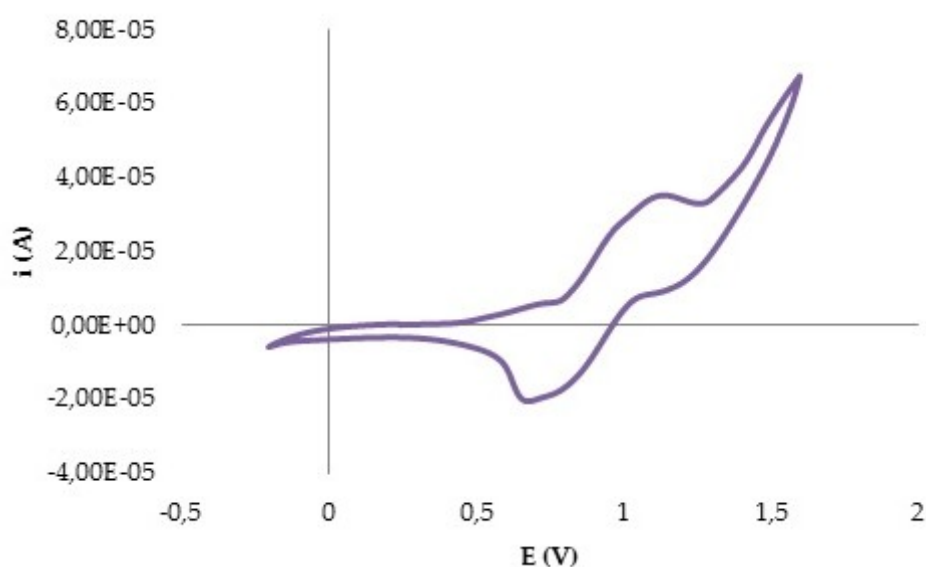


Figura 2.60. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 5×10^{-3} M di Br-BT-TPA in CH₂Cl₂/TEAPF₆ 0.1 M. WE=Pt, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100$ mV/s.

Diversamente da quanto osservato in soluzione di CH₃CN, in CH₂Cl₂/TEAPF₆ scansioni ripetute del potenziale tra -0,60 V e +1,60 V (figura 2.61) su elettrodo di Pt evidenziano un incremento di corrente con corrispondente formazione di un film polimerico di colore giallo sulla superficie elettrodica attribuibile al poli(Br-BT-TPA).

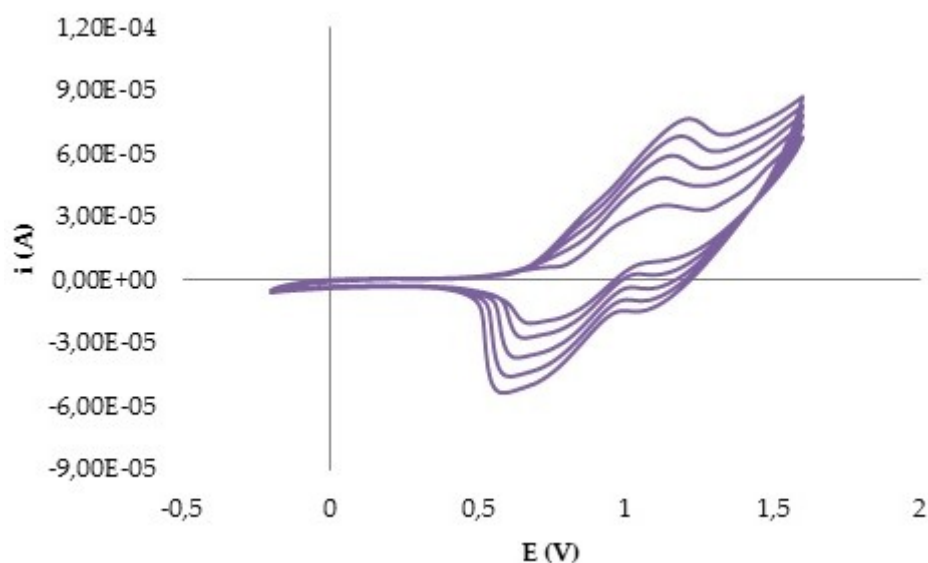


Figura 2.61. Polimerizzazione potenziodinamica di Br-BT-TPA tra -0,60 V e +1,60 V su Pt CH₂Cl₂/TEAPF₆ (5 scansioni).

La deposizione del film di poli(Br-BT-TPA) su Pt, è stata eseguita anche stavolta a potenziale costante, fissato sempre in funzione del responso della voltammetria ciclica, in un range di valori compresi tra +1V e +1,32 V. A causa delle difficoltà incontrate anche in questo caso nella deposizione dei film polimerici è stato possibile ottenere solo depositi di spessore compreso tra 3,5 μm e 6,5 μm .

La caratterizzazione dei film depositati su elettrodo di Pt evidenzia due processi di doping, il cui valore di potenziale anche stavolta dipende dallo spessore del film: il primo, compreso tra +1,07 V e +1,23 V (de-doping tra +0,77 V e +0,63 V), e il secondo a circa +1,5 V (ritorno intorno a +1,2 V). Anche in questo caso, per gli spessori più elevati si osserva un unico processo anodico a +1,40 V, con de-doping a +0,76 V (figura 2.62).

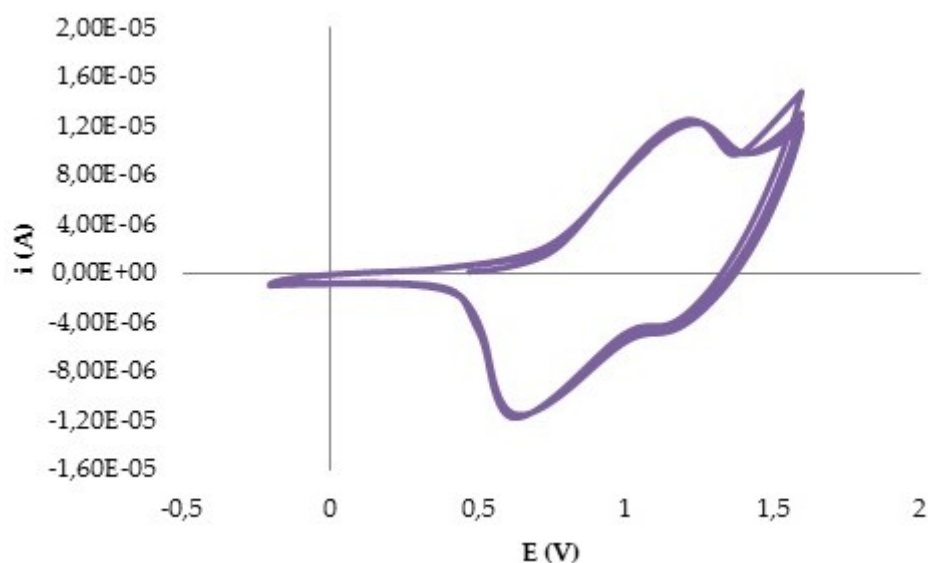


Figura 2.62. Caratterizzazione voltammetrica di un film di poli(Br-BT-TPA) su Pt in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. $Q=43 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; spessore=3,5 μm ; $v=100\text{mV/s}$.

Sia per i film depositati su elettrodo di Au che per quelli su elettrodo di Pt, si osserva che il responso voltammetrico è riproducibile per diverse scansioni (almeno 5), indicazione del fatto che, anche a potenziali relativamente elevati i film non subiscono modificazioni chimiche o strutturali.

La deposizione dei film di politiofene è stata effettuata in cronoamperometria su elettrodo di Au a potenziali generalmente pari a +1,2 V, mentre su elettrodo di Pt a potenziali pari a +1,2.

I film polimerici (di colore giallo) sono stati modificati con tirosinasi secondo la procedura descritta in precedenza. La risposta amperometrica dei biosensori messi a punto è stata solitamente testata tramite cronoamperometria, polarizzando il biosensore a -0.20 V per aggiunte multiple di soluzioni standard di specifici polifenoli (catecolo, acido gallico, acido caffeico) e leggendo la corrente di stato stazionario dopo ogni aggiunta di analita.

2.6.2 Risposta amperometrica per il catecolo in tampone fosfato dei biosensori Au/poli(Br-BT-TPA)/Tyr/GA e Pt/poli(Br-BT-TPA)/Tyr/GA .

Polarizzando a -0.2 V i biosensori Au/poli(Br-BT-TPA)/Tyr/GA di spessori compresi tra 751 nm e 3,2 μm , non è mai stato possibile registrare una significativa variazione di corrente per aggiunte standard di catecolo nell'intervallo di concentrazione compreso tra $1 \cdot 10^{-6}$ M ed $1 \cdot 10^{-5}$ M.

La situazione appare diversa per i biosensori a Tirosinasi costituiti da depositi di poli(Br-BT-TPA) su Pt. Essi evidenziano una risposta in corrente congruente con gli incrementi di concentrazione di catecolo, e quello che appare caratterizzato dalle migliori prestazioni analitiche è quello per cui lo spessore di poli(Br-BT-TPA) è pari a 3,5 μm .

Il profilo amperometrico di risposta (figura 2.63) suggerirebbe una buona risposta del biosensore alla variazione di concentrazione del catecolo, ancorché su un ristretto range dinamico (figura 2.64). Tuttavia la riproducibilità delle prestazioni del sensore anche in termini di sua durata ha rappresentato un grosso limite ad ulteriori test su di esso, ed i numerosi tentativi fatti per ottenere procedure di costruzione che sortissero biosensori riproducibili e dotati di una maggior durata sono risultati essere del tutto infruttuosi.

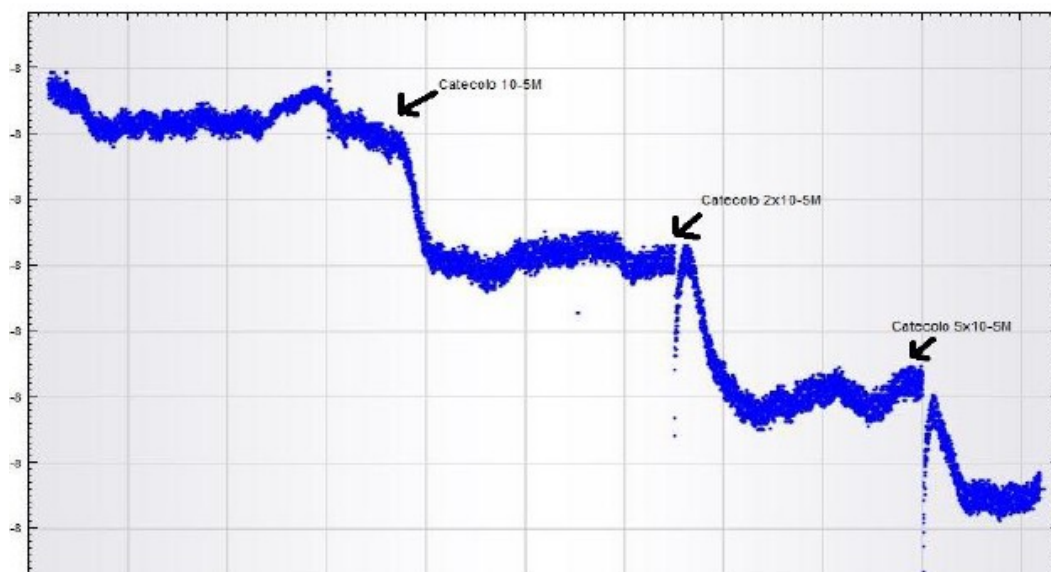


Figura 2.63. Risposta corrente/tempo al variare della concentrazione di catecolo tra 10^{-5} M e 5×10^{-5} M con elettrodo Pt/poli(Br-BT-TPA)/Tyr/GA. Spessore del film: $3,5 \mu\text{m}$.
Potenziale di lavoro: -0.2 V.

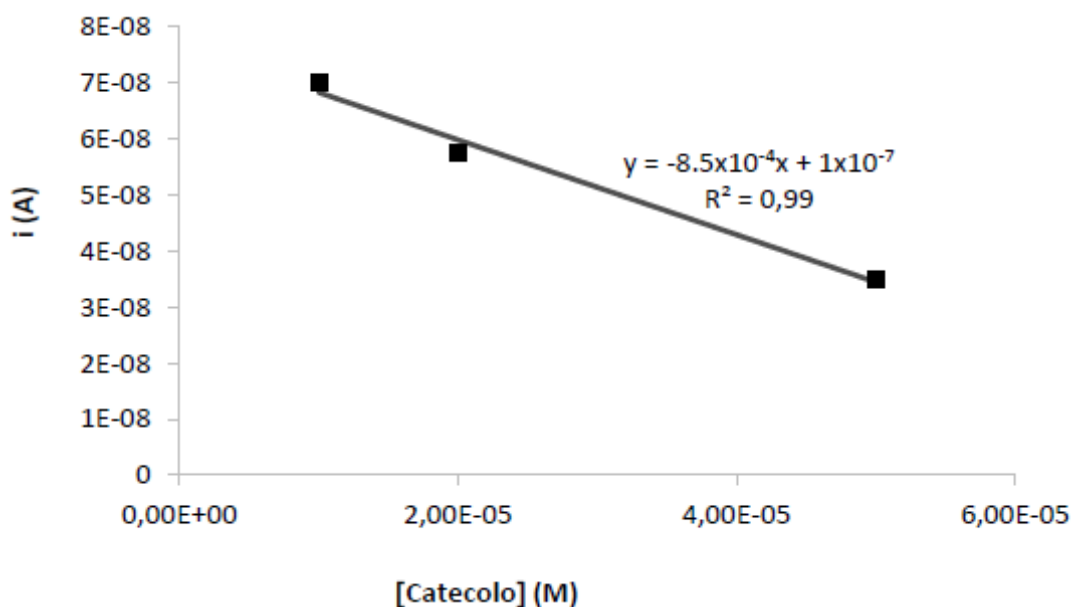


Figura 2.64. Retta di calibrazione ottenuta per la determinazione di catecolo tra 10^{-5} M - 5×10^{-5} M con il biosensore Pt/ poli(Br-BT-TPA)/tyr/GA a -0.2 V. Spessore del film: $3,5 \mu\text{m}$.

