

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Fabbricazione di sensori immuno- elettrochimici per la determinazione di analiti di interesse biologico

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Manuel Ragnucci

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Erika Scavetta

CORRELATORI

Dott.ssa Federica Mariani

Luca Sartorelli

Riassunto

Il cortisolo è un ormone steroideo che viene rilasciato in quantità maggiori a seguito di situazioni di stress. La sua quantificazione all'interno dei fluidi biologici è un importante strumento diagnostico in quanto, oltre ad indicare lo stato di stress, regola anche pressione sanguigna, concentrazione di glucosio, e il metabolismo dei carboidrati, svolgendo, dunque, un ruolo essenziale nella salute dei pazienti. A tale scopo si è diffuso l'utilizzo di sensori elettrochimici, soprattutto biosensori, che mantengono selettività elevate e limiti di rilevazione molto bassi e comparabili alle tecniche classiche di laboratorio, ma hanno il vantaggio di essere più economici, semplici da utilizzare, e soprattutto miniaturizzabili. Queste caratteristiche li rendono adatti per applicazioni point-of-care (POC). I biosensori elettrochimici sono una tipologia di sensori elettrochimici in cui l'elettrodo viene funzionalizzato utilizzando molecole biologiche come aptameri, cioè frammenti di DNA, o proteine, quali enzimi o anticorpi.

In questo elaborato si è ottimizzata step by step la fabbricazione di biosensori immuno-elettrochimici per l'analisi della concentrazione di cortisolo utilizzando elettrodi d'oro bulk, screen-printed e microelettrodi interdigitati. Ogni step di funzionalizzazione è stato caratterizzato nel dettaglio utilizzando tecniche elettrochimiche (spettroscopia d'impedenza e voltammetria ciclica) e analisi di fluorescenza con anticorpo secondario marcato.

Abstract

Cortisol is a steroid hormone that is secreted in greater amounts in response to stressful events. Its measurement in biological fluids represents an important diagnostic tool because it not only reflects the physiological stress condition, but it also regulates blood pressure, glucose concentration, and carbohydrate metabolism, thus playing an essential role in patients' health. For this purpose, research on the development of electrochemical sensors, particularly biosensors, has become widespread. These devices retain the high selectivity and low detection limits of classical laboratory techniques, while offering the advantages of being more cost-effective, simple to use, and, above all, easily miniaturized, making them highly appropriate for point-of-care (POC) applications. Electrochemical biosensors are a type of electrochemical sensors in which an electrode is functionalized with biological molecules like aptamers (DNA fragments) or proteins, such as enzymes or antibodies.

In this work, the step-by-step optimization of the fabrication of immuno-electrochemical biosensors for the analysis of cortisol concentration was carried out, employing bulk gold electrodes, screen-printed electrodes, and interdigitated microelectrodes. Each functionalization step was characterized by electrochemical techniques (impedance spectroscopy and cyclic voltammetry) and by fluorescence analysis employing a labeled secondary antibody.

Sommario

1 – INTRODUZIONE.....	1
1.1 – Tecniche di analisi classiche.....	3
1.1.1 – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	3
1.1.2 – Immunodosaggio a fluorescenza (FIA)	7
1.1.3 – Tecniche cromatografiche e spettrometria di massa (MS)	10
1.2 – I biosensori	13
1.2.1 – La nascita dei biosensori	15
1.2.2 – Tipi di substrati	16
1.2.3 – Metodi di funzionalizzazione di immunosensori per la determinazione di cortisolo	20
1.2.4 – Tecniche elettrochimiche.....	22
2 – SCOPO DELL’ELABORATO.....	29
3 – PARTE SPERIMENTALE	30
3.1 – Reagenti utilizzati.....	30
3.2 – Strumenti utilizzati	30
3.3 – Elettrodi utilizzati	31
3.4 – Funzionalizzazione degli elettrodi	31
3.4.1 – Pulizia degli elettrodi e determinazione dell’area elettrochimica.....	31
3.4.2 – Attacco del cross-linker.....	34
3.4.3 – Incubazione per attacco dell’anticorpo	35
3.4.4 – Saturazione del cross-linker con BSA e conservazione overnight	36
3.4.5 – Incubazione per attacco dell’antigene	36
3.5.1 – Caratterizzazione mediante fluorescenza.....	37
3.5.2 – Caratterizzazione elettrochimica	37
4 – RISULTATI	41
4.1 – Pulizia degli elettrodi e determinazione dell’area elettrochimica	41
4.1.1 – Pulizia elettrochimica elettrodi d’oro	41
4.1.2 – Confronto dei metodi di pulizia per elettrodi bulk	43
4.1.3 – Caratterizzazione dello step di pulizia mediante EIS	44
4.1.4 – Caratterizzazione dello step di pulizia mediante CV	47
4.1.5 – Confronto delle aree elettrochimiche di elettrodi bulk	48
4.2 – Reazione con il cross-linker	50

4.2.1 – Funzionalizzazione con MPA.....	50
4.2.2 – Funzionalizzazione con DTSP.....	51
4.3 – Incubazione in anticorpo	54
4.3.1 – Risultati con anti-cortisolo da coniglio	54
4.3.2 – Risultati con anti-cortisolo da topo.....	55
4.3.3 – Confronto tra i due anticorpi.....	59
4.4 – Lavaggio in BSA.....	60
4.4.1 – Caratterizzazione con analisi EIS	60
4.4.2 – Caratterizzazione con CV	61
4.5 – Caratterizzazione dell’anticorpo con fluorescenza	63
4.5.1 – Test su nitrocellulosa.....	63
4.5.2 – Test su elettrodi d’oro bulk.....	64
4.6 – Conservazione dell’elettrodo funzionalizzato overnight	67
4.7 – Incubazione in cortisolo e caratterizzazione del biosensore	67
4.7.1 – Incubazione dell’elettrodo funzionalizzato in soluzioni a concentrazione crescente di cortisolo	68
4.7.2 – Incubazione dell’elettrodo funzionalizzato in una sola soluzione di cortisolo	70
4.8 – Cambio di forza ionica.....	71
5 – CONCLUSIONI.....	73
6 – BIBLIOGRAFIA	75

1 – INTRODUZIONE

Il cortisolo (struttura chimica in Figura 1A) è un ormone steroideo che viene naturalmente prodotto a partire dal colesterolo nelle ghiandole surrenali e regolato dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) nel cervello e viene rilasciato in tutti i fluidi biologici come sudore, lacrime, saliva, sangue e urina, come schematizzato in Figura 1B¹.

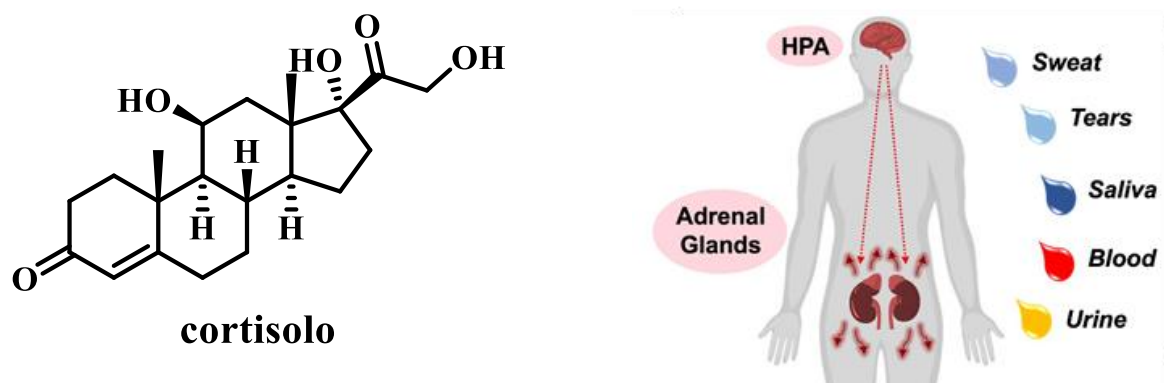


Figura 1. A - Struttura chimica del cortisolo. B - Schema di produzione e regolazione cortisolo¹

La concentrazione di cortisolo nei fluidi biologici è direttamente correlata all'esposizione a stress. Inoltre, questo ormone svolge un ruolo importante in molte attività fondamentali quali la regolazione del metabolismo, della pressione sanguigna, della funzione della memoria, della frequenza cardiaca e del sonno. Il cortisolo è coinvolto in molti sistemi quali endocrino, immunitario, riproduttivo, cardiovascolare e nervoso. La determinazione della concentrazione di cortisolo è importante per diagnosticare malattie come sindrome da stanchezza cronica o disturbi da stress post-traumatico, sindrome dell'intestino irritabile, malattie neurodegenerative come Alzheimer e sclerosi multipla, disturbi della salute mentale come ansia e depressione e cambiamenti fisici del corpo come aumento di peso o perdita di capelli¹. Inoltre, l'eccesso e il difetto di cortisolo sono noti rispettivamente come sindrome di Cushing e sindrome di Addison.

Un fattore importante da considerare per l'analisi della concentrazione di cortisolo è che, anche in condizioni di salute e senza fattori di stress, questa segue un ritmo circadiano, cioè varia durante le ore del giorno. In particolare, il ritmo circadiano del cortisolo è influenzato dal sonno: la sua concentrazione è più bassa durante l'inizio del sonno, con un minimo dalle 2:00 alle 4:00 di notte, mentre aumenta nelle parti finali, fino a raggiungere un massimo pochi minuti prima del risveglio, in genere dalle 7:00 alle 8:00. Il cortisolo è, infatti, fondamentale nell'inizio della veglia in quanto svolge un ruolo chiave nel sistema circadiano che influenza quasi tutti i tessuti e gli organi del corpo, controllando anche alcune funzioni biologiche come, ad esempio, quelle

cardiovascolari^{2,3}. In Figura 2 è riportato l'andamento della concentrazione di cortisolo durante la giornata.

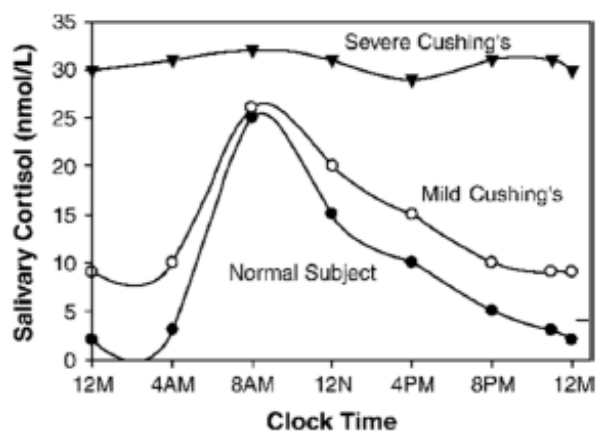


Figura 2 - Ritmo circadiano del cortisolo⁴

La concentrazione di cortisolo è variabile anche in funzione del fluido biologico sul quale viene effettuata l'analisi. La concentrazione più elevata si riscontra nel sangue; tuttavia, la sua determinazione può risultare poco attendibile poiché il prelievo, essendo un'analisi invasiva, può indurre stress in alcune persone e causare un innalzamento dei livelli di cortisolo^{5,6}. Per questo motivo di recente la ricerca è focalizzata su analisi non invasiva di fluidi biologici, in particolare sulla saliva⁷ la cui concentrazione è direttamente correlata a quella nel sangue⁸. I sensori sviluppati con questa finalità presentano la criticità di necessitare di sensibilità e selettività elevate: la concentrazione di cortisolo nella saliva può essere fino a due ordini di grandezza inferiore rispetto al sangue (siero)^{9,10}. In Tabella 1 sono riportati gli intervalli di concentrazione nei diversi fluidi biologici durante le 24 ore della giornata:

Tabella 1 - Intervalli di concentrazione di cortisolo in diversi fluidi biologici

Fluido biologico	Intervallo di concentrazione di cortisolo
Sangue ¹¹	5,52 – 69 μ M
Siero ¹²	46,2 – 626,0 nM
Saliva ¹²	1,3 – 27,0 nM
Sudore ¹¹	22,1 – 392 nM
Capelli ¹³	17,7 – 153,2 pg/mg

I valori di concentrazione di cortisolo determinati possono essere falsati nel caso di condizioni di stress acuto o cronico. Nel caso di stress acuto, ad esempio, è stato dimostrato con un test TSST (in cui gli individui sono sottoposti a stress sociale) che i livelli di cortisolo iniziano ad

aumentare subito prima dell'esposizione a stress, raggiungendo un massimo dopo 10-20 minuti per poi decrescere e tornare al livello basale dopo più di 60 minuti, come mostrato in Figura 3¹⁴.

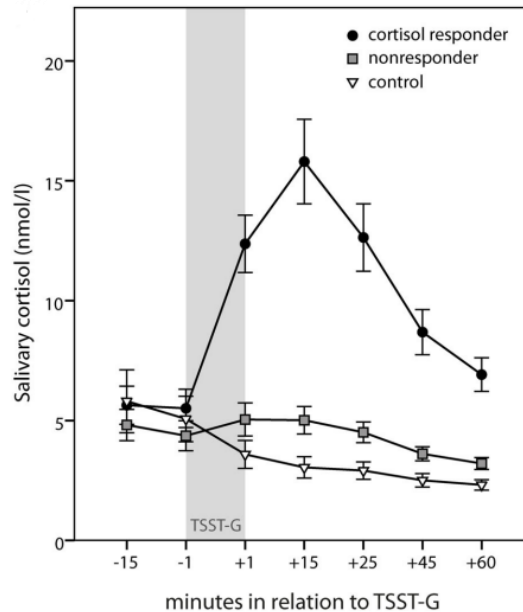


Figura 3- Variazione dei livelli di cortisolo in seguito a stress acuto¹⁴

Anche in caso di stress cronico, pure lieve, si è dimostrato un aumento di cortisolo misurato sui capelli e che la risposta dipende dal tipo di evento e condizione di stress¹⁵. Inoltre, l'esposizione a stress cronico può portare ad un appiattimento del ciclo circadiano, con la conseguente scomparsa dei picchi di concentrazione alla mattina, dovuto ad una risposta alterata dell'asse HPA e che può portare ad un aumento dell'insulina nel sangue e influenzare il metabolismo¹⁶.

1.1 – Tecniche di analisi classiche

Al fine di determinare con accuratezza la concentrazione di cortisolo nel sangue, sono riportate in letteratura diverse tecniche come spettrometria di massa (MS) abbinata a tecniche cromatografiche (HPLC, liquida o gas), e immunoanalisi (immunodosaggio a fluorescenza FIA, o saggio ELISA)⁴. Le più importanti sono descritte in seguito.

1.1.1 – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Il saggio immunoenzimatico (ELISA), così come tutte le tecniche di immunoanalisi, è basato sul legame antigene-anticorpo. A seconda della tipologia di anticorpo impiegata, è possibile riscontrare cross-reattività, cioè l'anticorpo può legare molecole simili all'antigene, in particolare cortisone e altri steroidi endogeni^{17,18}, generando una sovrastima della

concentrazione¹⁹. Esistono diverse varianti di ELISA: diretta, indiretta, sandwich e competitiva che vengono descritte di seguito, ma tutte sono basate sull'utilizzo di un enzima. Al posto di quest'ultimo si può utilizzare un isotopo radioattivo come marcatore: in questo caso la tecnica prende il nome di Radioimmunodosaggio (Radioimmunoassay RIA) ma per motivi di sicurezza è stata progressivamente abbandonata^{20,21}. Per tutte queste tecniche si utilizzano delle micropiastre, solitamente a 96 pozzetti come quella riportata in Figura 4, in cui si immobilizza l'antigene o l'anticorpo^{19,22}.

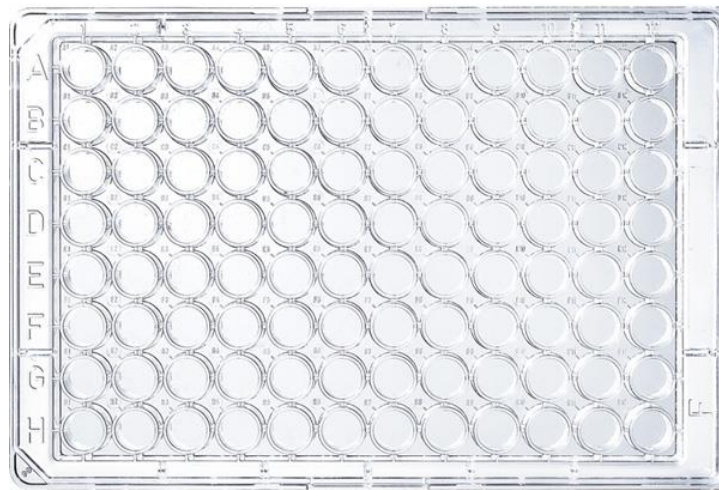


Figura 4 - Piastra per saggio ELISA

ELISA diretta: si immobilizza l'antigene che si vuole determinare (in questo caso il cortisolo) sulla piastra, prevalentemente per adsorbimento fisico sulla superficie polistirenica lasciandolo qualche ora o overnight^{22,23}, o mediante legami covalenti modificando la superficie della piastra o della molecola da legare. Si aggiunge, poi, una soluzione per saturare i siti della piastra rimasti liberi (ad esempio l'albumina sierica bovina, BSA); si aggiunge, quindi, un anticorpo coniugato ad un enzima per il riconoscimento dell'analita e si effettuano dei lavaggi per rimuovere gli anticorpi che non si sono legati all'antigene. Si inserisce, infine, il substrato specifico dell'enzima che viene trasformato da quest'ultimo in un prodotto colorato, fluorescente (ELISA fluorescente F-ELISA) o chemiluminescente (ELISA chemiluminescente CL-ELISA). È quindi possibile determinare la concentrazione dell'antigene mediante lettura, rispettivamente di assorbanza, intensità di fluorescenza o intensità della luce emessa¹⁹. Questo metodo risulta semplice e rapido, tuttavia non è molto sensibile in quanto il segnale non viene amplificato; viene, quindi, usato soprattutto per delle analisi qualitative e di screening preliminare. Sono state, comunque, costruite delle curve standard per il cortisolo nel plasma utilizzando l'ELISA e misurando l'assorbanza²³.

ELISA indiretta: Questa tecnica è analoga alla precedente, ma si differenzia in quanto l'enzima è coniugato ad un anticorpo secondario che, quindi, riconosce e si lega al primario non coniugato. Questo procedimento è quindi più lungo e complesso in quanto richiede uno step aggiuntivo e, inoltre, ci possono essere problemi di cross-reattività maggiori dovuti al secondario che può riconoscere altri anticorpi primari aumentando il rumore di fondo. Il vantaggio è che utilizzando l'anticorpo secondario il segnale viene amplificato, aumentando la sensibilità della misura. Questa tecnica è, comunque, utilizzata quasi esclusivamente per il riconoscimento di anticorpi^{19,24}.

Sandwich ELISA: In questa tecnica viene immobilizzato sulla piastra l'anticorpo (detto di cattura o capture antibody), dopo di che viene aggiunto il campione, in questo caso il fluido biologico, contenente l'antigene. Dopo un risciacquo per togliere la soluzione (rimane l'anticorpo con l'analita legato), si aggiunge una soluzione di un altro primario (detto di riconoscimento o detection antibody), differente da quello immobilizzato e coniugato ad un enzima, che ha specificità per lo stesso antigene¹⁹. In questo modo si crea un sandwich in cui l'analita è compreso tra i due anticorpi differenti. In alternativa, se l'anticorpo di riconoscimento non è legato ad un enzima si può utilizzare un anticorpo secondario coniugato che si lega all'anticorpo di riconoscimento (sandwich indiretto)²⁵. Questo metodo risulta più laborioso e più costoso in quanto sono necessari due anticorpi specifici per lo stesso antigene; tuttavia, la sua sensibilità è molto più elevata e la tecnica risulta più precisa in quanto utilizzando due anticorpi selettivi il rischio di cross-reattività è molto più basso. Un altro grande svantaggio è che l'antigene deve legare contemporaneamente due anticorpi in due siti differenti: ciò può risultare complesso per molecole piccole, tra le quali anche il cortisolo, che possiedono uno o pochi epitopi, cioè la parte di molecola che viene riconosciuta dall'anticorpo per la sua specificità²¹. Nel caso specifico è impossibile utilizzare questa modalità di misura per molecole con un solo epitopo. Anche per il cortisolo, infatti, non sono riportati esempi in letteratura che utilizzino questo metodo, se non sandwich con anticorpo primario immobilizzato in piastra e aptamero con enzima coniugato^{26,27} (come nello schema in Figura 5).

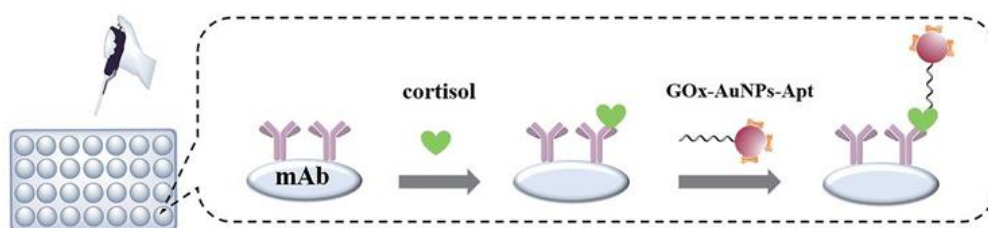


Figura 5 - Esempio di sandwich ELISA su cortisolo con aptamero²⁷

In Figura 6 sono riportati gli schemi delle tecniche ELISA diretta, indiretta e sandwich, sia con anticorpo primario (AB') di riconoscimento coniugato all'enzima, sia con anticorpo secondario (AB'').

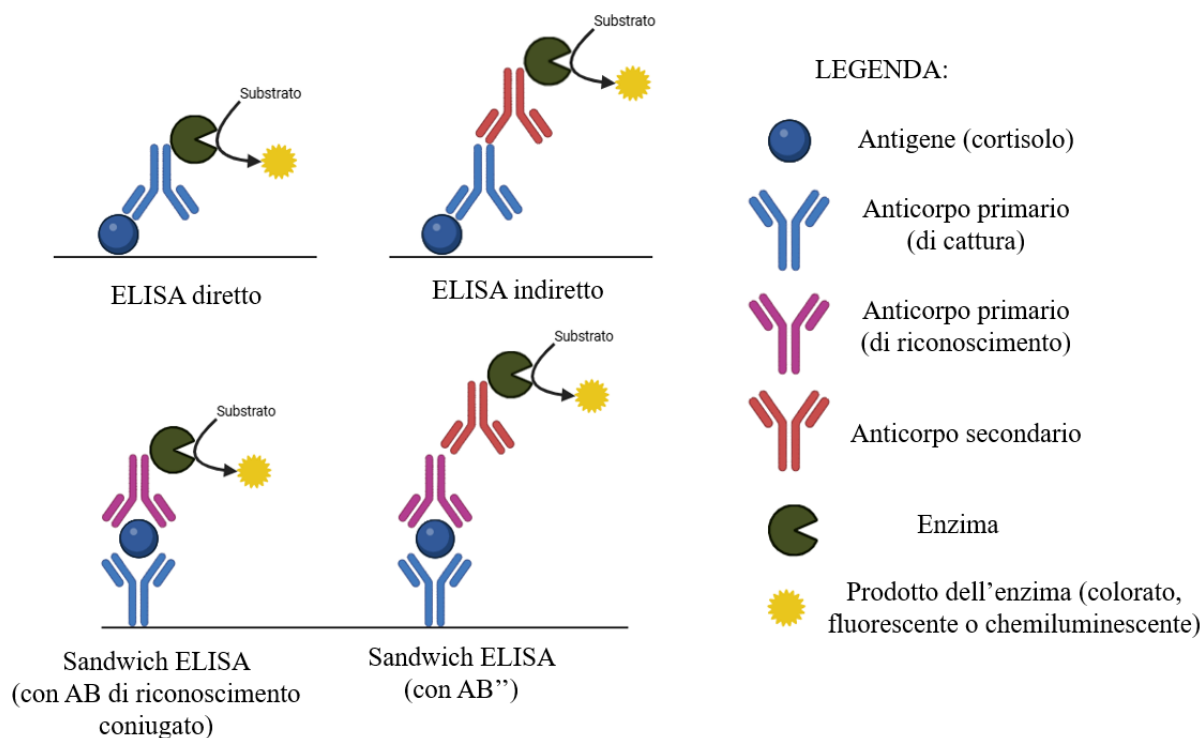


Figura 6 - Schemi di ELISA diretto, indiretto e sandwich

ELISA competitiva: Anche in questa tecnica viene immobilizzato l'antigene sulla piastra, dopo di che si utilizza la soluzione bloccante (es. BSA) per evitare legami aspecifici. Si aggiunge, quindi, il campione (fluido biologico) contenente l'analita e un anticorpo specifico: o già coniugato con l'enzima, o con successiva aggiunta di un secondario coniugato che si lega al primario. L'antigene bloccato e quello nel campione, quindi, competono per legarsi all'anticorpo dopo di che si effettua un lavaggio per rimuovere anticorpo e analita in soluzione non legati alla piastra. Mediante l'aggiunta del substrato per l'enzima si produce una molecola colorata, fluorescente o chemiluminescente che viene quindi quantificata. Ciò che si ottiene è un segnale inversamente proporzionale alla concentrazione di analita: più l'antigene nel campione è concentrato più tenderà a legare l'anticorpo lasciandone meno disponibile per l'attacco all'antigene immobilizzato nella piastra che, di conseguenza, formerà meno prodotto mediante l'enzima²¹. Questa tecnica ha il vantaggio di poter essere utilizzata anche per piccoli antigeni con un solo epitopo o per molecole per le quali è difficile avere due anticorpi primari di riconoscimento²⁵. Lo svantaggio principale è, invece, quello di avere un segnale inverso rispetto alla concentrazione che deve essere determinata utilizzando standard a concentrazione

nota. Inoltre, la sensibilità dipende dalla specificità dell'anticorpo utilizzato ed è fondamentale ottimizzare la quantità di quest'ultimo e il tempo di incubazione in quanto sono parametri che influiscono molto sul risultato finale. In Figura 7 è riportato uno schema di ELISA competitivo utilizzando direttamente un anticorpo primario coniugato all'enzima.

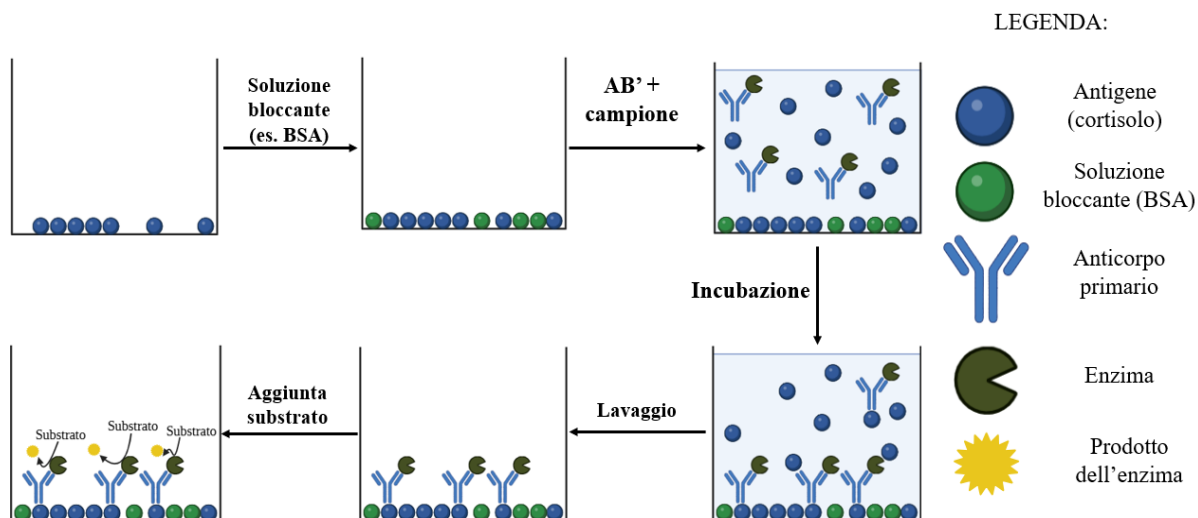


Figura 7 - Schema di ELISA competitivo

Meno frequentemente si usa immobilizzare l'anticorpo invece dell'antigene: in questo caso oltre al campione si aggiunge anche dell'altro analita marcato che compete per legarsi all'anticorpo bloccato nella piastra. Il meccanismo è lo stesso utilizzato nel bloccare l'antigene: una volta sciacquato si quantifica l'antigene marcato (ad esempio mediante fluorescenza) e la concentrazione di analita nel campione è inversamente proporzionale in quanto più è concentrato più si lega al posto di quello marcato. Mediante curve di calibrazione preparate utilizzando standard a concentrazione nota si risale, dunque, alla quantità di analita presente nel campione²¹.