2.6.3 Polimerizzazione elettrochimica del 4-(4'-etinil-2-2'-bitiofenil)-N,N'-difenilnilina (ET-BT-TPA) su dischi di Au e Pt in CH₂Cl₂/TEAPF₆ 0.1M.

Si è quindi deciso di utilizzare, per la prosecuzione dei tentativi volti alla messa a punto di CP idonei per la messa a punto di biosensori a Tirosinasi in grado di poter determinare composti polifenolici, un altro monomero bitiofenico recante, in posizione 4' del sistema bitiofenico un gruppo etinile al posto dell'atomo di bromo. La caratterizzazione voltammetrica dell'ET-BT-TPA su elettrodo lavorante di Au (figura 2.65) mostra la presenza di una regione anodica non significativamente dissimile da quella mostrata in precedenza da Br-BT-TPA. In essa si nota un picco anodico piuttosto largo a +0,96 V, con due picchi associati a +0,68 V e +0,05 V. Il picco anodico è, anche in questo caso, attribuibile all'ossidazione dei gruppi amminici (12). Tale sistema risultava meglio risolto su Pt in CH₃CN/TEAPF₆ (12), ove esso dava luogo a 3 picchi anodici ben distinti. L'accoppiamento dei radicali catione che si formano in corrispondenza di questo valore di potenziale porta, nel corso della scansione inversa, alla formazione di oligomeri con eliminazione di H⁺, la cui riduzione è responsabile del picco a +0,05 V. Il successivo processo a +1,44 V con ritorno a +1,23 V è, anche in questo caso, attribuibile all'ossidazione del frammento tiofenico.

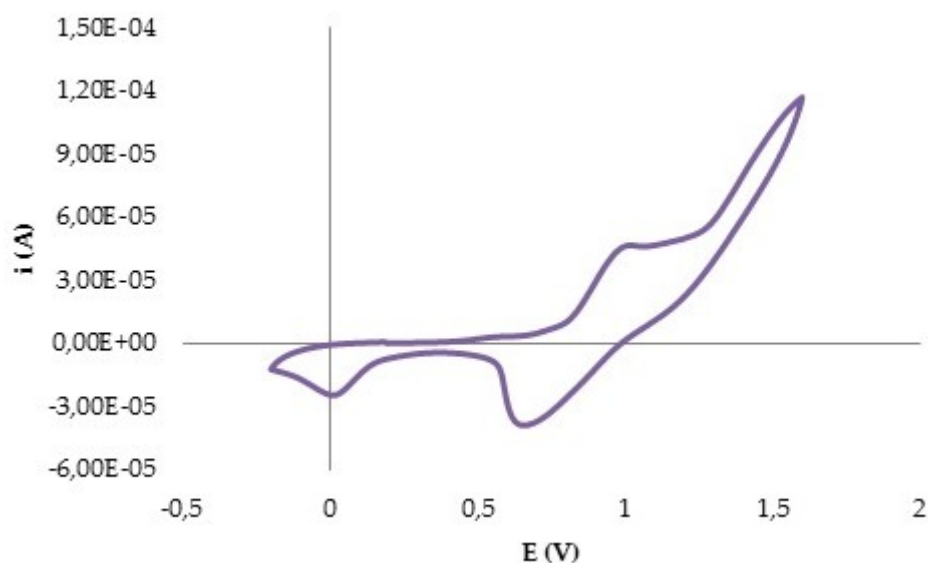


Figura 2.65. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 5×10^{-3} M di ET-BT-TPA in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M. WE=Au, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100\text{mV/s}$.

Scansioni del potenziale attorno al primo processo anodico evidenziano un incremento del valore dell'intensità della corrente, senza che ciò sortisca sull'elettrodo formazione di deposito di polimero conduttivo. Questo conferma che detto processo debba esser attribuito ad ossidazioni che decorrono a livello del frammento amminico. Viceversa, effettuando la scansione del potenziale tra $-0,2$ V e $+1,6$ V (figura 2.66), in modo da coinvolgere anche la porzione ditiofenica, si nota la formazione di un polimero giallo sulla superficie elettrodica, attribuibile al poli(ET-BT-TPA) in accrescimento.

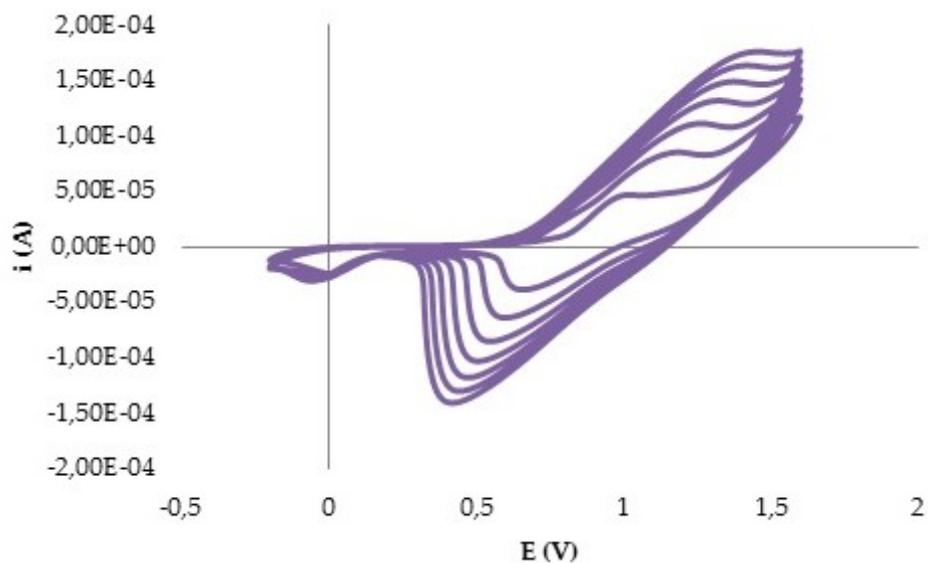


Figura 2.66. Polimerizzazione potenziodinamica di ET-BT-TPA tra -0,20 V e +1,60 V su Au (7 scansioni).

D'altro canto, anche il responso voltammetrico dell'ET-BT-TPA su elettrodo di Pt (figura 2.67) mostra la presenza di due processi anodici: il primo a +0,99 V, con picchi associati a +0,7 V e +0,20 V, a carico della porzione amminica; e un secondo a +1,41 V, con ritorno a ca. +1,20 V, attribuibile all'ossidazione della porzione tiofenica.

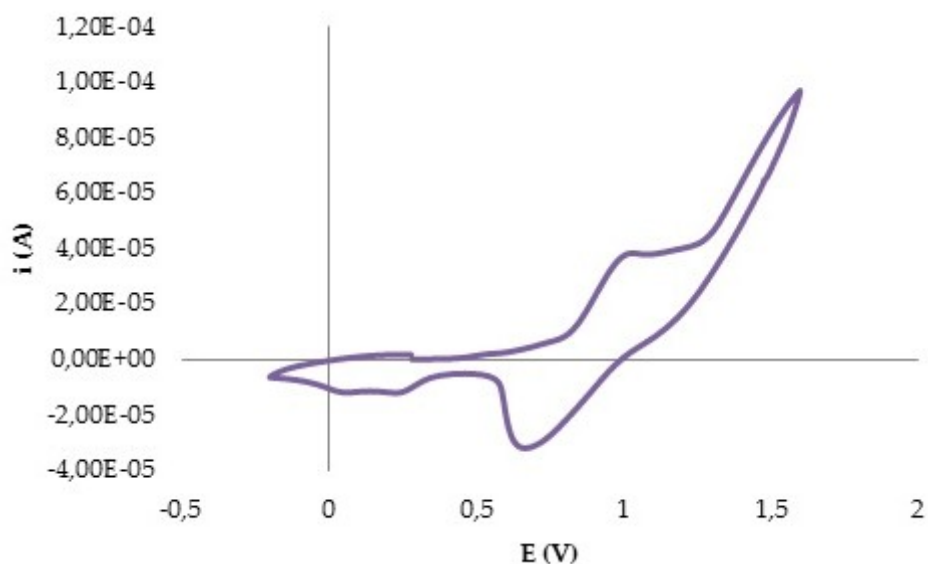


Figura 2.67. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 5×10^{-3} M di ET-BT-TPA in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0.1M. WE=Pt, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100\text{mV/s}$.

Analogamente a quanto evidenziato su elettrodo lavorante di Au, anche su Pt non si osserva la deposizione del film sulla superficie elettrodica per scansioni intorno al primo processo anodico, mentre scansioni ripetute tra -0,20 V e +1,60 V (figura 2.68) evidenziano un incremento di corrente associato alla formazione di un film polimerico di colore giallo.

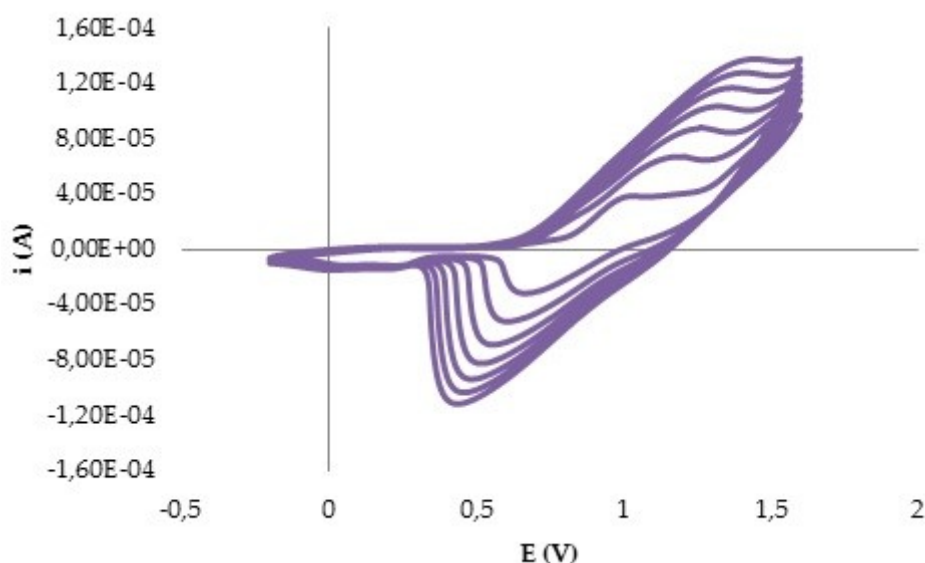


Figura 2.68. Polimerizzazione potenziodinamica di ET-BT-TPA tra -0.20 V e +1.60 V su Pt (7 scansioni).

Anche l'ET-BT-TPA è stato polimerizzato in cronoamperometria sia su disco di Au che su disco di Pt, operando sempre al potenziale di +1,20 V. In queste condizioni è stato possibile ottenere film polimerici sempre di elevato spessore (tipicamente pari a circa $14 \mu\text{m}$ sull'elettrodo di Au e circa pari a $3,5 \mu\text{m}$ su Pt).

La caratterizzazione del poli(ET-BT-TPA) depositato su Au, in una soluzione di $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M, evidenzia un processo di doping a +1,33 V, a cui è

associato un processo di de-doping a +0,49 V. A potenziali più anodici si osserva un secondo processo, con ritorno associato a 1,15 V (figura 2.69).

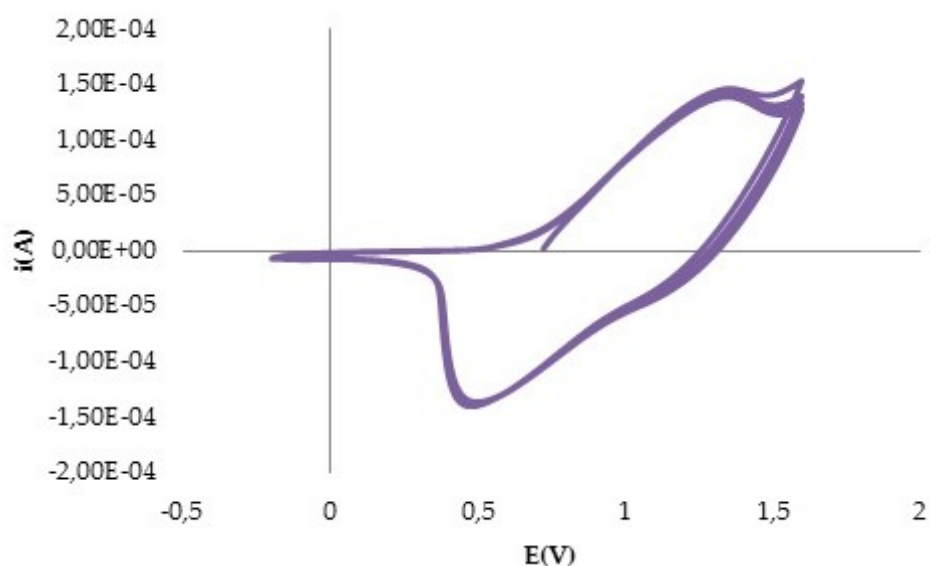


Figura 2.69. Caratterizzazione voltammetrica di un film di poli(ET-BT-TPA) su Au in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M. $Q=170 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; spessore=13,9 μm ; $v=100\text{mV/s}$.