1.1.2 – Immunodosaggio a fluorescenza (FIA)

In questa tecnica il riconoscimento del legame antigene-anticorpo viene rivelato mediante una molecola fluorescente (fluoroforo, ad esempio la fluoresceina²⁸) che, analogamente all'ELISA, può essere coniugata all'anticorpo primario (immunodosaggio diretto) o ad un anticorpo secondario in grado di riconoscere il primario e legarsi a questo (immunodosaggio indiretto). Anche in questo caso è possibile utilizzare un sandwich FIA, un FIA competitivo o un FIA multiplex in cui usando diverse molecole marcate si riescono ad analizzare più di un analita contemporaneamente. I dettagli di queste modalità sono riportati in seguito.

Immunodosaggio diretto a fluorescenza

In questa tecnica si utilizza un anticorpo primario fluorescente, e comprende l'incubazione del campione con l'anticorpo e un antigene marcato per poi leggere il segnale in fluorescenza con luce polarizzata. In questo modo l'analita non legato, che è una molecola piccola, porta a perdita della polarizzazione della luce durante il tempo di vita dello stato eccitato in quanto ruota velocemente. Il complesso anticorpo-antigene, invece, ruota più lentamente in quanto ha una dimensione maggiore e fa sì che la luce rimanga polarizzata. In questo modo è possibile distinguere il complesso dall'antigene libero e analogamente all'ELISA competitivo la polarizzazione è inversamente proporzionale alla quantità di analita^{29,30}. Il meccanismo è, infatti, di tipo competitivo ma viene nominato come diretto in quanto non necessita di lavaggi. Più recentemente sono state anche utilizzate beads magnetiche che catturano il complesso³¹, ed infine si effettua la lettura dell'intensità di fluorescenza alla lunghezza d'onda di eccitazione del fluoroforo che mediante retta di calibrazione effettuata con degli standard conduce alla concentrazione di antigene. Un'alternativa simile all'ELISA è quella di bloccare l'anticorpo marcato in una piastra in modo da poter lavare ciò che non si è legato ottenendo un segnale più definito e meno rumore di fondo. In entrambi i casi questa tecnica ha lo svantaggio di risultare meno sensibile in quanto non è presente un anticorpo secondario che possa amplificare il segnale, nonostante sia una tecnica veloce, semplice e a basso costo³².

Immunodosaggio indiretto a fluorescenza

In modo analogo all'ELISA indiretto viene immobilizzato l'antigene in piastra e viene aggiunto un anticorpo primario specifico e non coniugato. In seguito all'incubazione si rimuovono gli anticorpi non legati mediante lavaggio e si aggiunge un anticorpo secondario marcato che si lega al primario e si misura, infine, l'emissione eccitando il fluoroforo. Anche questo metodo non viene utilizzato per il cortisolo ma principalmente per la quantificazione di anticorpi in quanto il cortisolo è una molecola molto piccola³³. I vantaggi risultano, infatti, proprio per analiti più grandi (come proteine) in grado di legare anche più di un primario alla volta che a sua volta potrà legare più di un secondario in modo da amplificare il segnale³⁴.

Immunodosaggio a fluorescenza sandwich

Anche questa tecnica risulta poco adatta per la detection del cortisolo in quanto l'antigene deve legare contemporaneamente due anticorpi primari, come nel sandwich ELISA. Il meccanismo

è, infatti, identico con la differenza che l'anticorpo di riconoscimento è marcato con un fluoroforo invece che con un enzima. I vantaggi comprendono l'alta specificità dovuta al legame dei due anticorpi primari e, quindi, una maggiore sensibilità pur risultando più costosa in quanto sono necessari due anticorpi differenti.

In Figura 8 sono riportati gli schemi rispettivamente dell'immunodosaggio a fluorescenza diretto, indiretto e sandwich.

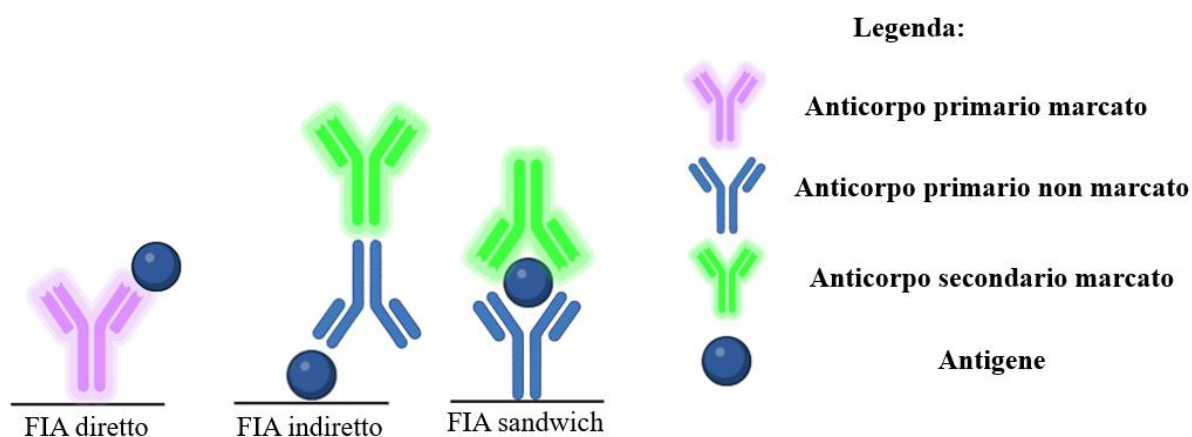


Figura 8 – Schemi di FIA diretto, indiretto e sandwich

Immunodosaggio a fluorescenza competitivo

Questa tecnica è del tutto analoga all'ELISA competitiva in cui si immobilizza un antigene o l'anticorpo nella piastra e mediante competizione per il legame tra i due si ottiene un segnale in fluorescenza, eventualmente dopo l'aggiunta di un secondario, inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Il vantaggio principale è l'opportunità di essere usato anche per molecole piccole che non hanno più di un epitopo.

Immunodosaggio a fluorescenza multiplex

Questa tecnica risulta molto utile per l'analisi di diversi antigeni contemporaneamente; ad esempio, utilizzando una piastra si depositano diversi anticorpi, uno per spot, e si aggiunge il campione contenente più analiti in modo tale che ognuno legga il suo anticorpo. Dopo i lavaggi è possibile analizzare contemporaneamente l'intera piastra con uno scanner a fluorescenza, eventualmente aggiungendo un secondario marcato se il primario non lo è, ottenendo l'intensità di ogni singolo spot e, quindi, la concentrazione dello specifico antigene. I vantaggi comprendono l'analisi di una grande quantità di analiti contemporaneamente impiegando una bassa quantità di campione. La criticità principale è l'aumento del rischio di cross-reattività ma

anche la necessità di strumentazione più complessa per la lettura delle piastre³⁵. In Figura 9A è riportato lo schema di un'analisi FIA multiplex, mentre in Figura 9B lo schema di un microarray reale³⁶.

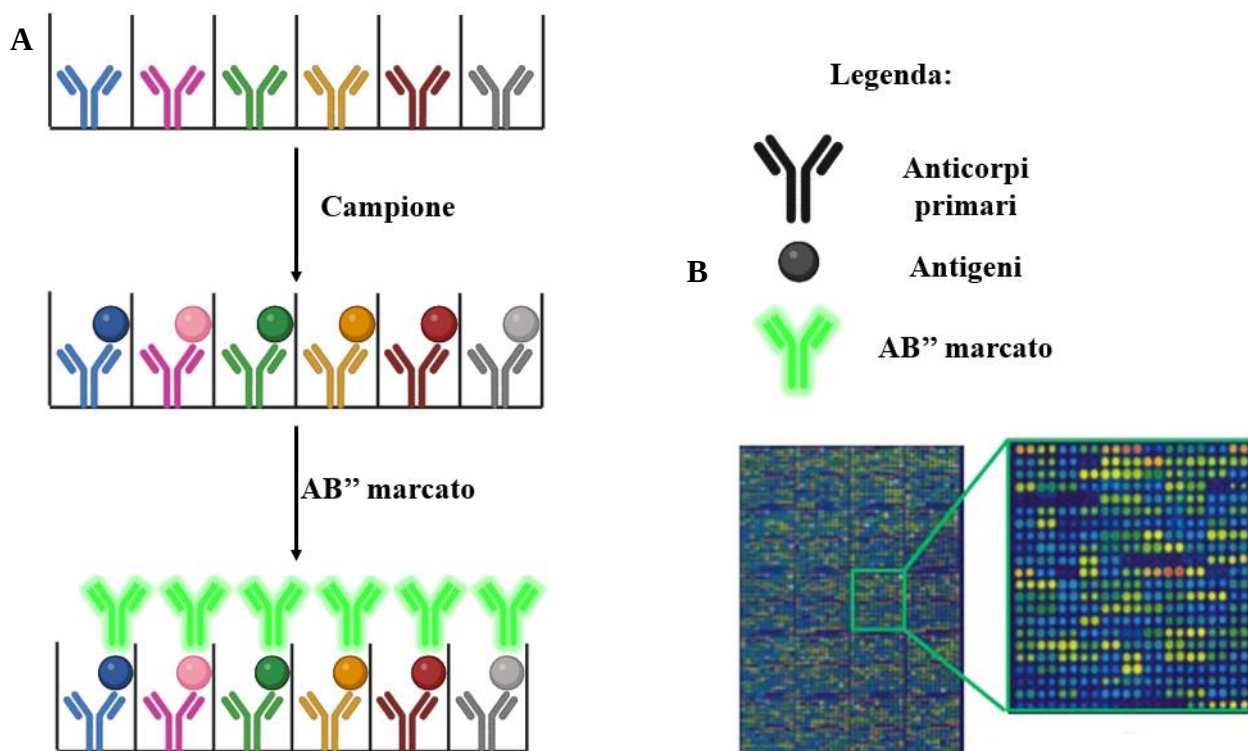


Figura 9 – FIA multiarray: A – schematizzata. B – esempio reale³⁶

1.1.3 – Tecniche cromatografiche e spettrometria di massa (MS)

L'utilizzo della spettroscopia di massa per l'analisi del cortisolo inizia poco dopo quello delle immunoanalisi ma solo più tardi, con la diffusione della cromatografia liquida, diventa la tecnica per eccellenza per sensibilità e selettività, grazie appunto alla separazione cromatografica³⁷. Questa è, infatti, essenziale in quanto il cortisolo si trova in fluidi biologici, per cui in matrici complesse di molecole anche simili tra loro e la possibilità di poterle separare offre, tra l'altro, l'opportunità di quantificare diversi analiti contemporaneamente. Inoltre, l'utilizzo della spettrometria di massa con separazione cromatografica risolve i problemi di cross-reattività che possono essere riscontrati nelle tecniche di immunoanalisi che causano un risultato sovrastimato della concentrazione di cortisolo¹⁷.

Cromatografia in fase gas (GC-MS)

La prima tecnica utilizzata per la rilevazione del cortisolo è stata la gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS). La molecola d'interesse deve, quindi, essere volatilizzata per essere iniettata; nel caso del cortisolo, che è una molecola poco volatile, questa deve essere derivatizzata, cioè trasformata in un suo derivato chimico più volatile. Questo viene iniettato in colonna contenente la fase stazionaria mediante il gas carrier dove viene separato dalle altre molecole contenute nel fluido biologico e mandato allo spettrometro di massa. Qui vengono ionizzate rompendo la molecola nei suoi frammenti principali che vengono riconosciuti in base al rapporto massa/carica. La quantità di cortisolo, e quindi la sua concentrazione, si può determinare integrando il picco del cromatogramma della separazione o dall'intensità dei segnali degli ioni, anche usando standard interni. La GC-MS può, quindi, essere utilizzata per analisi di più analiti contemporaneamente, ma solo se volatili, o comunque solo a seguito di diverse derivatizzazioni che rendono il processo più lungo e laborioso. In Figura 10 è riportato uno spettro di massa ottenuto per il cortisolo³⁸.