Analogo responso del film di poli(ET-BT-TPA), ora depositato su Pt, è caratterizzato da un processo di doping a +1,07 V (de-doping a +0,77 V) e da un ulteriore processo a +1,5 V (ritorno associato a +1,24 V). È inoltre visibile a +0,52 V un processo di ossidazione attribuibile alla presenza di catene oligomeriche (figura 2.70).

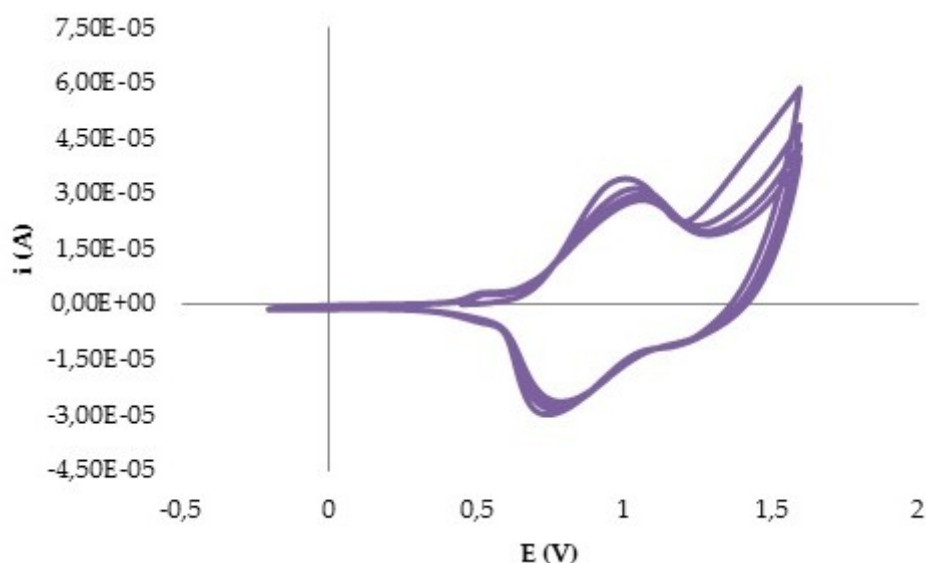


Figura 2.70. Caratterizzazione voltammetrica di un film di poli(ET-BT-TPA) su Pt in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. $Q=45 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; spessore=3,6 μm ; $v=100 \text{ mV/s}$.

Come nel caso dei film polimerici precedentemente descritti, anche su questi è stato immobilizzato l'enzima tirosinasi, utilizzando le metodiche già descritte in precedenza.

2.6.4 Risposta amperometrica per il catecolo in tampone fosfato dei biosensori Au/poli(ET-BT-TPA)/Tyr/GA e Pt/poli(ET-BT-TPA)/Tyr/GA.

Anche nel caso del poli(ET-BT-TPA) come substrato polimerico, sono stati utilizzati film di spessori diversi a seconda che si lavorasse su una superficie elettrodica di Au o di Pt. In entrambi i casi, tuttavia, non è stato purtroppo possibile registrare una risposta significativa in termini di variazione di corrente al variare della concentrazione d'analita anche nell'intervallo di concentrazione tra 10^{-6} M e $5\cdot 10^{-5} \text{ M}$, ossia quella per cui – con il biosensore Pt/poli(Br-BT-TPA)/Tyr/GA – si era registrato almeno in un'occasione una linearità della risposta in corrente. Com'è possibile osservare infatti dalle figure 2.71 e 2.72, la corrente rimane costante nonostante le aggiunte progressive di catecolo, e il segnale appare fortemente disturbato.

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

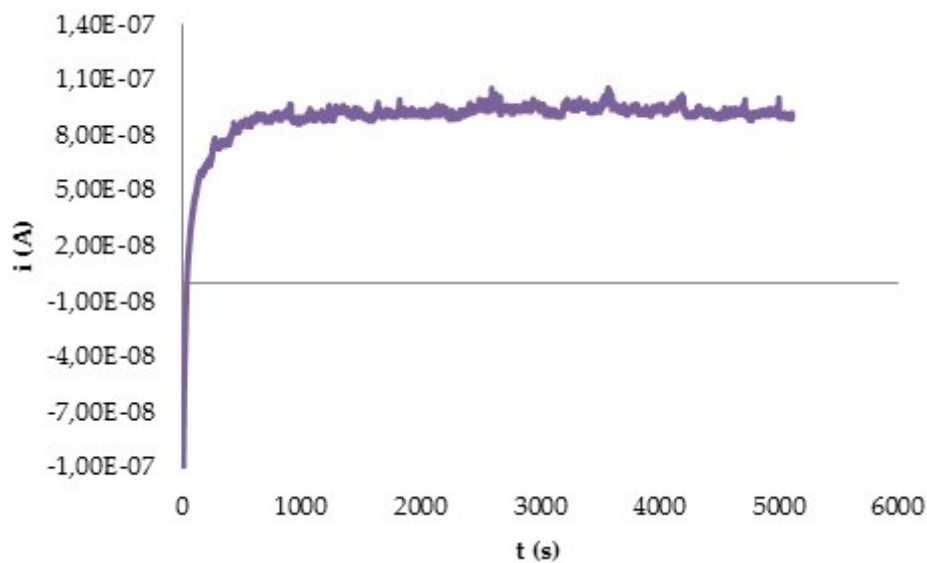


Figura 2.71. Calibrazione del biosensore Au/poli(ET-TPA-DT)/Tyr/GA con spessore del film polimerico pari a 13,9 μm in PBS pH 7.0 e soluzioni di catecolo con concentrazione compresa tra 10^{-6} e 10^{-5} M.

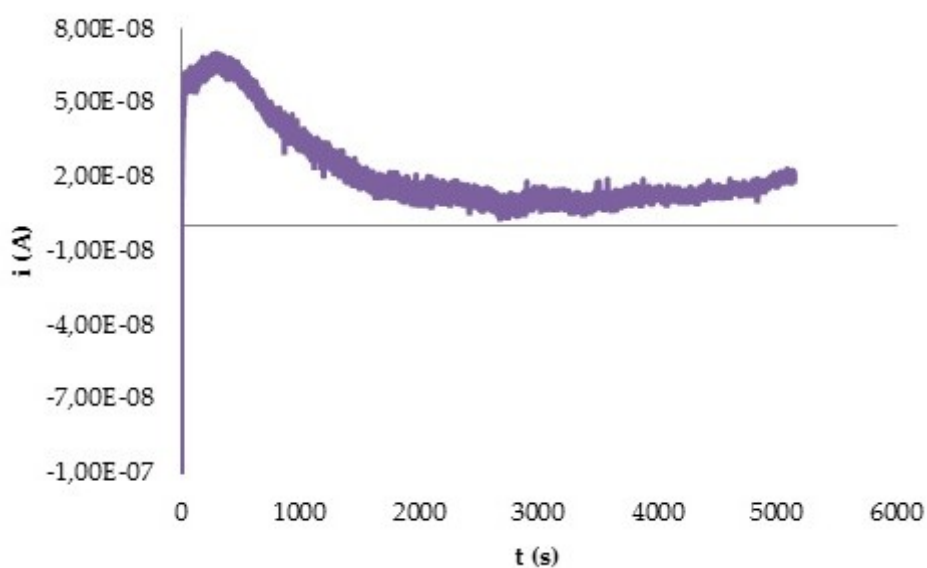


Figura 2.72. Calibrazione del biosensore Pt/poli(ET-TPA-DT)/Tyr/GA con spessore del film polimerico pari a 3,6 μm in Tampone fosfato 0,1 M pH 7. [Catecolo] = $1 \cdot 10^{-6}$ M ÷ $1 \cdot 10^{-5}$ M.

E' possibile che questo risultato non soddisfacente possa in parte esser determinato sia dalla diversa natura del film polimerico conduttivo (è possibile che la sostituzione del bromo con il gruppo etinile nell'unità monomerica determini la formazione di un deposito polimerico più compatto, meno conduttivo e forse anche meno idoneo ad ospitare l'enzima Tirosinasi, responsabile dell'ossidazione dei composti polifenolici), che dall'indubbio peggioramento della risposta elettrodica al crescere dello spessore dello strato del film conduttivo elettrodepositato su Pt.

I risultati nel complesso non confortanti da noi ottenuti utilizzando monomeri tiofenici originali di nostra sintesi hanno suggerito la scelta dell'impiego di un monomero tiofenico commerciale, largamente utilizzato in letteratura nella costruzione di biosensori come supporto per l'immobilizzazione enzimatica quale l'EDOT.

2.6.5 Polimerizzazione elettrochimica dell'EDOT su dischi di Pt e di Au in CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M.

La caratterizzazione voltammetrica di EDOT è stata effettuata in una soluzione 5×10^{-3} M di monomero in CH₃CN/TEAPF₆ 0,1 M, sia su elettrodo lavorante di Au che su elettrodo lavorante di Pt. Il responso voltammetrico su Au (figura 2.73) evidenzia un processo anodico a circa +1,0 V, attribuibile all'ossidazione del monomero tiofenico.

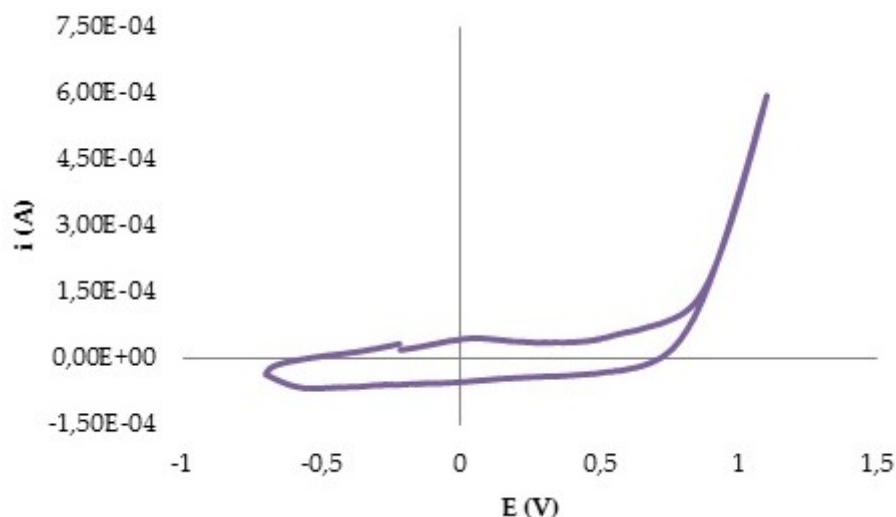


Figura 2.73. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 5×10^{-3} M di EDOT in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M. WE=Au, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100\text{mV/s}$.

Scansioni ripetute del potenziale tra -0,70 V e +1,10 V (figura 2.74) su elettrodo di Au evidenziano un incremento dell'intensità di corrente ad ogni scansione successiva, in corrispondenza del picco di ossidazione attribuibile al frammento tiofenico. Tale aspetto è indice di presenza di un polimero in crescita, come confermato dalla presenza di un film di colore blu sulla superficie elettrodica.

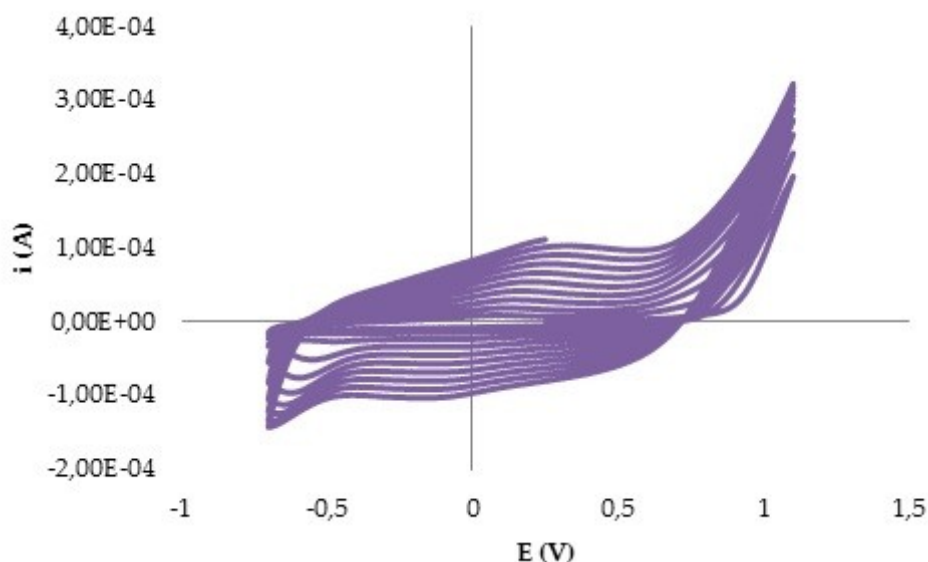


Figura 2.74. Polimerizzazione potenziodinamica di EDOT tra -0.70 V e +1.10 V su elettrodo lavorante di Au (10 scansioni).