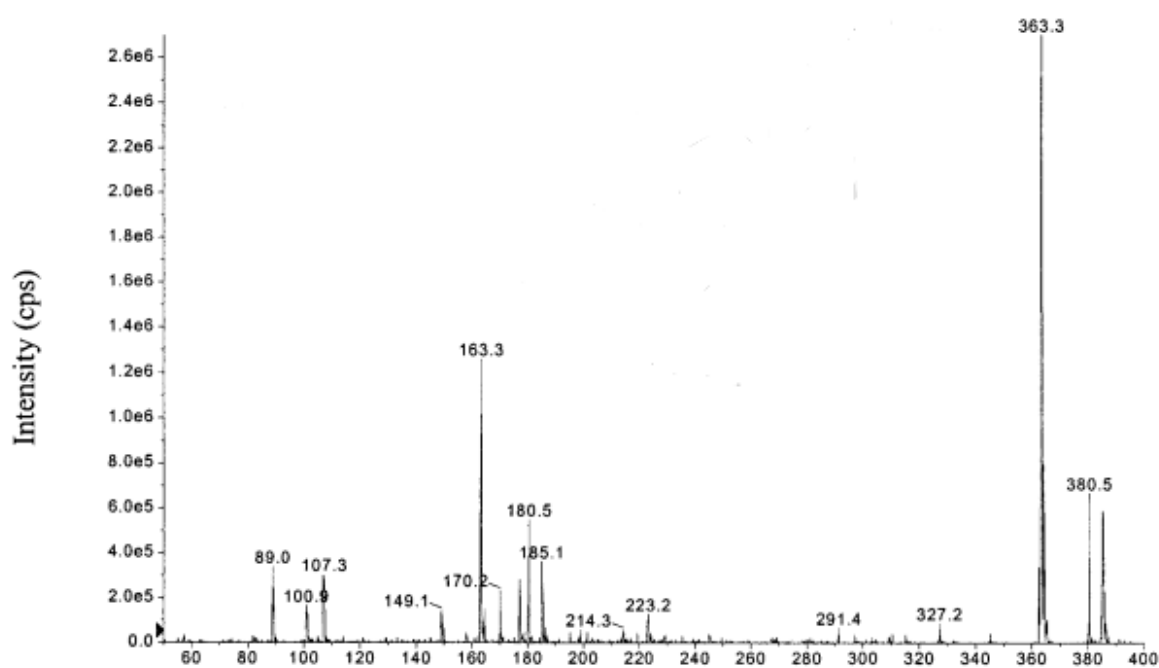


Figura 10 - Spettro di massa del cortisolo³⁸

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) e cromatografia in fase liquida (LC-MS)

La cromatografia in fase liquida non presenta il requisito di volatilizzare l'analita. Per questo motivo non è necessario derivatizzare il cortisolo ed è resa più semplice anche l'analisi di diverse molecole contemporaneamente.

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è stata utilizzata sin dall'inizio degli anni '80, inizialmente utilizzando un rivelatore UV, operante in un intervallo di lunghezze d'onda da 242 a 252 nm^{39,40}, alle quali il cortisolo assorbe debolmente. Per questo motivo la sensibilità era limitata, e negli anni successivi il rivelatore è stato sostituito accoppiando all'HPLC un'analisi di spettrometria di massa (MS). Per questa analisi il cortisolo va estratto dai fluidi biologici, spesso mediante estrazione in fase solida (SPE)³⁹ per eliminare eventuali interferenti. Il campione viene, quindi, iniettato in colonna HPLC contenente la fase stazionaria, ad esempio C18 fase inversa^{40,41}; qui viene separato in base alla sua affinità con quest'ultima (polarità, idrofobicità). A seguito della separazione si ottiene l'assorbanza rispetto al tempo mediante il rivelatore UV. Questa è proporzionale alla quantità di cortisolo che viene determinata utilizzando degli standard a concentrazione nota. In Figura 11 è riportato un esempio di cromatogramma ottenuto mediante HPLC di un campione di urina in cui viene evidenziato il picco relativo al cortisolo³⁹.

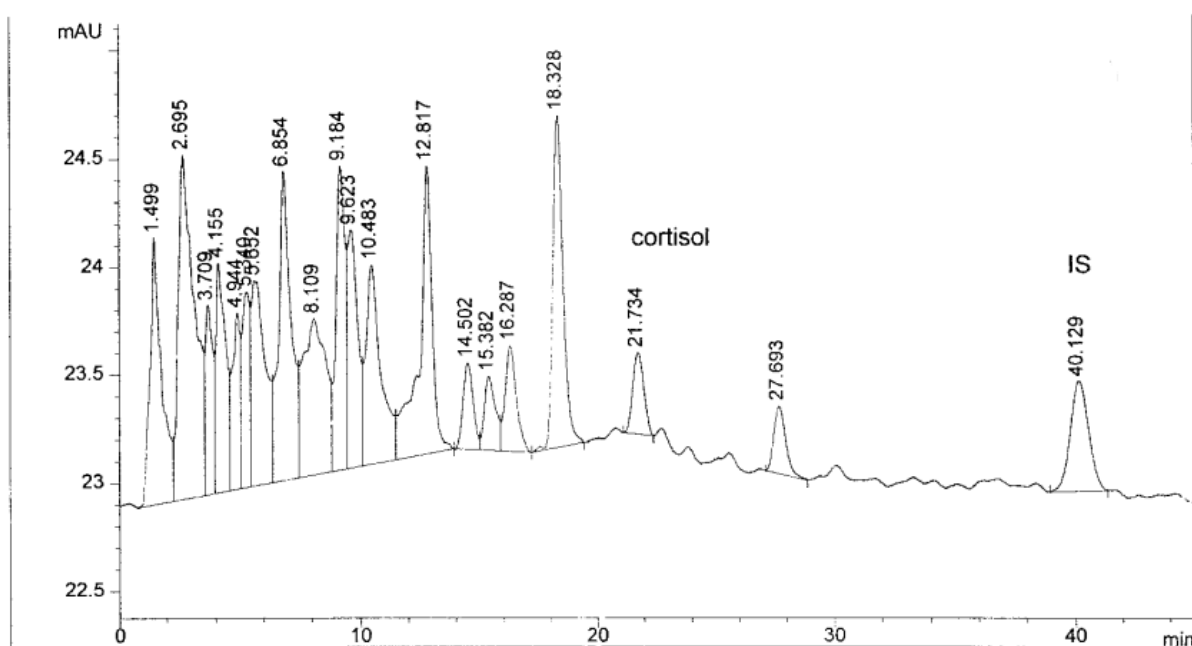


Figura 11 – Separazione cromatografica del cortisolo mediante HPLC³⁹

Essendo una tecnica più semplice rispetto alla GC sono utilizzati anche sistemi automatizzati basati sulla cromatografia LC-MS per l'analisi di cortisolo nella saliva⁴².

Spettrometria di massa tandem con cromatografia in fase liquida (LC-MS/MS)

La tecnica più moderna, e al momento la più precisa e specifica per il cortisolo, è la separazione cromatografica in fase liquida, analoga alla precedente, ma con spettrometria tandem in cui lo

ione precursore, prodotto in un primo stadio come la MS tradizionale, viene frammentato in modo specifico per collisione con un gas inerte e, infine, vengono analizzati i prodotti di frammentazione secondari in un altro stadio. Questa metodica consente di ottenere una specificità molto elevata in grado di distinguere il cortisolo anche da altri ormoni steroidei simili. Infine, si sceglie una transizione specifica che viene monitorata e l'intensità risulta proporzionale alla concentrazione di cortisolo che si determina mediante la costruzione di una curva di calibrazione con standard a concentrazione nota e uno standard interno isotopico. Una precisione comparabile per piccole molecole si ottiene anche utilizzando uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (LC-HRMS) in grado di registrare la massa con estrema precisione per distinguere la molecola da altre con massa molto simile⁴³. In Figura 12 è riportato l'esempio di una frammentazione specifica a m/z 121 dello stesso spettro riportato in Figura 10 utilizzando la spettrometria di massa tandem³⁸.

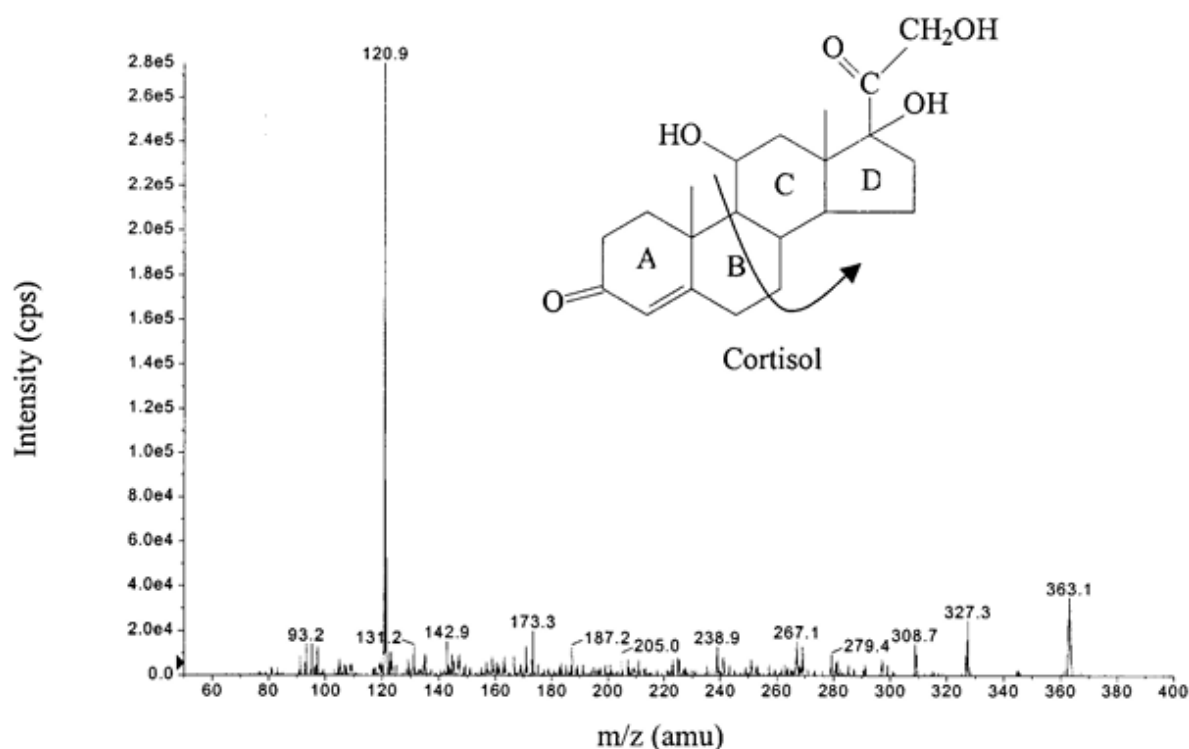


Figura 12 - Frammentazione specifica mediante spettrometria di massa tandem³⁸

1.2 – I biosensori

Negli anni successivi si sono sviluppati metodi alternativi alle analisi classiche sopra citate che sono limitate da tempi di analisi e di risposta lunghi, con necessità di portare il campione in laboratorio, e l'utilizzo di strumenti costosi e complessi da utilizzare. Uno in particolare è l'utilizzo di biosensori, definiti dall'Unione Internazionale di Chimica Pura e Applicata

(IUPAC) come dispositivi in grado di fornire informazioni analitiche specifiche, quantitative o semi-quantitative, utilizzando un elemento biologico (riconoscimento biochimico) a diretto contatto con un trasduttore fisico-chimico. L'elemento biologico spesso utilizzato è un aptamero, cioè un frammento specifico di DNA, o una proteina, come un enzima o un anticorpo.

Un biosensore elettrochimico, quindi, è un dispositivo che combina un riconoscimento di tipo biologico, con un trasduttore fisico (l'elettrodo) per ottenere un segnale misurabile utilizzando tecniche elettrochimiche. I vantaggi principali dei biosensori, rispetto alle tecniche di analisi classiche, è che mantengono una sensibilità molto elevata e un limite di rilevabilità molto basso ma sono molto più semplici da utilizzare, di fabbricazione economica, e forniscono una risposta rapida. Sono, inoltre, miniaturizzabili, il che li rende perfetti per essere incorporati in dispositivi compatti e portatili, utili per misurazioni in continuo e analisi point-of-care (POC), cioè effettuate direttamente nel luogo in cui si trova il paziente²².

Questi biosensori sono nominati in modo differente in base alla biomolecola utilizzata per il riconoscimento. In particolare, un biosensore che utilizza un anticorpo, o un suo frammento, come sito di riconoscimento è definito immunosensore; questa tipologia viene utilizzata molto per piccole molecole che non hanno siti enzimatici e sono, quindi, inutilizzabili per biosensori a base di enzimi. Le diverse tipologie di biosensore sono illustrate in Figura 13.

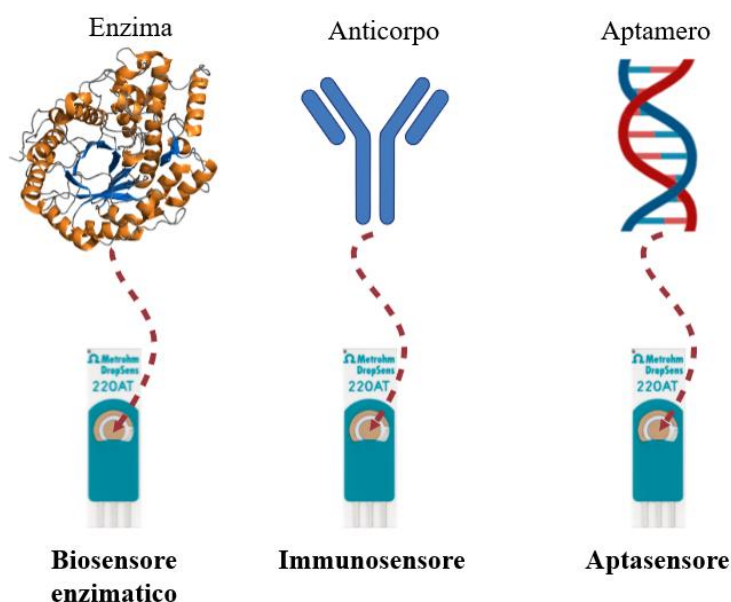


Figura 13 - Schema di un biosensore

1.2.1 – La nascita dei biosensori

La nascita del primo biosensore risale al 1962 quando Leland Clark ne progettò uno per la misura della concentrazione di glucosio nel sangue. Questo utilizzava un elettrodo di platino polarizzato negativamente come catodo per la riduzione dell'ossigeno, con un riferimento ad Ag/AgCl, isolati mediante una membrana di teflon permeabile all'ossigeno e in cui è stato immobilizzato l'enzima glucosio ossidasi (GOx), come schematizzato in Figura 14⁴⁴.