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

Analoga caratterizzazione è stata effettuata su un elettrodo lavorante di Pt (figura 2.75), la quale evidenzia un responso anodico a +0,85 V, a carico della porzione tiofenica.

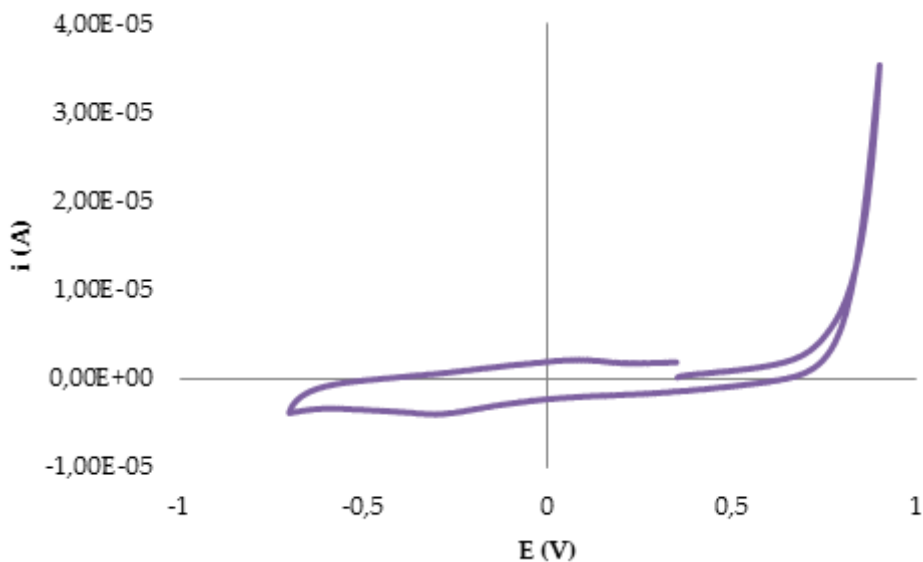


Figura 2.75. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 5×10^{-3} M di EDOT in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. WE=Pt, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100\text{mV/s}$.

Tuttavia, scansioni ripetute del potenziale tra -0,70 V e +0,90 V (figura 2.76) su elettrodo di Pt mostrano, rispetto a quanto riscontrato su elettrodo lavorante di Au, un incremento di corrente meno pronunciato per ogni scansione successiva, suggerendo una minore adesione del film polimerico alla superficie elettrodica, e tale impressione risulta esser poi confermata anche per riscontro visivo (scarsa evidenza del deposito blu sulla superficie elettrodica).

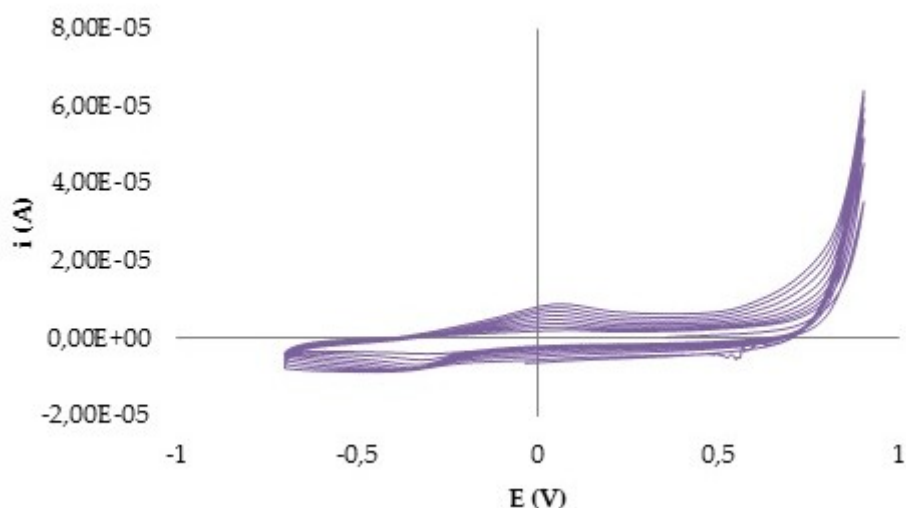


Figura 2.76. Polimerizzazione potenziodinamica di EDOT tra -0.70 V e +0.90 V su elettrodo lavorante di Pt (10 scansioni).

Sulla base delle evidenze voltammetriche, su entrambi gli elettrodi è stata effettuata una polimerizzazione anche per via cronoamperometrica.

In particolare, su elettrodo lavorante di Au la deposizione del film di PEDOT è stata effettuata polarizzando l'elettrodo a +0.90 V (3). In funzione del tempo di deposizione e monitorando anche il valore della carica, è stato possibile ottenere film di diverso spessore (calcolato in funzione della densità di carica depositata), con valori stimati tra 184 nm e 29,3 μm .

I film polimerici di PEDOT ottenuti sono stati caratterizzati in una soluzione contenente il solo sistema solvente, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M, in assenza di monomero. La caratterizzazione in campo anodico del polimero elettrodepositato su Au (figura 2.77) mostra la presenza di due processi di doping: il primo a +0,11 V, associato alla formazione del polarone, con de-doping a -0,3 V; il secondo a +0,62 V, associato alla formazione del bipolarone, con de-doping a +0,2 V. Scansioni ripetute del potenziale nella finestra catoanodica tra -0,60 V e +0,90 V, mostrano una buona ripetibilità del

voltammogramma attribuibile quindi ad una buona stabilità del film polimerico.

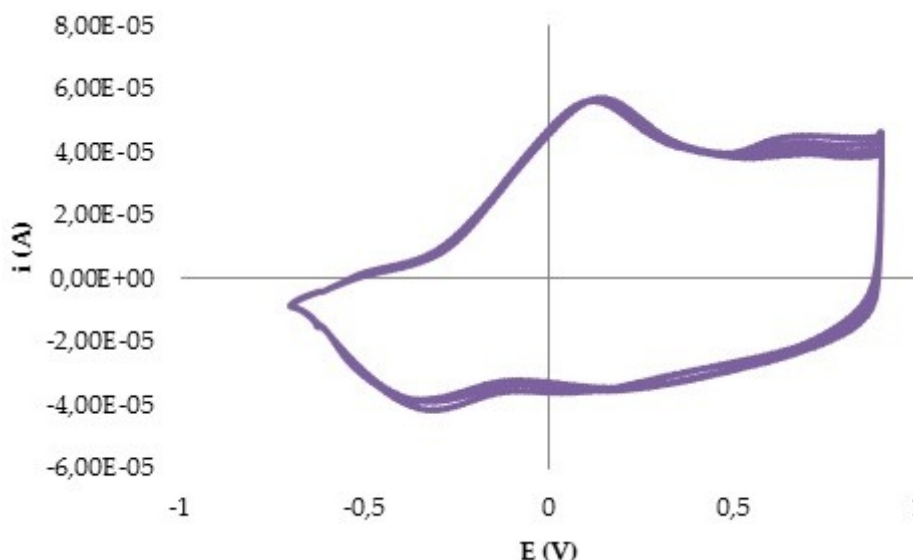


Figura 2.77. Caratterizzazione voltammetrica in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M di un film di PEDOT su Au; $Q=6.1\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; spessore=485 nm; $v=100$ mV/s.

Per quanto riguarda la deposizione di film di PEDOT su Pt, sono state effettuate diverse prove variando sia il potenziale di polimerizzazione, tra +0,80 V e +0,92 V, che i tempi di deposizione. In tale modo è stato possibile ottenere film aventi spessori diversi e compresi tra 492 nm e 7,2 μm . Su questo tipo di elettrodo non è stato possibile ottenere polimeri di spessore confrontabile con quelli - più elevati - ottenuti su Au, probabilmente a causa della già evidenziata minore aderenza del film polimerico sulla superficie di Pt (vedi figura 2.76). Sulla base di questi risultati, il film utilizzato nelle determinazioni successive è stato depositato a +0,90 V, valore di potenziale che permette la formazione di un film polimerico sufficientemente spesso e stabile sulla superficie dell'elettrodo di Pt. Analogamente a quanto descritto nel caso dei depositi su Au, anche in questo caso i film di PEDOT sono stati caratterizzati nello stesso sistema solvente della polimerizzazione, sempre in assenza di monomero. I film di PEDOT su Pt

mostrano la formazione del polarone a +0,13 V, con de-doping a -0,25 V, e del bipolarone a +0,60 V, con de-doping a +0,26 V (figura 2.78).

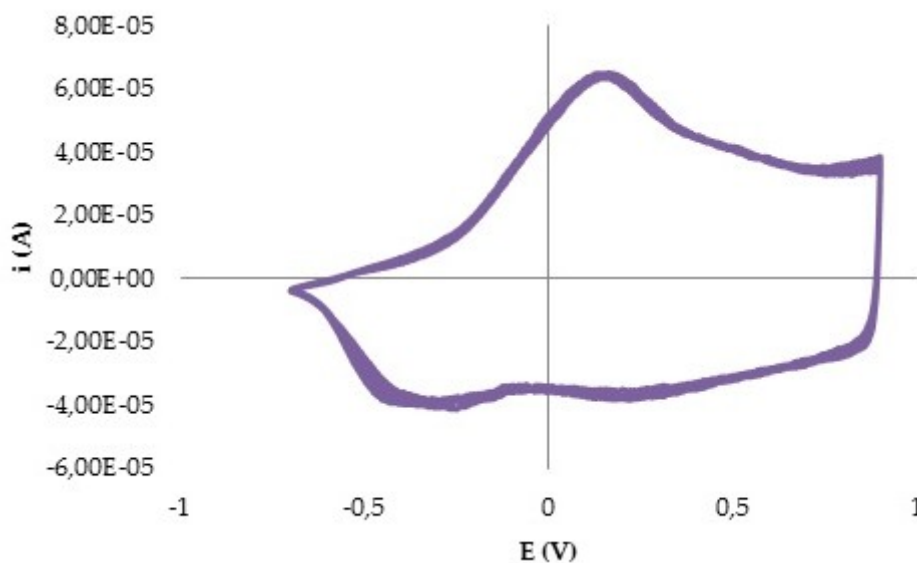


Figura 2.78. Caratterizzazione voltammetrica in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAPF}_6$ 0.1 M di un film di PEDOT su Pt; $Q=6,2\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; spessore=492 nm; $v=100$ mV/s.

Il confronto tra i voltammogrammi relativi ai due elettrodi permette di osservare uno shift anodico dei potenziali di doping e dedoping per l'elettrodo di Pt.

2.6.6 Risposta amperometrica per il catecolo in tampone fosfato dei biosensori Au/PEDOT/Tyr/GA e Pt/PEDOT/Tyr/GA.

È stata valutata la risposta al potenziale di -0.2 V di un elettrodo Au/PEDOT/Tyr/GA con uno spessore del film di PEDOT di 29,2 μm , variazione di concentrazione di una soluzione di catecolo in un intervallo compreso tra 10^{-6} M e $5\cdot 10^{-5}$ M. Lo spessore del film di PEDOT da utilizzare è stato scelto sulla base dei dati di letteratura (10). Un tipico responso cronoamperometrico è riportato nella figura 2.79.

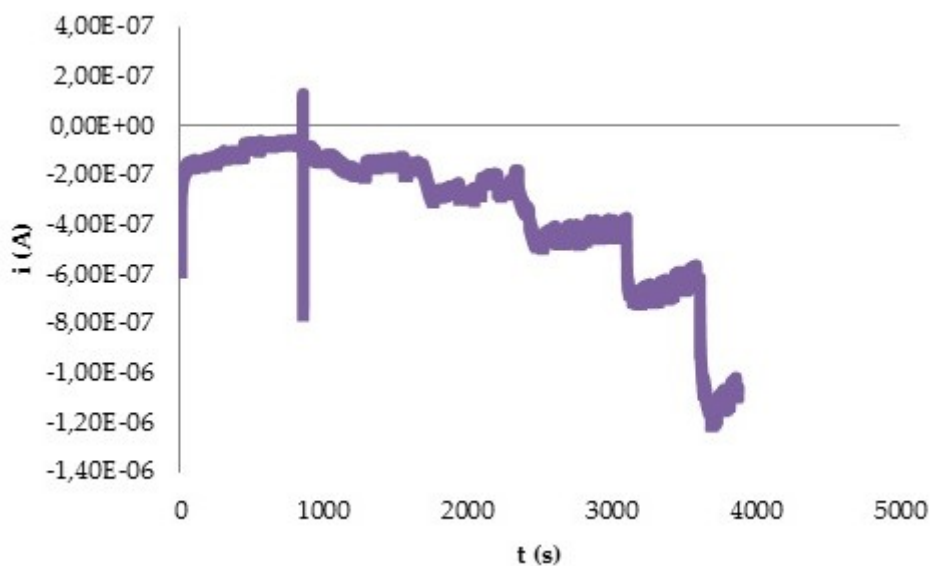


Figura 2.79. Risponso cronoamperometrico registrato a $-0,20$ V (vs Ag/AgCl) in una soluzione di tampone fosfato pH=7 con concentrazioni di catecolo comprese tra 10^{-6} M e 5×10^{-5} M per il biosensore Au/PEDOT/Tyr/GA conservato per 24 h in tampone fosfato pH 7,0 a 4°C . Spessore del film: $29,2 \mu\text{m}$.