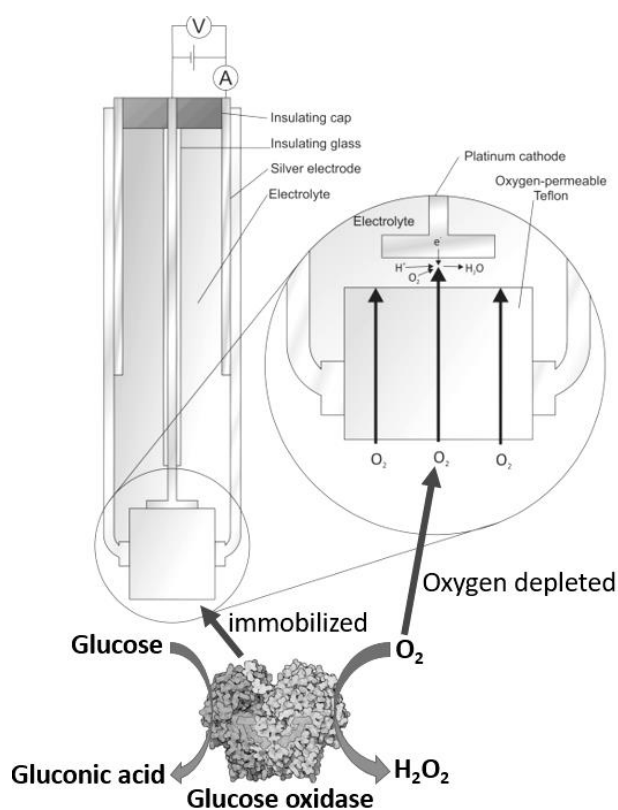


Figura 14 – Schema di funzionamento del biosensore di Clark⁴⁴

Questo enzima riesce ad ossidare il glucosio utilizzando l'ossigeno che permea la membrana e l'elettrodo misura la variazione della concentrazione di ossigeno disciolto. Mediante amperometria, quindi, era possibile risalire alla concentrazione di glucosio in quanto più ossigeno veniva consumato (proporzionale al glucosio), più la corrente che passava all'elettrodo si abbassava in quanto meno ossigeno raggiungeva il catodo per la riduzione.

Questo biosensore rappresenta un'importante evoluzione nell'analisi del glucosio che precedentemente poteva essere fatta solo in laboratorio con tecniche più complesse e tempi più lunghi, fino allo sviluppo e produzione del sensore per il glucosio attualmente in commercio. Dal 1975, dopo la scoperta degli anticorpi monoclonali, si sono studiati biosensori che utilizzassero queste biomolecole e, nel 1993, è stato fabbricato il primo biosensore per il

cortisolo⁸. La grande varietà di anticorpi ed enzimi disponibili oggi ha reso possibile lo sviluppo di biosensori per molti altri analiti differenti, soprattutto d'interesse biologico, ad esempio estradiolo⁴⁵, ormone tiroideo fT3⁴⁶, immunoglobuline A⁴⁷ e M⁴⁸, Proteina C Reattiva (CRP)⁴⁹ e citochine IL-6⁵⁰ e IL-10⁵¹.

1.2.2 – Tipi di substrati

Dalla nascita del primo biosensore sono stati fatti notevoli progressi sul tipo di substrato elettrodico utilizzato, e la ricerca si è concentrata sulla miniaturizzazione dei dispositivi, rendendo possibili le analisi in continuo e point-of-care. Partendo da elettrodi massicci come quelli bulk, quindi, si sono sviluppati elettrodi screen-printed e ink-jet printed fino ad arrivare a quelli più moderni come, ad esempio, quelli stampati in 3D o su carta. Le varie tipologie sono descritte in seguito.

Elettrodi bulk

Gli elettrodi impiegati maggiormente sono quelli bulk, formati totalmente da materiale conduttivo, che può essere ad esempio oro, glassy carbon o platino, e che si trovano lavorati in diverse geometrie, soprattutto come dischi, cilindri o fili. Solitamente si trovano supportati su un materiale inerte ed isolante, ad esempio teflon, che permette un utilizzo più agevole e delimita l'area elettrochimica che viene immersa in soluzione alla sola circonferenza effettivamente a contatto con questa. Uno dei vantaggi di questi elettrodi è, infatti, quello di avere una superficie ben definita ed essere molto stabili chimicamente ed elettrochimicamente. Inoltre, un'altra caratteristica fondamentale è la possibilità di poterli rigenerare, ad esempio con la lucidatura, per essere riutilizzati. Presentano, tuttavia, alcuni svantaggi: sono difficilmente miniaturizzabili, costosi, difficili da produrre velocemente e da personalizzare dal punto di vista geometrico. In Figura 15 sono riportati un esempio di elettrodo bulk di glassy carbon e d'oro.



Figura 15 – Esempi di elettrodi bulk: GC (sinistra) e Au (destra)

Elettrodi screen-printed (SPE)

Gli elettrodi screen-printed sono molto utilizzati come substrato per biosensori e sono realizzati mediante serigrafia di inchiostro conduttivo su un supporto, spesso di vetro, plastica o carta trattata. Viene, dunque, utilizzata una maschera della forma desiderata e viene depositato l'inchiostro conduttivo, che nel caso di elettrodi d'oro è formato normalmente da nanoparticelle d'oro, o comunque polveri molto fini, disperse in un legante che garantisce l'aderenza al substrato mediante essiccazione o reticolazione (ad esempio resine)⁵². È, poi, presente un solvente per raggiungere la viscosità desiderata e adatta alla deposizione ed eventuali additivi.

In Figura 16A è presentato uno schema di fabbricazione di elettrodi screen-printed⁵³ mentre in Figura 16B sono indicate le tre tipologie di elettrodo (WE, RE e CE) con le relative connessioni in un SPE commerciale. In Figura 16C viene rappresentato in maniera più dettagliata il processo di deposizione degli inchiostri d'oro (WE) e d'argento (RE) attraverso la maschera⁵².

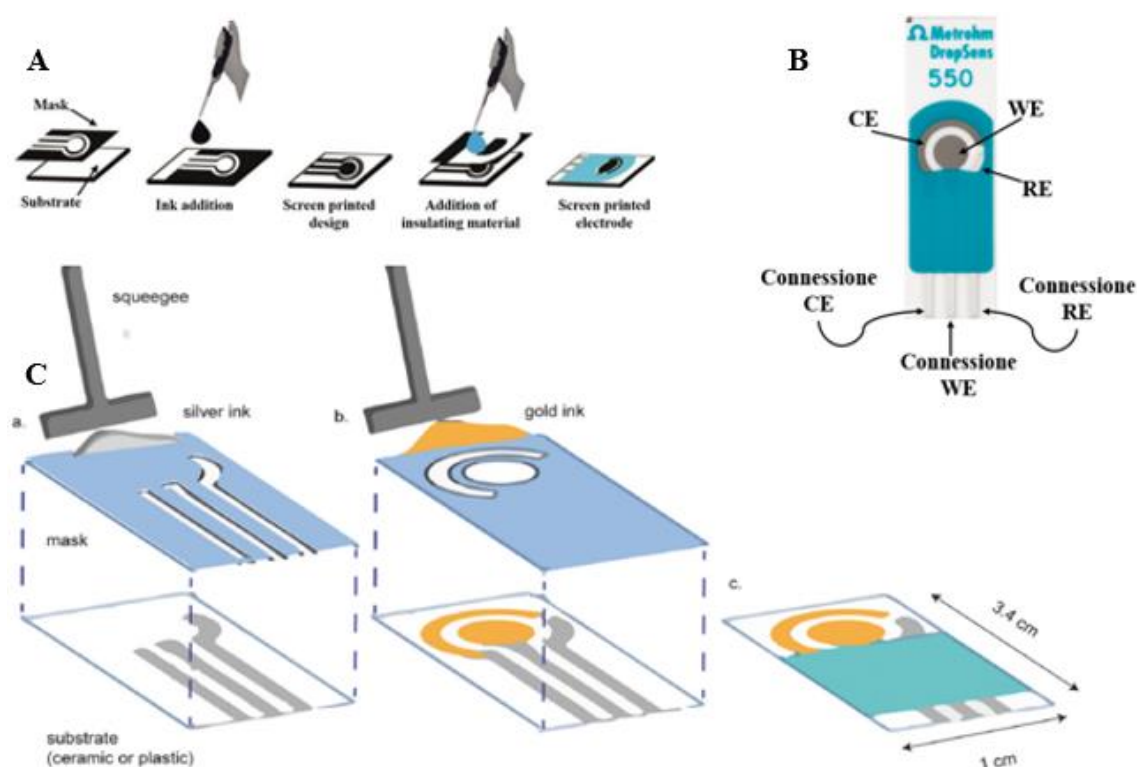


Figura 16 – SPE: A – metodo di fabbricazione. B – rappresentazione dei tre elettrodi e connessioni. C – deposizione dell'inchiostro⁵²

Come si può osservare spesso viene aggiunto un isolante (in azzurro in Figura 16) che copre le piste conduttive e delimita la superficie elettrodica attiva. Come evidenziato dalla Figura 16, gli SPE disponibili in commercio sono celle elettrochimiche complete di tutti e tre gli elettrodi: come RE, viene spesso stampato inchiostro di argento, il quale può fungere da elettrodo di

pseudo-riferimento o essere utilizzato per formare un riferimento ad Ag/AgCl; come CE si utilizza spesso inchiostro a base di carbonio, per il suo basso costo, o platino.

Il principale vantaggio di questa tipologia di elettrodi è il loro basso costo dovuto ad una possibilità di produzione in larga scala, inoltre sono facilmente miniaturizzabili e riproducibili grazie alla tecnica serigrafica, che consente di ottenere elettrodi identici tra loro, quindi con stessa area geometrica ed elettrochimica⁵². I maggiori svantaggi sono, invece, la non riutilizzabilità, una superficie più rugosa rispetto ai bulk (dovuta alla stampa con serigrafia) che rende l'elettrodo meno omogeneo e può portare a segnali più rumorosi e meno stabili, e la possibilità che l'inchiostro contenga impurezze che interferiscono con le prestazioni del sensore⁵².

Una particolare geometria degli elettrodi, che possono essere anche SPE, sono gli elettrodi interdigitati (IDE), cioè, elettrodi in cui il WE è formato da “dita” affiancate ad una piccola distanza, solitamente di 5-10 μm , come schematizzato in Figura 17⁵⁴. Ciò consente di ottenere una superficie attiva molto più elevata aumentando, così, l'intensità del segnale. Questi presentano, inoltre, diversi vantaggi quali una risposta veloce, basso costo, tecnicamente semplici da fabbricare, quindi, anche in massa⁷.

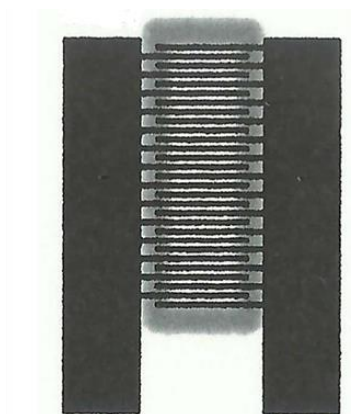


Figura 17 – schema di un IDE⁵⁴

Elettrodi ink-jet printed

Questi elettrodi sono prodotti mediante stampa getto d'inchiostro, che comprende la deposizione di un inchiostro conduttivo direttamente sul substrato secondo la geometria desiderata. A seguito di essiccazione o curing, come per gli SPE, si ottiene il film conduttivo legato al substrato⁵⁵. Ciò consente di ottenere anche forme più complesse e con una risoluzione più elevata, adatta all'ottenimento di IDE e microelettrodi con ridotto spreco di materiale

rispetto agli SPE⁵². La criticità principale è il costo maggiore dovuto sia ad una produzione più lenta degli elettrodi sia al costo maggiore della stampante ink-jet e dell'inchiostro rispetto alla serigrafia. Per questo tipo di stampa, infatti, servono inchiostri con particelle particolarmente fini e uniformi per non bloccare gli ugelli della stampante, oltre che a tensioattivi per evitarne l'aggregazione.

La stampante ink-jet può lavorare prevalentemente in due modalità: continua o drop-on-demand (DOD). Nella prima l'ugello (nozzle) espelle un flusso costante di gocce che passano vicino ad un elettrodo in cui vengono caricate elettricamente per poi essere deviate nel punto di interesse del substrato grazie al passaggio in un campo elettrico in base alla carica ricevuta. Le gocce in eccesso non vengono caricate in modo tale da non essere deviate e cadere in un recuperatore per poterle riutilizzare⁵⁵. Nella modalità DOD, invece, l'inchiostro viene espulso solo quando necessario utilizzando elementi associati all'ugello che possono essere piezoelettrici, che mediante impulso elettrico espandono o contraggono il piezo per espellere una goccia alla volta, o termici che scaldano l'inchiostro per produrre una bolla di vapore che spinge fuori una goccia di inchiostro dall'ugello. Quest'ultimo si può utilizzare solo per inchiostri non sensibili al calore. In questo modo viene utilizzato meno inchiostro, e utilizzando apparecchiature meno sofisticate risulta una tecnica più economica⁵⁵. In Figura 18 sono riportati gli schemi della stampa ink-jet in modalità continua e DOD.⁵⁵

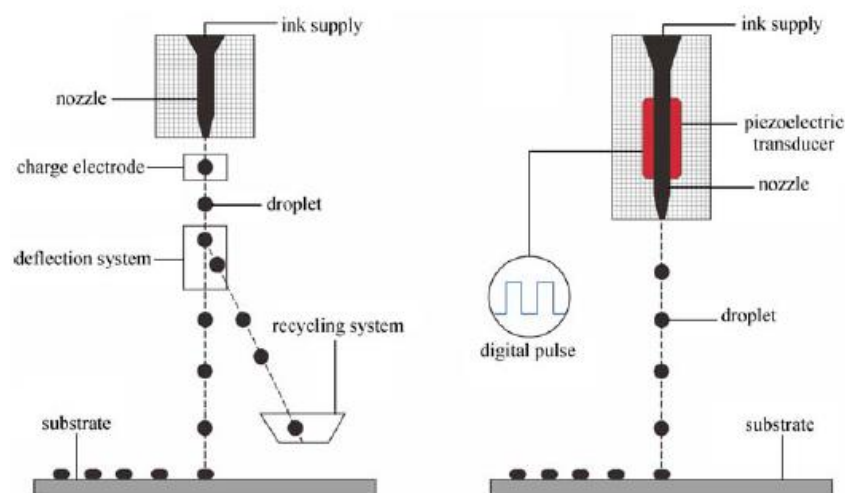


Figura 18 – Schema di stampa ink-jet in modalita continua (a sinistra) e DOD (a destra)⁵⁵

Microelettrodi

Un'altra tipologia di elettrodi molto impiegati, e principalmente a base di oro o carbonio, sono i microelettrodi, cioè, elettrodi con dimensioni nell'ordine dei micrometri e che solitamente si

trovano come IDE. In Figura 19 è riportata la foto di un microelettrodo d'oro interdigitato acquisita mediante microscopio digitale.