Il sistema appare fondamentalmente riproducibile anche dopo 24 ore, conservando il biosensore a 4°C in tampone fosfato 0,1 M e a pH 7,0.

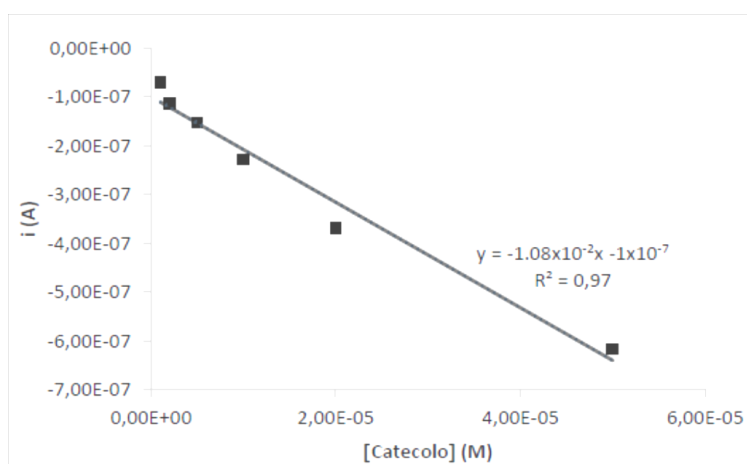


Figura 2.80. Retta di calibrazione con elettrodo Au /PEDOT/Tyr/GA (conservato per 24 h in tampone fosfato a 4°C) a $-0,20$ V nell'intervallo di concentrazione di catecolo tra 10^{-6} e 5×10^{-5} M.

Il tentativo di valutare la risposta a concentrazione crescenti di catecolo con un elettrodo a base di PEDOT (3,2 μm o 7,2 μm di spessore) depositato su Pt e modificato con enzima tirosinasi, nelle stesse condizioni sperimentali, e quindi allo stesso potenziale elettodico (-0,20 V), utilizzate con l'analogo elettrodo supportato su Au, non ha permesso di evidenziare mai una significativa correlazione dell'intensità del segnale della corrente con la variazione della concentrazione di analita (figura 2.81). È opportuno notare che in questo caso lo spessore del film su Pt era circa di un ordine di grandezza inferiore rispetto al deposito su Au. Tentativi ripetuti di ottenere film con spessore maggiore non hanno avuto successo, probabilmente a causa di una scarsa aderenza del polimero alla superficie di Pt. Questa potrebbe essere più in generale la principale causa dell'assenza di risposta del biosensore in oggetto, in quanto in queste condizioni il film evidentemente non costituisce un buon supporto per l'immobilizzazione enzimatica.

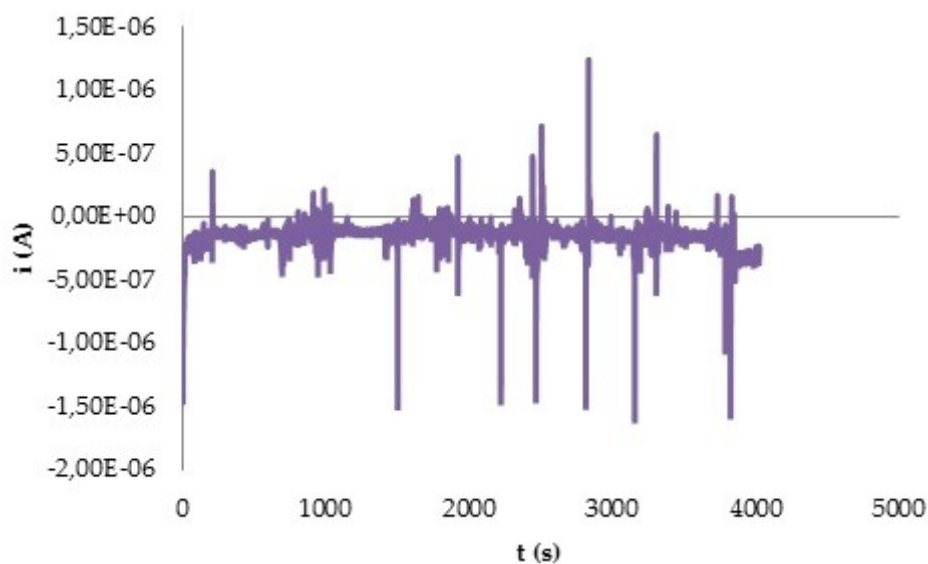


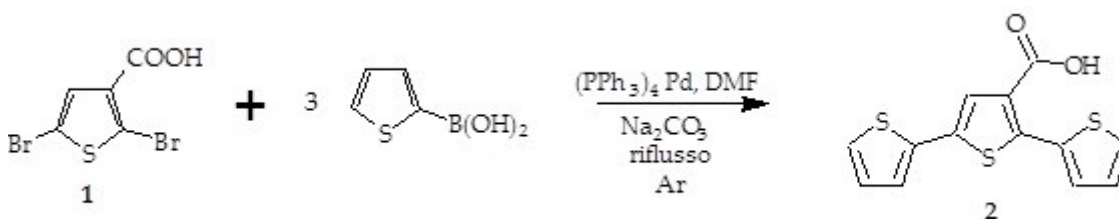
Figura 2.81. Calibrazione del biosensore Pt/PEDOT/Tyr/GA con spessore del film polimerico pari a 3,2 μm in Tampone fosfato 0,1 M a pH 7. [Catecolo] = $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ M.

Nel tentativo di migliorare le prestazioni dei biosensori sinora messi a punto, si è ipotizzato di migliorare la qualità dell'immobilizzazione enzimatica creando – nel monomero bitiofenico – delle funzionalità in grado di legarsi covalentemente alla Tirosinasi, in maniera tale d'ancorare stabilmente detto enzima alla matrice polimerica conduttiva. Nello specifico, tale procedura può essere realizzata per interazione di un opportuno gruppo funzionale (-COOH o -NH₂) presente sulla matrice polimerica e, rispettivamente un gruppo amminico o carbossilico presente nella struttura proteica dell'enzima da immobilizzare. Per questo motivo ci si è proposti di sviluppare un nuovo derivato tiofenico con un gruppo carbossilico come sostituente, da utilizzare come agente immobilizzante dell'enzima in esso attivo. La tirosinasi può infatti essere bloccata efficacemente sulla superficie del trasduttore per opportuna attivazione dei suddetti gruppi funzionali Utilizzando specifici agenti attivanti, come la carbodiimmide, è possibile quindi formare un legame covalente con la funzione amminica dell'enzima (13). La carbodiimmide maggiormente utilizzata a questo scopo in soluzione acquosa è la EDC (1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimmide), alla quale viene spesso associata, per migliorare l'efficienza di immobilizzazione, l'NHS (N-idrossisuccinimide). Considerando alcune metodologie di sintesi già note al gruppo di ricerca, in prima istanza si è pensato di produrre un nuovo monomero tertiofenico recante un gruppo carbossilico in posizione 3. I tentativi di sintesi hanno visto il coinvolgimento di substrati come l'acido 2,5-dibromo-3-tiofene e il 2,5-dibromo-3-formil-tiofene che, per reazione con opportune quantità di acido-2-tiofenboronico, opportuno catalizzatore ed altri specifici reagenti, avrebbero dovuto portare al tertiofene desiderato. Tuttavia le difficoltà incontrate nella fase di sintesi del monomero progettato ci hanno suggerito di rivolgere l'attenzione verso una diversa struttura molecolare, anche in considerazione del

fatto che la sintesi organica non era il fine ultimo di questa tesi, ma solo un mezzo per rendere disponibili molecole non commerciali. Sfruttando quindi le conoscenze del gruppo di ricerca sulle procedure di sintesi di derivati bitiofenici sostituiti, si è allora ipotizzato di sintetizzare una molecola alternativa in cui la funzionalità carbossilica fosse legata al frammento tiofenico tramite uno *spacer* di natura aromatica (par. 2.6.7.3).

2.6.7 Sintesi di monomeri politiofenici funzionalizzati.

2.6.7.1 Tentativo di sintesi dell'acido 3'-(2,2':5',2''- tertiofen)carbossilico.



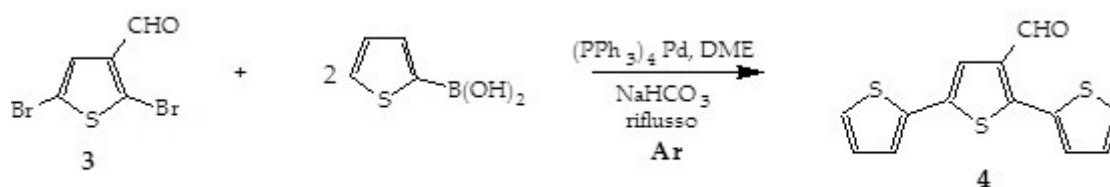
In un pallone a due colli da 25 mL, dotato di agitatore magnetico, è stata preparata sotto atmosfera di Ar una soluzione di acido 2,5-dibromo-3-tiofene carbossilico ((1) 0,0600 g, $2,1 \cdot 10^{-4}$ mol) e $Pd(PPh_3)_4$ (0,0146 g, $1,26 \cdot 10^{-5}$ mol) in N,N-dimetilformammide (5 mL). Dopo circa dieci minuti sono stati addizionati, sotto vigorosa agitazione, acido 2-tiofenboronico (0,0806 g, $6,30 \cdot 10^{-4}$ mol) e 0,472 mL ($9,44 \cdot 10^{-4}$ moli) di soluzione 2 M di Na_2CO_3 .

La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso e l'andamento è stato seguito tramite TLC. Dopo 24 ore la miscela è stata portata a temperatura ambiente, filtrata su carta e concentrata a piccolo volume. Ipotizzando che il nostro prodotto si trovasse nella forma deprotonata, si è pensato di acidificare, sotto agitazione in bagno di ghiaccio, la soluzione con HCl al 37% fino a un valore di pH pari a 3, sino a formazione di un precipitato. Il prodotto solido (0,0290 g) è

stato quindi recuperato per filtrazione. Lo spettro $^1\text{H NMR}$ in DMSO ha tuttavia evidenziato l'assenza dei segnali relativi ai protoni del tertiofene, e pertanto si è deciso di adottare un approccio sintetico alternativo.

2.6.7.2 Sintesi dell'acido 3'-(2,2':5',2''-tertiofene)carbossilico via 3'-formil-2,2':5',2''-tertiofene.

a) Sintesi del 3'-formil-2,2':5',2''-tertiofene



La sintesi dell'intermedio 4 è stata condotta secondo quanto riportato in letteratura (14) (15) (16). In un pallone da 25 mL a doppio collo, dotato di agitatore magnetico e sotto flusso di Ar, sono stati addizionati 2,5-dibromo-3-formil-tiofene ((3) 0,5000 g, $1,85 \cdot 10^{-3}$ mol)) e $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,1264 g, $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol), tutti solubilizzati in 1,2-dimetossietano (15 mL). La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione per dieci minuti, quindi vengono addizionati, in due tempi, acido 2-tiofenboronico (0,2816 g, $2,20 \cdot 10^{-3}$ mol), in rapporto stechiometrico tra aldeide ed acido boronico di 1:1,2, e una soluzione acquosa di NaHCO_3 1 M (7,7 mL, $7,7 \cdot 10^{-3}$ mol) in 1,2-dimetossietano (15 mL), con un rapporto tra acido boronico e base di 1:3,5. La miscela è stata riscaldata alla temperatura di riflusso per quattro ore.

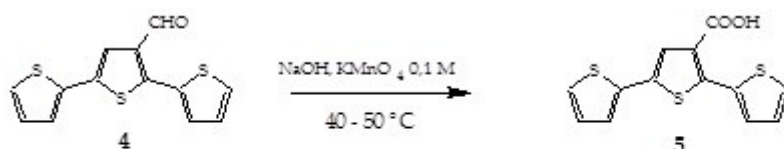
La successiva TLC evidenzia la presenza di substrato non reagito. Per questo motivo, la miscela di reazione è stata portata a secchezza. Il solvente è stato

quindi allontanato per evaporazione a pressione ridotta, ed il residuo è stato ripreso con 15 mL di DME. Alla soluzione così ottenuta sono stati aggiunti Pd(PPh₃)₄ (0,1264 g, 1, 1*10⁻⁴ mol), acido 2-tiofenboronico (0,2816 g, 2,20*10⁻³ mol) ed NaHCO₃ 1 M (7,7 mL), e la miscela è stata lasciata reagire, a riflusso sotto agitazione ed in atmosfera inerte, per ulteriori 90 minuti. Dopo aver constatato, sempre tramite TLC, la scomparsa del substrato **3**, la miscela di reazione è stata quindi filtrata su carta ed il solvente è stato allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il residuo solido è stato ripreso con 10 ml di H₂O, si estrae con etere dietilico (10 mL x 3 volte); la frazione organica è stata lavata inizialmente con 25 mL di acqua e quindi con 20 mL di una soluzione satura di NaCl, e anidrificata con MgSO₄, filtrata e portata a secco all'evaporatore rotante. Il prodotto grezzo ottenuto (372,2 mg) è stato cromatografato su colonna (fase stazionaria: silice, fase mobile: etere di petrolio/acetato di etile 9:1). Sono stati così ottenuti (0,1190 g, 4,30*10⁻⁴ moli) di 3'-formil-2,2':5',2''-tertiofene, attribuzione in prima istanza ipotizzata dalla valutazione del punto di fusione (64°C), noto da una precedente Tesi di dottorato (17), e quindi confermata da ulteriori evidenze spettroscopiche.

p.f. 64±1° C

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ=10.09 (s, 1H, CHO), 7.57 (s, 1H, H_{4'}), 7.51 (dd, 1H, H₅, ³J = 5.1 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.32 (dd, 1H, H₃, ³J = 3.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.30 (dd, 1H, H_{5''}, ³J = 5.1 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.23 (dd, 1H, H_{3''}, ³J = 3.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.17 (dd, 1H, H₄, ³J = 5.1 Hz, ³J = 3.6 Hz), 7.05 (dd, 1H, H_{4''}, ³J = 5.1 Hz, ³J = 3.6 Hz).

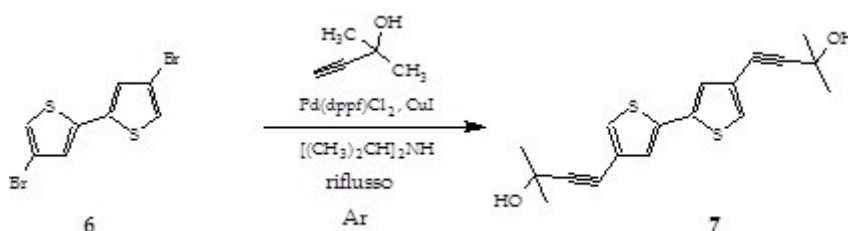
b) Sintesi dell'acido 3'-(2,2':5',2''-tertiofen)carbossilico.



In una beuta da 25 mL sono stati introdotti 3'-formil-2,2':5',2''-tertiofene ((4) 0,0600 g, $2,17 \cdot 10^{-4}$ moli) e 4 mL di una soluzione acquosa di NaOH 0,08 M (0,0130 grammi, $3,2 \cdot 10^{-4}$ mol). La soluzione è stata riscaldata per 25 minuti a 40°C , e sono quindi stati addizionati 2,1 mL ($2,1 \cdot 10^{-4}$ mol) di KMnO_4 0,1 M (18). La soluzione è stata ulteriormente riscaldata per altri 15 minuti a 50°C ed il prodotto solido è stato filtrato e lavato con H_2O . La frazione acquosa è stata acidificata con HCl al 37% ed estratta con CH_2Cl_2 /acetato di etile in rapporto 1:1. L'estratto organico è stato quindi anidrificato con MgSO_4 , filtrato e portato a secco. Le esigue quantità di prodotto recuperato, che si sono rivelate insufficienti anche per le ordinarie caratterizzazioni analitiche e spettroscopiche, ci portano ad ipotizzare che in realtà il trattamento con KMnO_4 abbia determinato la completa distruzione del substrato di partenza.

2.6.7.3 Sintesi del 4,4'-bis(4-etinil-carbossifenil)bitiofene (BT-ET-PhCOOH).

a) 1° step: sintesi del 4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis-(2-metil-3-butin-2-olo)

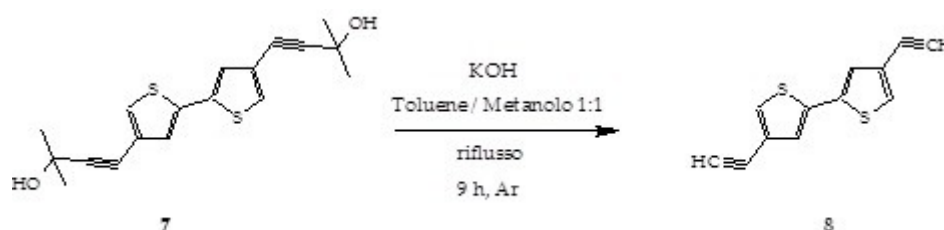


In un pallone a due colli da 25 mL è stata preparata una soluzione di 4,4'-dibromo-2,2'-ditiofene ((6) 0,3000 g, $9,26 \cdot 10^{-4}$ mol), Pd(dppf)Cl_2 (0,0076 g,

1,04*10⁻⁵ mol), CuI (0,0053 g, 2,78*10⁻⁵ mol), 2-metil-3-butin-2-olo (200 μL, 1,86*10⁻³ mol) (rapporto substrato : alcol 1:2) in diisopropilammia (5 mL). La miscela è stata fatta reagire alla temperatura di riflusso per 8 ore, ovvero sino a scomparsa del substrato **6**, verificata tramite TLC (fase stazionaria: silice, miscela eluente: etere di petrolio/acetato di etile 6:4). La miscela di reazione è stata quindi raffreddata ed estratta con 25 mL di CH₂Cl₂ e 25 mL di una soluzione satura di NaHCO₃. La frazione organica è stata lavata con H₂O (25 mL x 3), anidrificata con MgSO₄ e filtrata, e il solvente è stato evaporato sotto vuoto. Il prodotto ottenuto, 4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis-(2-metil-3-butin-2-olo) (**7**) (0,2460 mg, 7,45*10⁻⁴ mol), è stato quindi cromatografato su colonna (fase stazionaria: silice, miscela eluente: etere di petrolio/acetato di etile 6:4). Sono stati ottenuti 0,1000 g di prodotto sotto forma di una polvere scura. Resa: 32,72%.

¹HNMR (CD₂Cl₂, ppm) δ_H = 7.31 (s, 2H); 7.16 (s, 2H); 1.64 (s, 12H, CH₃).

b) 2° step: sintesi del 4,4'-etinil-2,2'-bitiofene

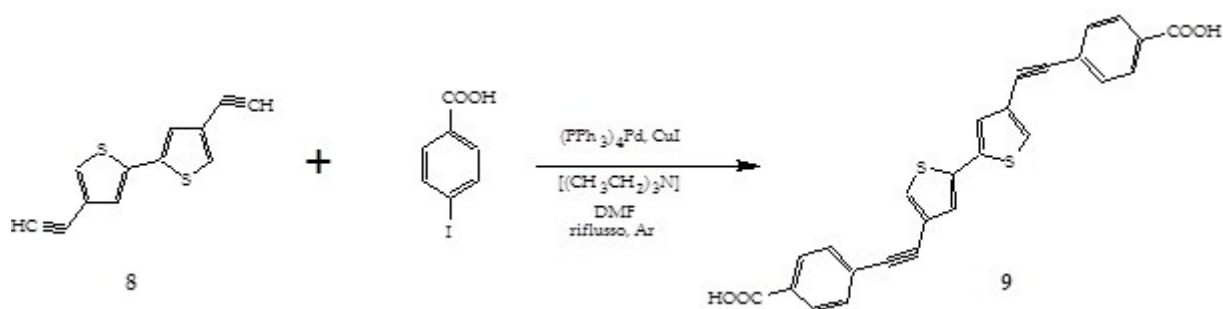


In un pallone a due colli da 25 mL dotato di agitatore magnetico e di condensatore, a una soluzione di 4,4'-(2,2'-bitiofenil)bis-(2-metil-3-butin-2-olo) (**7**) (0,1000 g, 3,03*10⁻⁴ mol) preparata sotto atmosfera inerte in toluene/metanolo 1:1 (preventivamente deossigenati) si aggiunge KOH in scaglie in leggero eccesso. La miscela di reazione viene lasciata a riflusso e sotto costante agitazione per 6 ore sino alla formazione del prodotto **8**, verificata attraverso

cromatografia su strato sottile (fase stazionaria: silice; fase eluente: etere di petrolio/acetato di etile 6:4). La soluzione viene portata a temperatura ambiente e quindi trasferita in un imbuto separatore in cui vengono addizionati 50 mL di H₂O e 150 mL di CH₂Cl₂. La frazione organica viene trattata con 200 mL di una soluzione satura di NH₄Cl, anidrificata con MgSO₄ e filtrata, e il solvente viene allontanato sottovuoto. Il prodotto grezzo ottenuto è stato quindi sottoposto a cromatografia su colonna (fase stazionaria: silice; fase eluente: etere di petrolio/acetato di etile 6:4), che ha portato a 0,0350 g (1,63*10⁻⁴ mol) di prodotto **8**. Resa: 53,79%.

¹HNMR (CDCl₃, ppm): δ_H = 7,43 (s, 2H); 7,22 (s, 2H); 3,07 (s, 2H, C≡CH).

c) 3° step: sintesi del BT-ET-PhCOOH.



In un pallone a due colli da 25 mL è stata preparata, sotto flusso di Ar, una soluzione di 4,4'-etnil-2,2'-bitiofene ((**8**) 0,0355 g, 1,63*10⁻⁴ mol) e di acido 4-iodobenzoico (0,0892 g, 7,76*10⁻⁴ moli), in presenza di Pd(PPh₃)₄ (0,0113 g, 9,8*10⁻⁶ moli) e CuI (0,0024 g, 1,3*10⁻⁵ moli) e trietilammina (52,43 μL, 0,0381 g, 3,8*10⁻⁴ moli) in 10 mL di N,N-dimetilformammide. La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso per 6 ore. La soluzione è stata quindi raffreddata ed addizionata di 70 mL di acetato di etile e 70 mL di HCl al 10%. La frazione organica è stata trattata con H₂O (70 mL x 3) e 70 mL di una soluzione satura di

NaCl. La soluzione è stata quindi anidrificata con MgSO_4 , filtrata ed evaporata a secchezza a pressione ridotta. Il prodotto (0,0800 g, $1,76 \cdot 10^{-4}$ moli) è stato caratterizzato attraverso $^1\text{HNMR}$ in CDCl_3 .

$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3 , ppm): $\delta_{\text{H}} = 7,87$ (d, 4H, $J_{1,2}$ 7,50 Hz); 7,81 (d, 4H, $J_{2,1}$ 8,33 Hz); 7,56 (s, 2H); 7,10 (s, 2H).

2.6.8 Polimerizzazione elettrochimica del 4,4'-bis(4-etinil-carbossifenil)bitiofene (BT-ET-PhCOOH) su disco di Pt in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0.1M.

La caratterizzazione voltammetrica del BT-ET-PhCOOH in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M su elettrodo lavorante di Pt (figura 2.82) indica la presenza di un processo anodico a +1,2 V, attribuibile all'ossidazione del frammento tertiofenico e un picco catodico associato a +1,0 V, meglio visibile in scansioni successive alla prima.

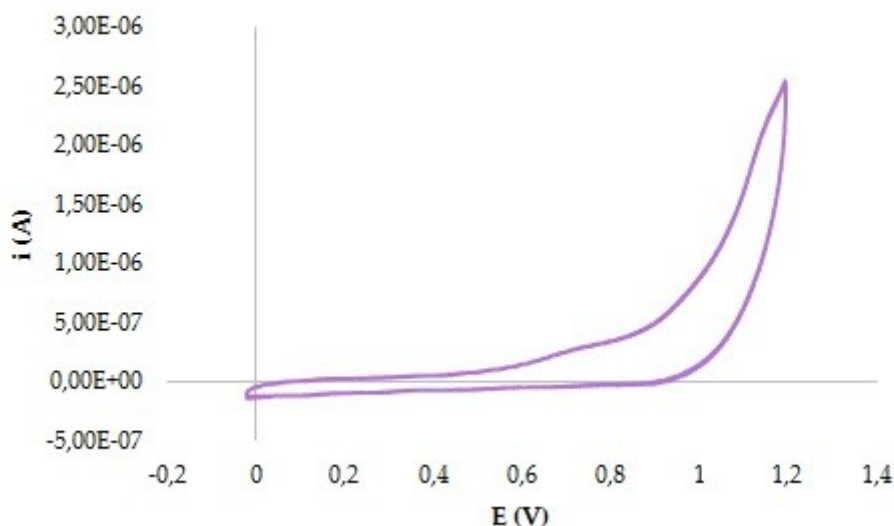


Figura 2.82. Caratterizzazione voltammetrica di una soluzione 1×10^{-3} M di BT-ET-PhCOOH in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. WE=Pt, RE=Ag/AgCl, CE=grafite, $v=100\text{mV/s}$.

Scansioni ripetute del potenziale tra -0,70 V e +1,30 V (figura 2.83) evidenziano un incremento di corrente ad ogni scansione, indicativo della presenza di un film in crescita, con formazione di un polimero di colore rosso sulla superficie elettrodica.