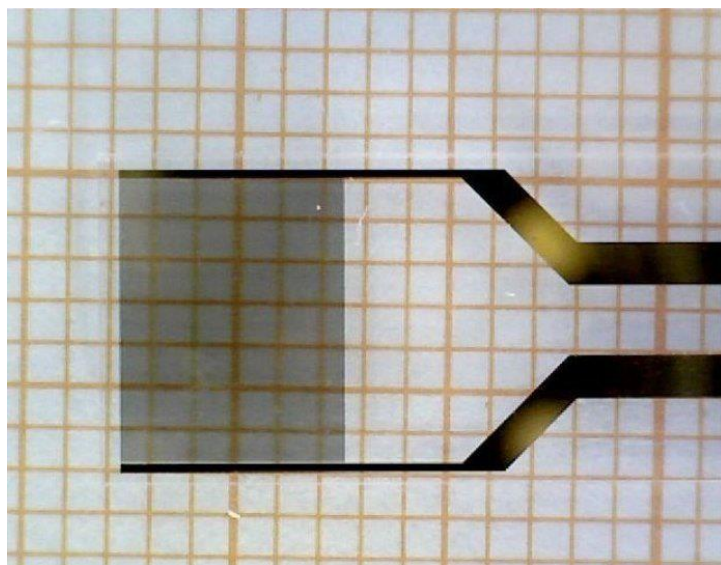


Figura 19 – Foto al microscopio ottico di un microelettrodo interdigitato

Questi elettrodi hanno un'area attiva estremamente piccola rispetto agli altri: ciò comporta correnti più basse, e quindi la necessità di strumenti più sensibili, ma consente di misurare anche concentrazioni molto basse di analita. Risultano utili, inoltre, nel caso di piccoli volumi di campione o per microchip o dispositivi multiplex in cui vengono messi più elettrodi insieme per misurare contemporaneamente diversi analiti.

A prescindere dal tipo di substrato utilizzato (SPE, bulk...), molte volte questo viene modificato con nanomateriali che consentono di aumentare l'area attiva, migliorare la conducibilità riducendo la resistenza al trasferimento di carica, e possono anche facilitare l'immobilizzazione di biomolecole come anticorpi. I più utilizzati sono le nanoparticelle d'oro, o meno di frequente di altri metalli, nanotubi di carbonio, grafene o polimeri conduttivi.

1.2.3 – Metodi di funzionalizzazione di immunosensori per la determinazione di cortisolo

Per quanto riguarda i metodi di funzionalizzazione, per gli immuno-biosensori questi si basano sull'attacco dell'anticorpo all'elettrodo. Per fare ciò si utilizzano dei cross-linker, cioè molecole che fungono da "ponte" con una doppia funzionalità: una per legarsi all'elettrodo e l'altra per legarsi all'anticorpo. Questo serve, infatti, per creare un legame covalente e, quindi, una funzionalizzazione più robusta e resistente con l'anticorpo. Utilizzando, ad esempio, un elettrodo d'oro non è possibile legare covalentemente in modo diretto un anticorpo in quanto,

essendo una proteina, questo contiene COOH e NH come gruppi liberi, che non sono affini alla superficie d'oro, se non con interazioni deboli. La superficie d'oro viene attaccata facilmente da gruppi tiolici che formano legami covalenti stabili. Per questo motivo viene utilizzato sempre un cross-linker contenente atomi di zolfo per la creazione di un monostrato autoassemblato (Self-Assembled Monolayer SAM)⁷, cioè uno strato ordinato e compatto di molecole legate spontaneamente alla superficie con legami forti (Au-S) in modo orientato. L'estremità opposta del cross-linker rimane, invece, libera per il successivo attacco dell'anticorpo.

Per substrati d'oro i cross-linker maggiormente utilizzati sono la DTSP o i mercaptoacidi, cioè, composti organici contenenti SH e COOH alle due estremità e una catena alifatica centrale. Le strutture di queste molecole sono riportate in Figura 20A e B.

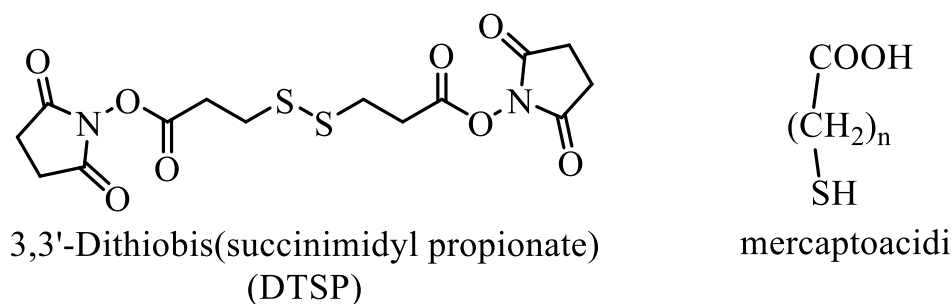


Figura 20 - Strutture della DTSP e dei mercaptoacidi

Utilizzando la DTSP come cross-linker è necessario rompere il legame S-S per cui si utilizza una riduzione con sodioboroidruro (NaBH_4)⁷, mentre il gruppo succinimidil estere (NHS estere, cioè l'anello a 5 termini) è già pronto per reagire con i gruppi amminici primari (NH_2) liberi dell'anticorpo. Viceversa, i mercaptoacidi contengono il gruppo tiolico libero e possono legarsi direttamente alla superficie d'oro ma il gruppo carbossilico deve essere, poi, attivato mediante trasformazione in NHS estere in quanto altrimenti sarebbe poco reattivo. Il metodo più comune per questa reazione è quello di utilizzare 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC) che attiva il gruppo COOH in un intermedio, e N-idrossisuccinimide (NHS) che lo trasforma in un NHS estere⁵⁶. Le strutture sono riportate in Figura 21.

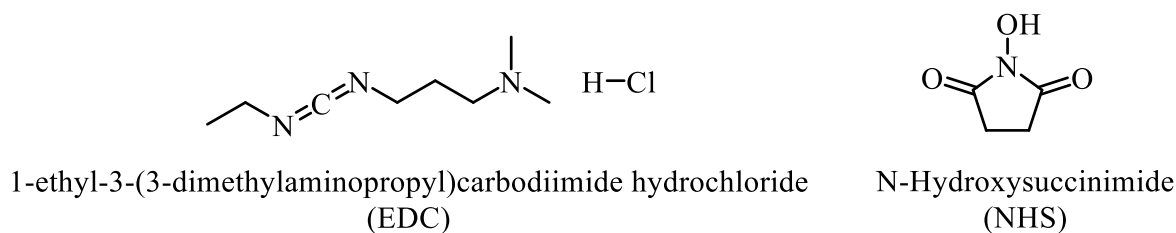


Figura 21 - Strutture di EDC e NHS

Una volta legato l'anticorpo al cross-linker, i siti attivi di quest'ultimo che sono rimasti liberi vengono saturati utilizzando una molecola di blocco, ad esempio l'albumina da siero bovino (BSA) che è una proteina grande, stabile e poco costosa. In questo modo si evitano falsi segnali dovuti ad attacchi di altre proteine o molecole ai siti liberi del cross-linker che comporterebbero una sovrastima della concentrazione. Questo è, quindi, un passaggio fondamentale per l'utilizzo di un sensore in un campione di fluido biologico che è una miscela complessa di proteine ed altre molecole. Si può, infine, procedere all'incubazione in antigene per il riconoscimento da parte dell'anticorpo e determinare la concentrazione mediante una delle tecniche elettrochimiche riportate in seguito.

1.2.4 – Tecniche elettrochimiche

Per il rilevamento del cortisolo vengono utilizzate principalmente due tecniche elettrochimiche: la spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS) e la voltammetria ciclica (CV), soprattutto nelle sue varianti più sensibili: la voltammetria a impulsi differenziali (DPV) e la voltammetria ad onda quadra (SWV). Queste tecniche saranno descritte successivamente.

Essendo il cortisolo una molecola elettrochimicamente inerte, viene quasi sempre utilizzata una sonda redox (probe redox) che consente di osservare variazioni di corrente quando la superficie dell'elettrodo subisce una modifica. La sonda redox maggiormente utilizzata è la miscela di $[K_3(FeCN_6)]$ e $[K_4(FeCN_6)]$ che, mediante i processi reversibili di ossidazione e riduzione, genera una corrente direttamente proporzionale al grado di accessibilità della superficie elettrodica. Infatti, in condizioni di elettrodo non modificato gli ioni Fe^{2+}/Fe^{3+} diffondono liberamente fino alla superficie dell'elettrodo dove subiscono la reazione redox producendo una corrente faradica. La presenza di molecole organiche isolanti ed elettrochimicamente inerti sulla superficie dell'elettrodo, invece, ostacola il trasferimento elettronico riducendo l'interazione tra la sonda redox e l'elettrodo determinando una diminuzione della corrente rilevata.

Voltammetria ciclica (CV), a impulsi differenziali (DPV) e ad onda quadra (SWV)

La voltammetria ciclica è una tecnica che misura la corrente generata in una soluzione non agitata quando viene applicato all'elettrodo un potenziale a forma d'onda triangolare come quello mostrato in Figura 22⁵⁷.

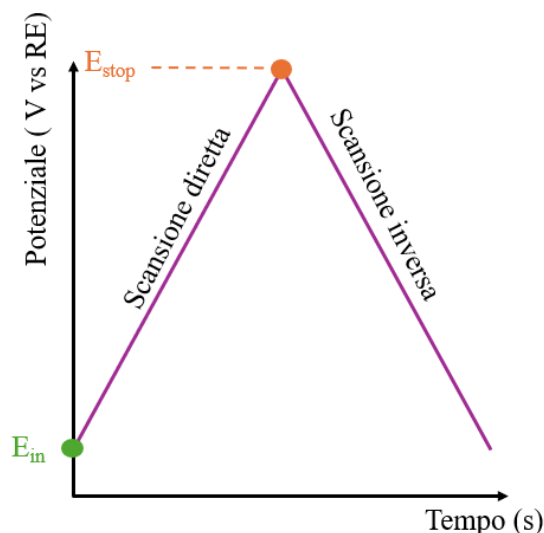


Figura 22 - Schema di impulso di una CV

Il potenziale varia in modo lineare, ad una determinata velocità di scansione, tra un valore d'inizio e uno di fine dopo di che la direzione di scansione viene invertita ed il potenziale torna al suo valore d'origine. Generalmente il ciclo viene ripetuto più volte ottenendo un voltammogramma che riporta la corrente misurata in funzione del potenziale applicato. I potenziali ai quali avviene l'inversione sono detti potenziali di inversione⁵⁷. Tuttavia, questa tecnica non è molto sensibile, perciò, si preferiscono le sue varianti, cioè la voltammetria a impulsi differenziali (DPV) e quella ad onda quadra (SWV) che consentono di aumentarne la sensibilità.

La DPV sfrutta una forma d'onda di potenziale che prevede una successione di impulsi sovrapposti ad una rampa di potenziale⁵⁸. Si misura, quindi, la differenza di corrente tra il valore registrato dopo l'impulso e quello registrato prima dell'impulso (al potenziale base). In Figura 23A è riportato uno schema dell'impulso e il limite di rilevabilità (DL) mentre in Figura 23B un confronto del voltammogramma rispetto alla CV classica⁵⁹.

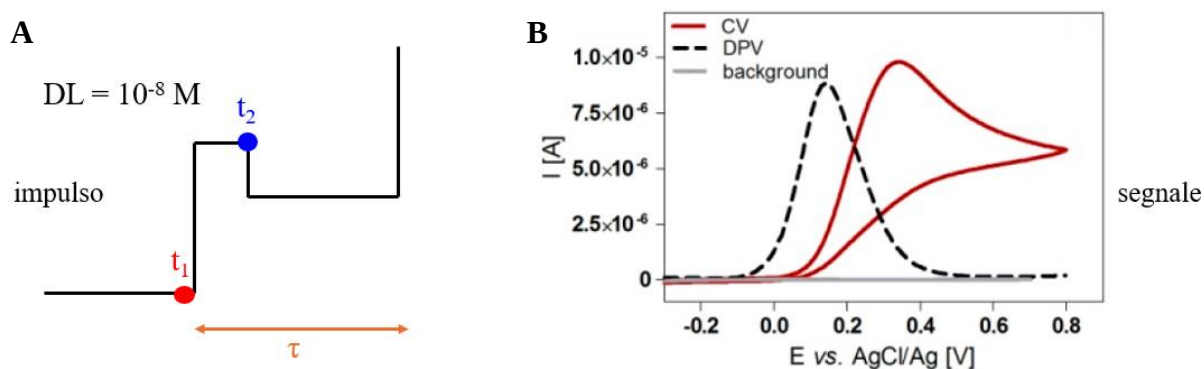


Figura 23. A – Schema di impulso e segnale di una DPV. B – Confronto con la CV⁵⁹

La SWV, invece, si basa su impulsi ad onda quadra sovrapposti ad una rampa di potenziale a gradini. La corrente è campionata due volte per ciclo, alla fine di ogni impulso. La differenza tra la corrente campionata all'andata (forward, ottenuta aumentando il potenziale) e quella campionata al ritorno (backward, diminuendo il potenziale) è il segnale analitico⁵⁸. In questo modo viene misurata solo la corrente effettivamente dovuta alla reazione redox della sonda redox riducendo notevolmente il rumore di fondo e aumentando la sensibilità, anche rispetto alla DPV. In Figura 24A è mostrato lo schema dell'impulso in una SWV e in Figura 24B il confronto con una CV⁶⁰.