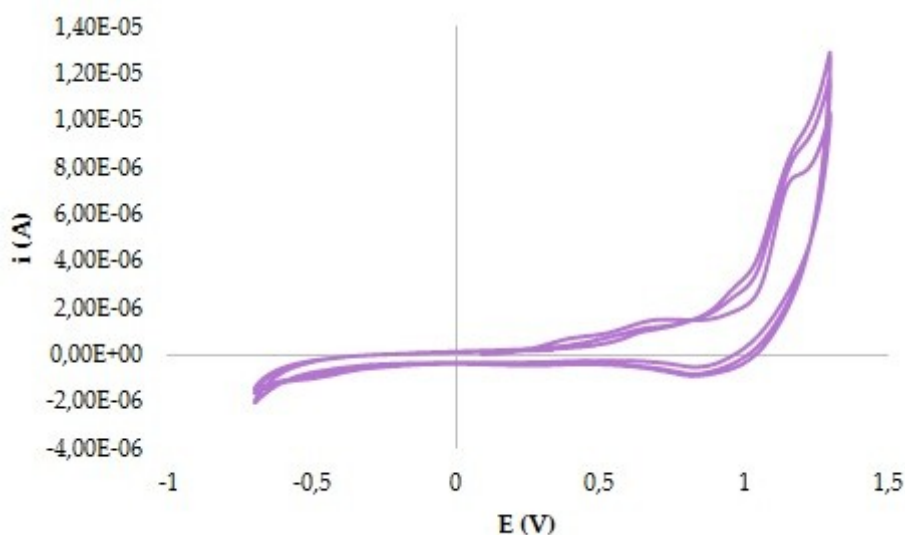


Figura 2.83. Polimerizzazione potenziodinamica di ET-BT-PhCOOH su Pt tra -0,70 V e +1,30 V (3 scansioni).

Sulla base dei risultati ottenuti in voltammetria ciclica, la deposizione dei film sulla superficie dell'elettrodo di Pt è stata eseguita per via cronoamperometrica a +1,20 V che ha permesso, in funzione della carica monitorata, di ottenere film polimerici aventi spessore in un ampio range compreso tra 31,5 nm e 18,8 μm . I film polimerici, neutralizzati a 0 V per 300 s, appaiono colorati di rosso.

I depositi polimerici di poli(BT-ET-PhCOOH) così ottenuti sono stati caratterizzati in una soluzione contenente il solo sistema solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TEAPF}_6$ 0,1 M. La caratterizzazione in campo anodico di uno dei polimeri elettrodepositati, riportata in figura 2.84, mostra la presenza di un picco anodico a +1,20 V ed un picco catodico associato a +1,02 V.

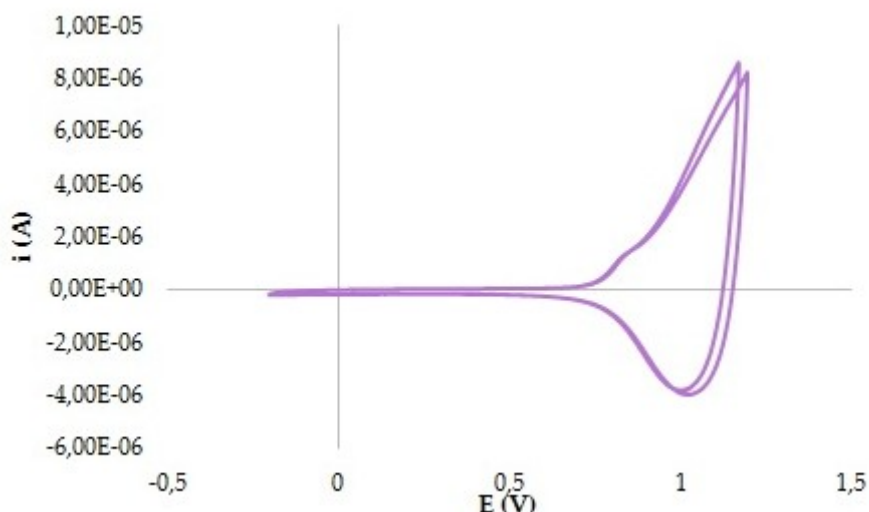


Figura 2.84. Caratterizzazione voltammetrica del tratto anodico di Pt/poli(BT-ET-PhCOOH), spessore 31,53 nm. Sistema solvent: CH₂Cl₂/TEAPF₆ 0,1 M. RE=Ag/AgCl, CE=grafite, v=100mV/s.

L'elettrodo di Pt/poli(BT-ET-PhCOOH) è stato immerso per circa 12 ore in una soluzione tampone a pH=7 di EDC 0,4 M /NHS 0,1 M. I gruppi carbossilici del film polimerico sono stati così attivati attraverso la formazione di un legame covalente carbo-immidico (CO-NH), in modo tale da favorire, nello step successivo, il legame con l'enzima tirosinasi (19). Il film è stato dunque caratterizzato in tampone fosfato a pH 7,0 e trattato con 25 µL di una soluzione enzimatica, preparata solubilizzando 10 mg di tirosinasi in 0,1 mL di tampone fosfato 0,1 M pH=7. La caratterizzazione del film evidenzia un processo anodico a +0,80 V attribuibile al doping del polimero ed un picco catodico a -0,20 V associabile al de-doping polimerico. Il biosensore è stato quindi trattato con 25 µL di una soluzione di glutaraldeide, ottenuta diluendo 2,11 µL di glutaraldeide in 3 mL di tampone fosfato 0,1 M a pH=7, al fine di completare la procedura di immobilizzazione dell'enzima. L'elettrodo è stato quindi conservato a 4°C sino al momento dell'impiego.

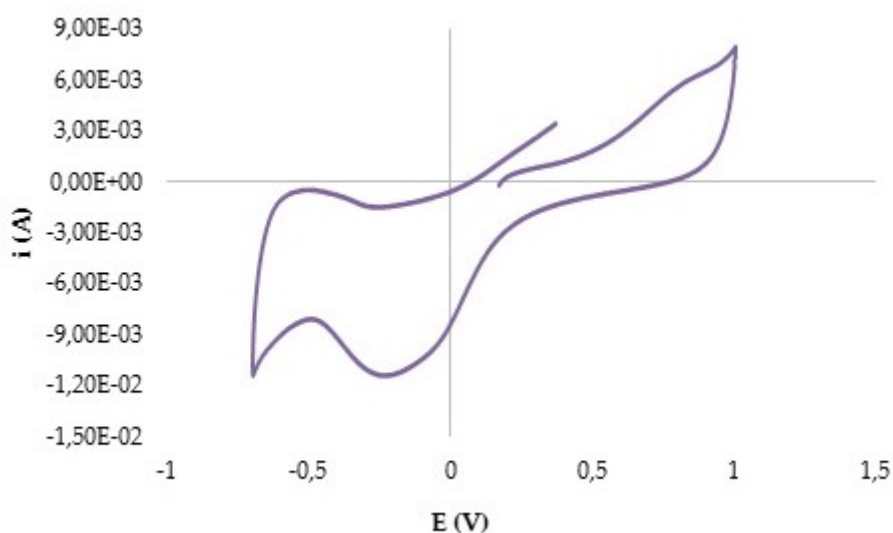


Figura 2.85. Caratterizzazione del film di poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS in tampone fosfato pH 7.0 a $E = -0,60 \text{ V} \div +1,10 \text{ V}$.

2.6.9 Risposta amperometrica del catecolo in tampone fosfato con il biosensore Pt /poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr.

Il biosensore Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/Tyr, con film polimerico dello spessore di 31,53 nm, è stato utilizzato per la costruzione di una retta di calibrazione in un intervallo di concentrazioni di catecolo compreso tra 10^{-6} M e $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Il responso corrente/tempo (figura 2.86) suggerisce una scarsa sensibilità per i valori di concentrazione superiori al limite estremo del range considerato. La funzione di calibrazione (figura 2.87) appare lineare in maniera accettabile nel range di concentrazioni considerato.

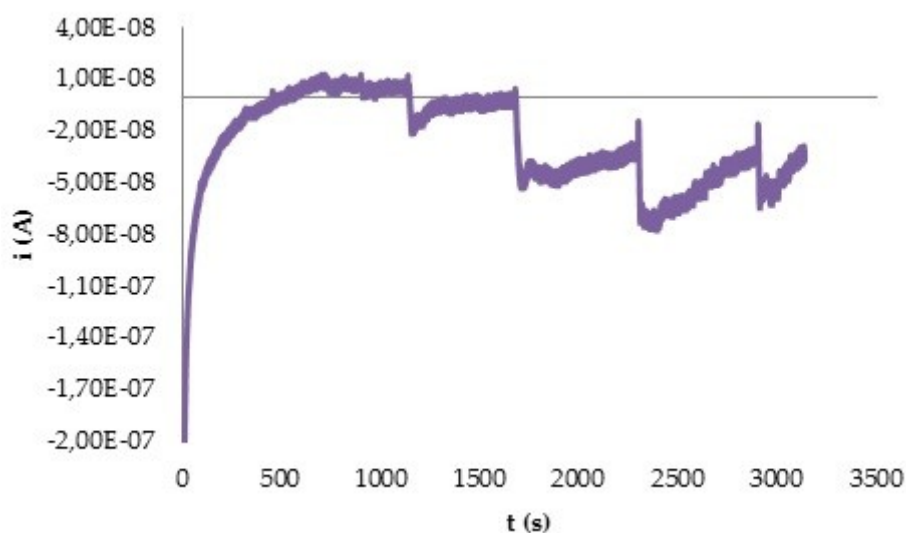


Figura 2.86. Responso corrente/tempo dell'elettrodo Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr/GA per concentrazioni di catecolo tra 10^{-6} M e 5×10^{-5} M. Potenziale di lavoro: -0.2 V. spessore 31,53 nm.

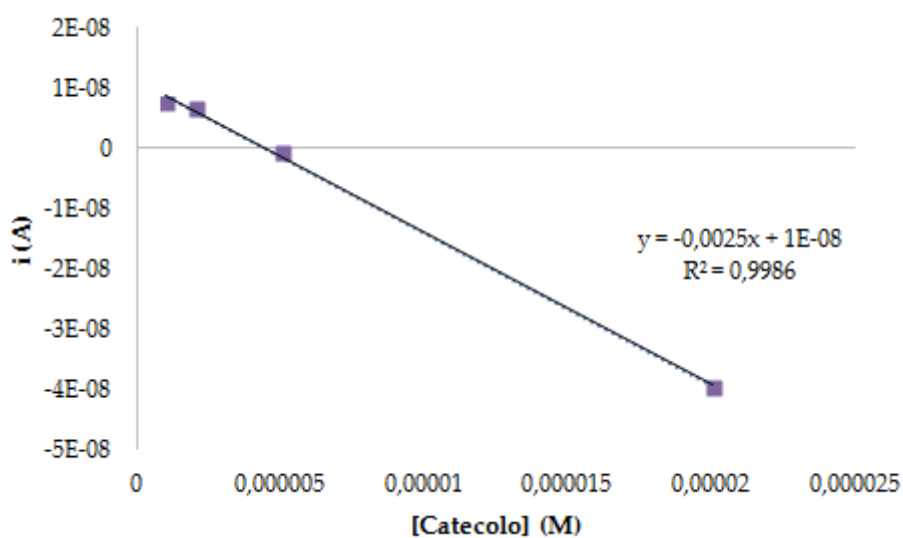


Figura 2.87. Retta di calibrazione ottenuta per la risposta del biosensore ad aggiunte di catecolo tra 10^{-6} M - 2×10^{-5} M con elettrodo Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr a -0.2 V.

Un nuovo biosensore analogo al precedente, ma avente spessore dello strato polimerico pari a 320 nm, è stato preparato in maniera analoga alla precedente e

sottoposto alle medesime caratterizzazioni al fine di verificarne la riproducibilità.

Sebbene il ridotto spessore del polimero conduttore causi un abbassamento del rapporto segnale/rumore (figura 2.88), la risposta in termini di variazione di corrente in funzione della variazione di concentrazione appare caratterizzata da una buona linearità, sempre e comunque confrontabile con quella ottenuta per il biosensore precedentemente preparato (figura 2.89).

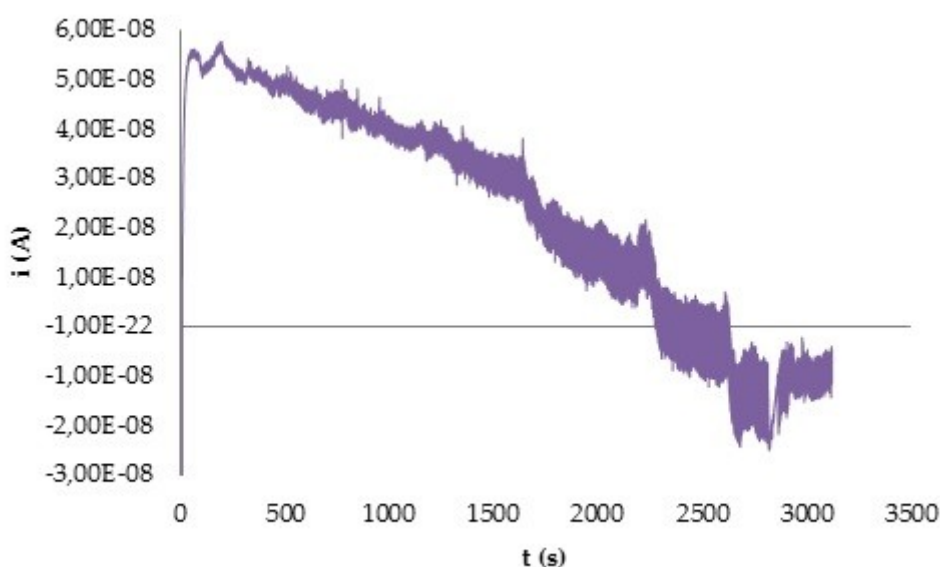


Figura 2.88. Responso corrente /tempo del biosensore Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr per concentrazioni di catecolo tra 10^{-6} M e 2×10^{-5} M. Potenziale di lavoro: -0.2 V. Spessore film: 320 nm.

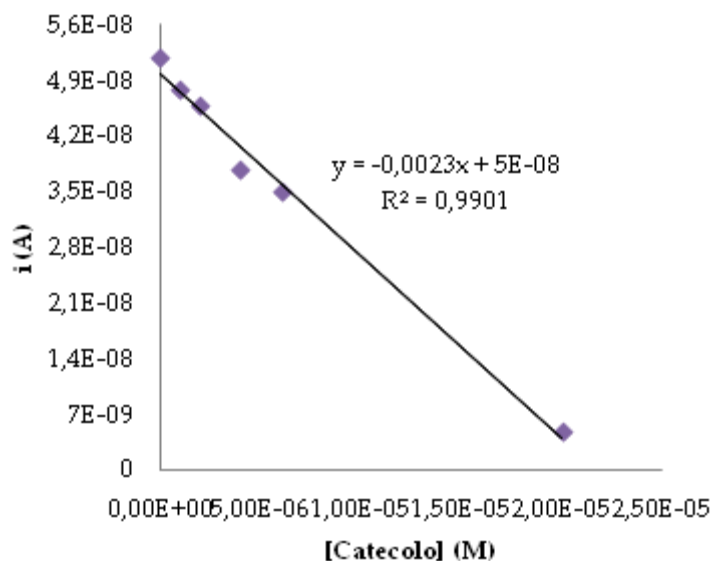


Figura 2.89. Retta di calibrazione ottenuta per la determinazione di catecolo tra 10^{-6} M - 2×10^{-5} M con il biosensore Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr a -0.2 V.

2.7 Commenti e prospettive future.

Contrariamente a quanto osservato per le applicazioni biosensoristiche alla determinazione dell'HMF in alimenti, esiste allo stato dell'arte un gran numero di biosensori volti alla determinazione di composti polifenolici in matrici di natura alimentare (20) (21). Uno degli approcci più frequentemente utilizzati è quello di elettropolimerizzare – su idoneo materiale elettrodico (talvolta micro- o nanostrutturato) – per ossidazione anodica un opportuno monomero (spesso di natura pirrolica o tiofenica). In tali condizioni la carica positiva del polimero conduttivo in fase di crescita viene ad essere controbilanciata da opportuni anioni, che possono essere sia quelli dell'elettrolita di supporto, che quelli di eventuali specie presenti in soluzione, ove esse siano cariche negativamente. E' questa la situazione in cui spesso si può presentare una delle componenti biologiche più utilizzata in trasduttori di questo tipo, l'enzima tirosinasi, attivo nel catalizzare l'ossidazione di monofenoli e di orto-difenoli a strutture

chinoniche, che vengono successivamente ridotte per via amperometrica sulla superficie elettrodica. Biosensori di tal tipo soffrono tuttavia di frequenti inattivazioni enzimatiche una volta che lo stesso risulta esser immobilizzato sulla superficie elettrodica: per evitare problematiche di questo tipo, numerosi accorgimenti sono stati adottati, che vanno dall'adozione di particolari tecniche di elettrodeposizione volte a creare superfici polimeriche rugose e porose, all'impiego di monomeri in possesso di gruppi funzionali in grado – o per affinità elettrostatica, o per effetti di natura sterica – di creare, nel framework polimerico, delle cavità ove l'enzima possa esplicare la sua funzione di biocatalizzatore minimizzando i fenomeni d'inattivazione. Quest'ultima è stata la strada da noi prescelta per cercare di mettere a punto un biosensore a tirosinasi da impiegare per la valutazione del profilo polifenolico del miele, problematica analitica ancora priva di riscontri specifici in letteratura. Scartata a priori la possibilità di operare in maniera competitiva sul fronte della natura (e della dimensione...) del materiale elettrodico, e stante la comprovata esperienza più che decennale nella sintesi e caratterizzazione di monomeri tiofenici variamente funzionalizzati, la loro elettropolimerizzazione e la successiva caratterizzazione ed applicazione dei polimeri conduttori in tal modo ottenuti, si è deciso di tentare di dare un contributo originale allo stato dell'arte operando sulla natura del materiale polimerico conduttore e – in subordine – sulla tecnica d'immobilizzazione dell'enzima. Lo schema di lavoro ha previsto – in prima battuta – di elettropolimerizzare su elettrodi di dimensioni convenzionali (diametro di 2 mm) di Au e di Pt dei monomeri bitiofenici originali di nostra sintesi, la 4-(4'-bromo-2-2'-bitiofenil)-N,N'-difenilanilina (Br-BT-TPA) e la 4-(4'-etinil-2-2'-bitiofenil)-N,N'-difenilanilina (ET-BT-TPA). Entrambi i monomeri sono caratterizzati dal fatto che – in posizione 4 rispetto ad un anello tiofenico – è presente un sostituito dotato di rilevante ingombro

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

sterico (sostanzialmente una trifenilammina), e quindi potenzialmente capace di dare un polimero conduttore poco compatto, in linea di principio idoneo ad ospitare – nelle sue cavità - l'enzima responsabile della biocatalisi ossidativa. Come tecnica d'immobilizzazione enzimatica è stata scelta quella del cross-linking con glutaraldeide. In quest'ambito si è riusciti ad avere un'adeguata risposta amperometrica solo in un ristretto range di concentrazioni (tra $1 \cdot 10^{-5}$ M e $5 \cdot 10^{-5}$ M) del polifenolo utilizzato come sistema campione (il catecolo) con il biosensore Pt/poli(Br-BT-TPA)/tyr/GA da 3.5 μ m di spessore, mentre con l'analogo biosensore depositato su Au non si oggettiva mai alcuna risposta amperometrica correlabile alla concentrazione di catecolo. Anche operando con biosensori in cui il polimero conduttore è poli(ET-BT-TPA), depositato su Au o Pt, per contro, non si ha mai attendibile risposta amperometrica. La diversità di comportamento amperometrico tra Pt/poli(Br-BT-TPA)/tyr/GA e Pt/poli(ET-BT-TPA)/tyr/GA potrebbe - in linea di principio - esser attribuibile al diverso ingombro sterico nello spazio tra un sostituito lineare - quale il gruppo etinilico - ed un atomo di significative dimensioni quale il bromo, forse meglio capace di creare spazi per una migliore allocazione dell'enzima. Alla luce delle prime evidenze, solo parzialmente confortanti, si è ipotizzato che un ben noto monomero tiofenico idrosolubile usato anche in tale contesto in pregressi studi (10) potesse essere d'utilità nella messa a punto di potenziali biosensori a tirosinasi per la determinazione di polifenoli nel miele. In analogia a quanto descritto da Lupu e da collaboratori (10) nella messa a punto di biosensori nanostrutturati ad array di microdischi di Au sul quale veniva successivamente elettrodepositato un layer di PEDOT/Tyr, si è riusciti ad ottenere anche nel nostro caso un biosensore Au/PEDOT/Tyr/GA amperometricamente attivo nel range di concentrazioni compreso tra $1 \cdot 10^{-6}$ e $5 \cdot 10^{-5}$ M in catecolo. Tuttavia, le prestazioni di questo sensore sono fondamentalmente sovrapponibili a quanto

Roberta Farre – *Biosensori elettrochimici di tipo amperometrico di potenziale interesse nella caratterizzazione di produzioni agroalimentari* – Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche, Università degli studi di Sassari.

già descritto da tale Autore in letteratura (10). E' da notare che l'analogo biosensore su Pt non evidenzia mai risposta amperometrica per soluzioni a concentrazione crescente di catecolo, e probabilmente ciò è da attribuire alla scarsa attitudine dell'EDOT a formare film polimerici di uno spessore significativo su tale materiale elettrodico. A questo punto, stante l'*impasse* della linea di ricerca, si è deciso di mettere a frutto le competenze acquisite nel campo della sintesi di monomeri opportunamente sostituiti a base tiofenica, pianificando dapprima la sintesi di un derivato tertiofenico (l'acido 3'-(2,2':5',2''- tertiofen)carbossilico), sintesi rivelatasi non praticabile dopo alcuni diversi approcci, e poi la sintesi del monomero simmetrico 4,4'-bis(4-etinil-carbossifenil)bitiofene, la cui elettropolimerizzazione su superficie di Pt, seguita dapprima dall'attivazione delle funzionalità carbossiliche mediante formazione di legami covalenti con l'enzima, e dal successivo completamento della procedura d'immobilizzazione enzimatica per trattamento con glutaraldeide, ha permesso di mettere a punto un biosensore Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr/GA con ottime proprietà di risposta lineare nel range di concentrazioni di catecolo tra $1 \cdot 10^{-6}$ e $5 \cdot 10^{-5}$ M, ed una buona riproducibilità operativa, anche a fronte di spessori di CP significativamente diversi.

La complessità e la lunghezza dell'approccio sintetico con cui si è arrivati alla preparazione del monomero BT-ET-PhCOOH ci ha purtroppo impedito di poter effettuare almeno un embrione del protocollo di validazione del promettente biosensore Pt/poli(BT-ET-PhCOOH)/EDC-NHS/Tyr/GA. E' quindi in programma – nell'immediato futuro – di provvedere innanzitutto all'ottimizzazione dei parametri operativi in maniera di migliorare sia il range dinamico lineare, che la riproducibilità di preparazione e la durata del biosensore, e la risposta nei confronti di altri semplici polifenoli campione come gli acidi gallico e caffeico. Successivamente la procedura analitica d'impiego del

biosensore ottimizzato verrà sottoposta a protocollo di validazione, ed esso verrà testato su matrice reale per poterne valutare l'effettiva applicabilità pratica.

1. **Manca P.** Tesi di Dottorato XXII ciclo. s.l. : Università degli Studi di Sassari.
2. **Lankinen E. et al.** J. Electroanal. Chem. 1998, Vol. 447, p. 135.
3. **Semenikhin O. A. et al.** Synt. Met. 2000, Vol. 110, p. 195.
4. **Gros P.** Electrochim. Acta. 2000, Vol. 46, pp. 643-650.
5. **Liu C. et al.** European Polymer Journal. 2007, Vol. 43, p. 3264-3276.
6. **Lomillo M. A. et al.** 2006, Electroanal., Vol. 18, p. 2435-2440.
7. **Spano N. et al.** Talanta. 2009, Vol. 78, p. 310-314.
8. **EU Directive/110/2001 of 02/12/2001 (L. 10/47).**
9. **Mocak J. et al.** Pure Appl. Chem. 69, 1997. IUPAC recommendation, document 550/35/87.
10. **Lupu S. et al.** Sensors. 2013, Vol. 13, p. 6759 - 6774.
11. **Senes N. A.A.** 2013-2014, Tesi di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche, Università di Sassari.
12. **Hoares D. G. et al.** Journal of biological chemistry. 1967, Vol. (242, p. 2447-2453.
13. **Sassolas A et al.** Biotechnology Advances. 2012, Vol. 30, pp. 489-511.
14. **Zanardi C. et al.** Electrochim. Acta. 2006, Vol. 51, p. 4859-4864.
15. **Collins G. E.** Tetrahedron Lett. 2001, Vol. 42, p. 8733.
16. **Gronowitz S. et al.** Heterocycles. 1990, Vol. 30, p. 645.
17. **Scanu R.** Tesi di Dottorato.
18. **Butters M. Schofield P. Stocker A.** WO 2004031193 A1 2004.
19. **Shalin J. et al.** Biosensor and Bioelectronics. 2014, Vol. 56, p. 64-70.
20. **ElKaoutit M. et al.** Food Chemistry. 2008, Vol. 110, p. 1019-1024.
21. **Sanz V. C. et al.** Analytica Chimica Acta. 2005, Vol. 528, p. 1-8.

Ringraziamenti

Ringrazio il mio Tutor, il prof. Gavino Sanna, per i suoi insegnamenti e la sua disponibilità, la dott.ssa Maria Pilo, che mi ha sempre seguito e mi è sempre stata accanto durante questo percorso non proprio semplice...grazie.

Grazie a Marco...amico fedele che in questi anni ha saputo sostenermi e sopportarmi.

Grazie alla mia famiglia, a Giampaolo, ai miei amici e a chi mi è stato vicino soprattutto durante i diversi momenti di sconforto.

Grazie infine ad Elisabetta, Nina ed Anna con cui ho condiviso il laboratorio ma anche tante belle pause caffè!