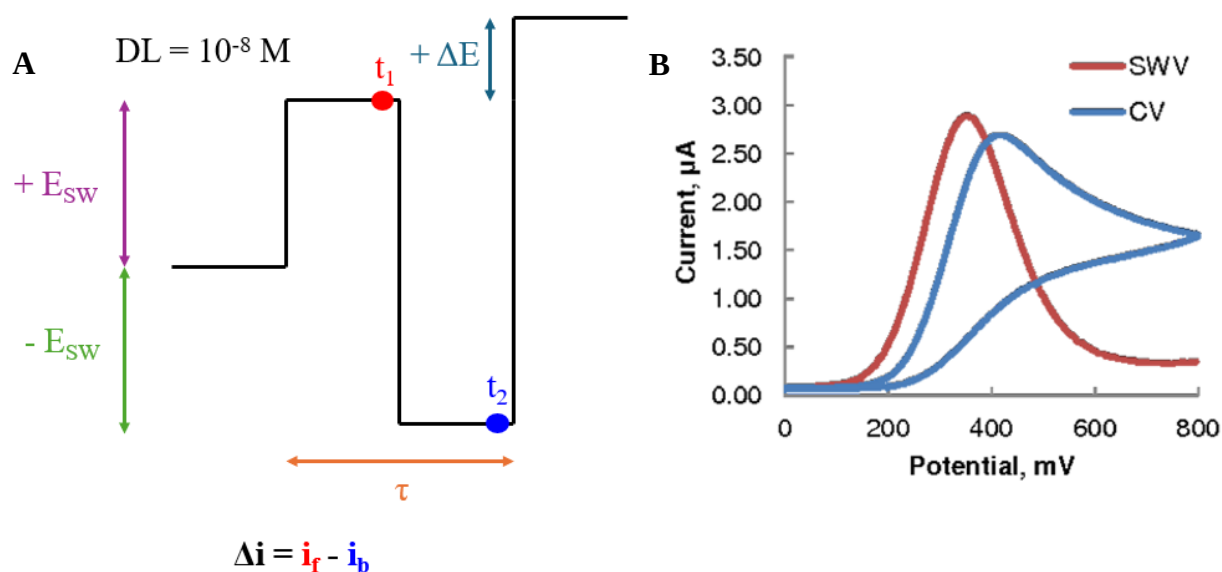


Figura 24. A - Schema di impulsi di una SWV. B - Confronto con una CV⁶⁰

Spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS)

La spettroscopia d'impedenza (EIS) è una tecnica elettrochimica basata su piccole variazioni sinusoidali (5-10 mV) del potenziale attorno ad un valore (potenziale di lavoro) in cui un sistema elettrochimico è in equilibrio (solitamente attorno al potenziale di circuito aperto OCP) su un ampio intervallo di frequenze decrescenti, comunemente da MHz a mHz⁶¹. Viene

determinata la corrente risultante che ha lo stesso andamento sinusoidale del potenziale ma con un ritardo di fase ϕ . È una tecnica estremamente utile per lo studio dei processi elettrochimici all'interfaccia elettrodo/soluzione e fornisce informazioni sulle proprietà elettriche (resistive e capacitive)⁷ di un sistema, tra cui la resistenza della soluzione (R_{sol}), la resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}), la capacità del doppio strato elettrico e la diffusione di Warburg.

In particolare, ϕ varia tra 0° (cioè potenziale e corrente in fase), quando la risposta è puramente resistiva, e -90° quando puramente capacitiva, cioè si comporta come un condensatore ideale⁶¹. Infatti, nel primo caso vale la legge di Ohm (Eq. 1):

$$V = R \times I \quad \text{Equazione 1}$$

per cui V ed R sono proporzionali e, quindi, avranno la stessa forma sinusoidale. Per un condensatore invece vale l'Equazione 2:

$$I = C \times \frac{dV}{dt} \quad \text{Equazione 2}$$

dove C è la capacità del condensatore espressa in Farad (F). La corrente è, dunque, proporzionale alla velocità con cui cambia il potenziale. Variando il potenziale in modo l'equazione è data da (⁶¹):

$$V(t) = V_0 \sin(\omega t) \quad \text{Equazione 3}$$

per cui sostituendola all'equazione precedente

$$I(t) = C * \frac{d}{dt} [V_0 \sin(\omega t)] \quad \text{Equazione 4}$$

che risulta derivando rispetto al tempo:

$$I(t) = C * V_0 \omega \cos(\omega t) \quad \text{Equazione 5}$$

Utilizzando l'identità trigonometrica (Eq. 6):

$$\cos(\theta) = \sin(\theta + \frac{\pi}{2}) \quad \text{Equazione 6}$$

si ottiene

$$I(t) = C * V_0 \omega \sin(\omega t + \frac{\pi}{2}) \quad \text{Equazione 7}$$

Si ottiene che la corrente I risulta, quindi, anticipata di 90° ($\pi/2$), cioè un quarto di periodo, rispetto alla tensione V in quanto la derivata comporta un passaggio dalla funzione seno a quella coseno, tra loro sfasate di 90° .

L'impedenza (Z) viene definita come il rapporto tra la tensione applicata e la corrente misurata, cioè come una resistenza applicabile non solo ai resistori puri:

$$Z = \frac{V}{I} \quad \text{Equazione 8}$$

Z è costante durante una singola onda sinusoidale a frequenza fissa ma varia con la frequenza. Dato che lo sfasamento può essere descritto matematicamente usando numeri complessi, per tenerne conto si può scrivere l'impedenza con la notazione complessa:

$$Z(\omega) = \frac{E_0 e^{j\theta}}{I_0 e^{j\phi}} \quad \text{Equazione 9}$$

con $j = \sqrt{-1}$ e θ la fase iniziale della tensione.

Ciò consente di rappresentare sia l'ampiezza (Z), sia lo sfasamento (ϕ) nello stesso numero complesso. Applicando la formula di Eulero: $e^{j\theta} = \cos \theta + j \sin \theta$ e semplificando i segni si ottiene⁶¹:

$$Z(\omega) = \frac{V_0}{I_0} (\cos \phi - j \sin \phi) \quad \text{Equazione 10}$$

Si può, infine, scrivere Z come la somma della parte reale e quella immaginaria:

$$Z = Z' + jZ'' \quad \text{Equazione 11}$$

in cui $Z' = \frac{V_0}{I_0} \cos \phi$ è la parte reale che rappresenta la resistenza (R) e $Z'' = \frac{V_0}{I_0} \sin \phi$ è la parte immaginaria, definita reattanza (X), che dipende dalla frequenza e introduce lo sfasamento ϕ , definibile come:

$$\phi = \arctan\left(\frac{X}{R}\right) \quad \text{Equazione 12}$$

L'impedenza, quindi, varia principalmente per la reattanza che dipende dalla frequenza e dal tipo di componente nel circuito. La resistenza reale R può anche rimanere costante, comunque Z varierà perché la corrente si sfasa rispetto alla tensione provocando una variazione di X .

Graficando Z'' vs Z' (y vs x) si ottiene quella che viene definita curva di Nyquist (Nyquist plot) in cui spesso viene indicato $-Z''$ per convenzione dato che la corrente anticipa la tensione. Ogni punto della curva indica la componente reale e quella immaginaria dell'impedenza, in particolare dalla maggiore alla minore frequenza di variazione del potenziale. La forma della curva dipende dal tipo di sistema elettrochimico utilizzato, che può essere simulato mediante un circuito equivalente. Uno dei più comuni è basato su una resistenza e una capacità in

parallelo tra loro in quanto la corrente può passare attraverso la reazione elettrochimica (faradica) o caricare e scaricare il doppio strato elettrico all'interfaccia (non faradica). Il circuito classico utilizzato è quello di Randles così formato⁶²:

$$R_S + [(R_{ct} || C_{dl})]$$

in cui:

- R_S è la resistenza della soluzione
- R_{ct} è la resistenza al trasferimento di carica dovuta alla reazione redox, cioè dovuta alla corrente faradica. Più il trasferimento di elettroni è difficile, più questa aumenta e la reazione è lenta.
- C_{dl} è la capacità del doppio strato che si crea ogni volta che viene applicato un potenziale all'elettrodo, quindi dovuta alla corrente non faradica

Il circuito si può rappresentare come in Figura 25:

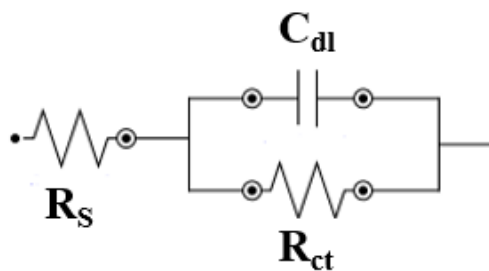


Figura 25 - Circuito equivalente di Randles

In Figura 26 è riportato un esempio di Nyquist plot ottenuto mediante analisi EIS di un circuito equivalente come questo⁶²:

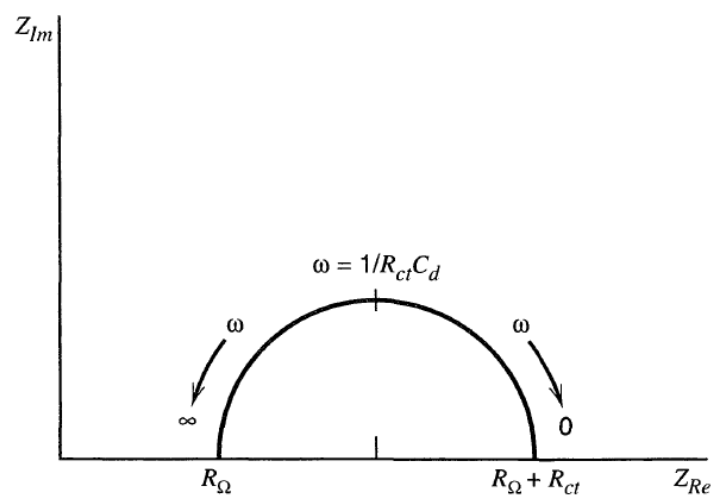


Figura 26 - Esempio di Nyquist plot⁶²

L'intercetta sull'asse x , che non è 0, è il valore di R_s che è una resistenza reale, il semicerchio è dovuto all'effetto combinato di R_{ct} e C_{dl} : nello specifico, la larghezza di questo esprime R_{ct} e l'altezza C_{dl} ⁶¹.

Questa tecnica viene ampiamente utilizzata per valutare le prestazioni di un biosensore: oltre ad essere molto sensibile, infatti, fornisce una grande quantità di informazioni sui vari processi elettrici, elettrochimici e fisici che avvengono nel sistema con tempi diversi tra loro. Esempi di dati ricavabili sono la resistenza di un elettrolita liquido, la carica/scarica del doppio strato elettrico all'interfaccia elettrodo/soluzione, la cinetica di una reazione di trasferimento di carica all'elettrodo, fenomeni di adsorbimento/desorbimento accoppiati al trasferimento di carica e fenomeni di diffusione⁶¹. Inoltre, è una tecnica non distruttiva e la finestra di potenziale utilizzata è piccola e limitata vicino al valore del potenziale di lavoro garantendo un minore rischio di danneggiare la funzionalizzazione rispetto alle tecniche voltammetriche.

2 – SCOPO DELL'ELABORATO

Lo scopo della tesi consiste nella funzionalizzazione di elettrodi d'oro modificati per l'utilizzo come biosensori immuno-elettrochimici per la determinazione di cortisolo in fluidi biologici, in particolare nella saliva. Questi elettrodi sono stati preparati mediante attacco di un cross-linker sulla superficie in grado di legare poi l'anticorpo anti-cortisolo per il riconoscimento selettivo del cortisolo.

È stata, quindi, svolta un'analisi accurata di ogni singolo step di funzionalizzazione, sia mediante tecniche elettrochimiche come spettroscopia d'impedenza e voltammetria ciclica, sia mediante analisi con microscopio a fluorescenza. In tal modo, è stato possibile eseguire alcune ottimizzazioni, come tipologia di elettrodo e di cross-linker, concentrazione di anticorpo, tempo e temperatura di incubazione e concentrazione di albumina di siero bovino per saturazione del cross-linker.

Infine, è stata dimostrata la possibilità di realizzare biosensori per la determinazione del cortisolo nella concentrazione di interesse per l'analisi della saliva umana.

3 - PARTE SPERIMENTALE

3.1 – Reagenti utilizzati

- KH_2PO_4 > 99% (potassio diidrogenofosfato), Sigma Aldrich
- $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ > 99% (ferricianuro di potassio), Riedel-de Haën
- $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 98,5 – 100% (ferrocianuro di potassio), Sigma Aldrich
- H_2SO_4 95,0 – 98,0% (acido solforico), Sigma Aldrich
- H_2O_2 30% w/w (perossido di idrogeno), Sigma Aldrich
- $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ > 98,0% (cortisolo), Tokyo Chemical Industry
- BSA (albumina sierica bovina), Sigma Aldrich
- Ferrocene metanolo 97%, Acros Organics
- DTSP (3,3'-Ditio-bis(solfosuccinimidilpropionato)), Tokyo Chemical Industry
- MPA > 99% (acido 3-mercaptopropionico), Fluka Analytical
- EDC (N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide), Sigma Aldrich
- sNHS > 98% (N-idrossisolfosuccinimmide), Sigma Aldrich
- NaBH_4 (sodioboroidruro) in polvere, Sigma Aldrich
- Ab1949 (anti-cortisolo da topo), Abcam
- AMab316183 (anti-cortisolo da coniglio), Abcam
- Anticorpo secondario marcato con fluoresceina
- KOH (idrossido di potassio), Emplura
- Al_2O_3 (allumina)
- Acqua distillata
- Etanolo, Supelco
- Acetone, Supelco
- DMF >99,8% (N,N-dimetilformammide), Fluka Analytical

3.2 – Strumenti utilizzati

- Potenzio stato (CH instruments CHI660F)
- Galvanostato (Metrohm AUTOLAB PGSTAT204)
- Cavi e coccodrilli
- Vetreria da laboratorio
- Falcon da 50 mL (Kartell)
- Bilancia analitica (Scaltec SPB32)

- Microbilancia (AT21 Comparator, Mettler Toledo)
- Bagno ad ultrasuoni
- pHmetro (XS instruments) con elettrodo a vetro combinato (XS sensor)
- micropipette da 10, 100 e 1000 μL (Kartell)
- agitatore magnetico e piastra riscaldante (Heidolph)
- panno rosso
- stampante 3D per stampa supporti elettrodi (Prusa)
- Source Misure Unit (Keysight B2902B)
- Microscopio digitale da banco (Rs Pro Wi-Fi digital microscope)
- Microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse)
- Carta abrasiva al carburo di silicio di granulometria 4000 (Remet)
- Fogli di nitrocellulosa
- Shaker termostato
- Pasta conduttiva d'argento (RS pro)
- Clip 3M

3.3 – Elettrodi utilizzati

- Elettrodi di lavoro in Au bulk (Amel instruments, diametro 2 mm)
- Elettrodi Au interdigitati 5 μm (micrux)
- Elettrodi Au screen-printed (Metrohm)
- Elettrodo di riferimento (RE): elettrodo a calomelano saturo SCE (Amel instruments)
- Controelettrodo (CE): filo di platino

3.4 – Funzionalizzazione degli elettrodi

Per poter essere utilizzati come biosensori immuno-elettrochimici gli elettrodi d'oro devono essere funzionalizzati, ovvero la superficie deve essere modificata con diversi passaggi sottoelencati in modo da garantire nello step finale il legame tra l'anticorpo anti-cortisolo e il cortisolo stesso. Tutti gli elettrodi bulk e IDE sono stati numerati univocamente per poter essere distinti. Viene, quindi, riportata in seguito la procedura di funzionalizzazione degli elettrodi d'oro nel dettaglio.

3.4.1 – Pulizia degli elettrodi e determinazione dell'area elettrochimica

La pulizia degli elettrodi è un passaggio fondamentale in quanto influenza in modo significativo tutti gli stadi di funzionalizzazione successivi e, dunque, il funzionamento del sensore. È,

quindi, importante che gli elettrodi siano lucidati a specchio e non presentino difetti come graffi o parti in rilievo, anche al fine di ottenere delle aree elettrochimiche confrontabili tra i diversi elettrodi, condizione fondamentale per ottenere dei risultati che siano confrontabili tra loro all'interno di uno stesso batch di funzionalizzazione. È necessario ottenere un elettrodo lucidato a specchio.

Al fine di ottenere elettrodi puliti e aree elettrochimiche confrontabili sono state fatte la pulizia meccanica, elettrochimica e chimica ed è stata determinata l'area elettrochimica. I dettagli di queste metodiche sono riportati di seguito.

Pulizia meccanica

Gli elettrodi d'oro bulk nuovi sono stati puliti meccanicamente mediante lucidatura su una sospensione di allumina in acqua dentro una piastra Petri con del panno rosso: tenendo l'elettrodo perpendicolare al piano si disegnano degli "8" sulla sospensione di allumina, come mostrato in Figura 27.



Figura 27 - Metodologia di lucidatura degli elettrodi su allumina

In seguito, gli elettrodi che hanno presentato delle imperfezioni, non risultando a specchio, sono stati puliti con lo stesso metodo su un foglio di carta abrasiva al carburo di silicio di granulometria 4000 bagnata con dell'acqua, fino a ottenere una superficie liscia.

Pulizia elettrochimica

Per tutte le misure elettrochimiche sono stati utilizzati gli elettrodi d'oro come elettrodi di lavoro (WE), un elettrodo a calomelano saturo (SCE) come elettrodo di riferimento (RE) e un filo di platino come controelettrodo (CE).

Una volta lucidati, gli elettrodi sono stati puliti mediante voltammetria ciclica (CV) utilizzando la cella a 3 elettrodi sopra citata, in acido solforico (H_2SO_4) 1 M per 5 cicli con potenziale da 0 a 1,6 V vs SCE e velocità di scansione di 0,1 V/s.

Questa tecnica consente di modificare il potenziale applicato al WE in modo ciclico, effettuando una scansione di potenziale da un valore di minimo a un valore di massimo (o viceversa) ad una certa velocità per poi tornare al valore iniziale per completare un ciclo. Ciò permette di osservare la presenza di contaminanti che si ossidano o si riducono nell'intervallo di potenziale applicato. Per un elettrodo d'oro pulito, quindi, eseguendo la scansione in acido solforico, si dovranno distinguere solamente i picchi di ossidazione e riduzione dell'oro mentre la presenza di altri picchi indicherebbe l'ossidazione o la riduzione di altre sostanze e, dunque, l'elettrodo risulterebbe sporco.

Una volta funzionalizzati gli elettrodi, tra un batch e l'altro è stato fatto lo stripping dei legami Au-S per rimuovere la DTSP legata alla superficie dell'elettrodo come primo step di pulizia. Nel dettaglio, è stata eseguita una CV da 0,2 a -1,2 V vs SCE in PBS 10 mM a pH 7,4 a 5 mV/s per 3 cicli. È stata utilizzata una velocità di scansione molto bassa in modo tale da ottenere un picco di riduzione il più definito e quantitativo possibile al primo ciclo per poterlo poi integrare e ricavare l'area sottesa che sarà proporzionale alla quantità di legami Au-S ridotti e, quindi, alla quantità di DTSP che era legata.

Determinazione dell'area elettrochimica

In seguito alla CV gli elettrodi bulk sono stati risciacquati con dell'acqua distillata ed è stata determinata l'area elettrochimica, cioè l'area effettivamente a contatto con la soluzione che risulta maggiore rispetto all'area geometrica in quanto la superficie non è esattamente liscia. Per fare ciò si è mantenuto un potenziale di 1,559 V vs SCE per 100 secondi; tale potenziale per un tempo così prolungato fa sì che l'ossigeno si adsorba nella superficie dell'elettrodo d'oro. In seguito, è stato effettuato mezzo ciclo di CV da 1,559 a 0 V (solo in riduzione) per desorbire l'ossigeno dalla superficie. Il picco di riduzione ottenuto ha un'area proporzionale all'area elettrochimica dell'elettrodo⁶³ per cui, conoscendo l'area del picco mediante integrazione (in AV), la velocità di scansione (V/s) e la carica teorica necessaria alla riduzione di un monolayer di ossido pari a $386 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, si è in grado di risalire all'area elettrochimica⁶⁴ mediante la formula:

$$Area\ elettrochimica = \frac{Area\ del\ picco}{velocità\ di\ scansione * costante\ di\ proporzionalità} \quad Equazione\ 13$$

Si può, infine, calcolare il “roughness factor”, cioè il rapporto tra l’area elettrochimica e quella geometrica. Per gli elettrodi utilizzati, con diametro di 2 mm, l’area geometrica è di 3,14 mm².

Pulizia chimica

Gli elettrodi sono stati messi a bagno per dieci minuti in soluzione piranha, cioè una soluzione formata da due parti di acido solforico concentrato e una parte di acqua ossigenata. Tale soluzione è molto aggressiva e serve ad eliminare eventuali contaminanti presenti sulla superficie dell’elettrodo lasciando intaccati sia l’oro sia il corpo di teflon che lo avvolge. Per ultimo si è svolta una CV di controllo della pulizia (solo per i primi batch), analoga a quella di pulizia elettrochimica descritta precedentemente, e un lavaggio in etanolo per almeno 30 minuti per solubilizzare eventuali contaminanti organici rimasti sulla superficie.

Pulizia elettrodi interdigitati e screen-printed

Per queste tipologie di elettrodi si è, innanzitutto, depositata della pasta d’argento conduttiva sui contatti per evitare di danneggiarli con le pinze delle clip 3M utilizzate per connetterli al potenziostato.

Per la pulizia, dato che questi elettrodi sono più delicati rispetto a quelli bulk, non è possibile utilizzare la soluzione piranha, soprattutto per quelli screen-printed che hanno l’area elettrochimica delimitata da dell’isolante che verrebbe rovinato. Questi elettrodi, quindi, sono stati puliti mediante stripping dei legami Au-S, analogamente agli elettrodi bulk, seguiti da CV per cinque cicli (o più se risultasse ancora sporco) da 0 a 1,3 V vs SCE con una velocità di scansione di 0,1 V/s collegando i due bracci nel caso degli IDE.

3.4.2 – Attacco del cross-linker

Il primo step effettivo di funzionalizzazione della superficie d’oro prevede l’attacco del cross-linker sull’elettrodo per la formazione dei Self Assembled Monolayer (SAM). In particolare, si sono utilizzati due cross-linker differenti: la DTSP e l’MPA.

Per quanto riguarda il primo cross-linker, che contiene il legame S-S, questo è stato ridotto utilizzando NaBH₄. Nello specifico si sono utilizzate due soluzioni: una di DTSP 2 mg/mL in acetone e una di NaBH₄ 10 mg/mL in acqua raffreddata con ghiaccio. Queste soluzioni sono state mescolate in rapporto relativamente 3,75:1 con un agitatore magnetico, dopo di che gli

elettrodi sono stati immersi senza agitazione nell'ambiente di reazione per due ore. Una volta completata la formazione dei SAM gli elettrodi sono stati immersi delicatamente in acetone per rimuovere eventuali residui di DTSP non reagita sulla superficie, e poi in PBS 10 mM a pH 7,40. Per la funzionalizzazione con MPA gli elettrodi sono stati lasciati overnight in una soluzione di MPA 250 mM in acqua distillata. Il giorno successivo sono stati lavati immergendoli in acqua distillata e il gruppo carbossilico dell'MPA è stato attivato mediante reazione con EDC 0,05 M e sNHS 0,03 M in PBS 10 mM a pH 7,4 per due ore e infine sono stati lavati immergendoli in PBS. In Figura 28 sono riportate le strutture chimiche del mercaptoacido e del sNHS utilizzati.

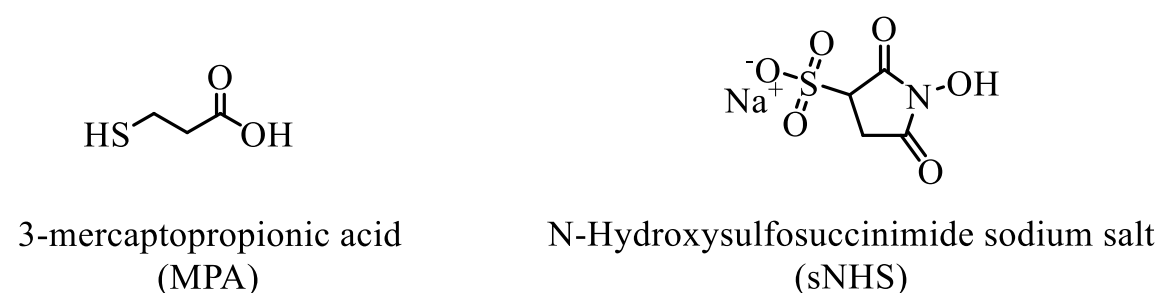


Figura 28 - Strutture di MPA e sNHS

3.4.3 – Incubazione per attacco dell'anticorpo

Dopo l'attacco del cross-linker e i lavaggi, gli elettrodi sono stati incubati in soluzioni di anticorpo a varie concentrazioni in PBS 10 mM a pH 7,40. In particolare, la soluzione di anticorpo è stata depositata mediante drop casting con micropipetta sugli elettrodi mantenuti con la superficie d'oro rivolta verso l'alto. L'incubazione è stata mantenuta a temperatura ambiente o a 37 °C per una o due ore dopo di che gli elettrodi sono stati lavati in PBS.

Si sono utilizzati due diversi anticorpi anti-cortisolo: quello ottenuto da coniglio e quello da topo. Per i batch in cui è stata mantenuta l'incubazione a 37 °C gli elettrodi con l'anticorpo drop-castato sono stati messi in piastra, regolata a questa temperatura, con un becher contenente acqua distillata vicino e il tutto chiuso da un becher più grande per mantenere l'ambiente termostato e umido. In Figura 29 è riportata l'immagine di questo setup.



Figura 29 – setup per incubazione dell'anticorpo a 37 °C

3.4.4 – Saturazione del cross-linker con BSA e conservazione overnight

In alcuni batch di funzionalizzazione si è utilizzata la BSA a diverse concentrazioni per saturare i siti di DTSP a cui non si è legato l'anticorpo. Gli elettrodi sono stati, quindi, immersi nella soluzione di BSA in PBS 10 mM a pH 7,40 e mantenuti a 37 °C per diverso tempo e poi sono stati immersi in PBS per lavarli. Nel caso di sensori testati solo su cortisolo questo step non è necessario in quanto non ci sono altre molecole che possono legarsi al cross-linker, anche se alcuni siti sono liberi; in campioni complessi come i fluidi biologici, invece, questo step è obbligatorio per evitare che la resistenza al trasferimento di carica aumenti per l'attacco di altre proteine o molecole con gruppi amminici liberi. Gli elettrodi funzionalizzati con BSA sono stati conservati overnight per le prove con cortisolo il giorno successivo. Gli elettrodi sono stati conservati in frigorifero disposti con la superficie verso l'alto e sopra drop-castata una goccia (circa 100 μ L) di PBS per evitare che andassero a secco. Analogamente all'incubazione termostata, è stato posto vicino un becher contenente acqua distillata e il tutto chiuso da un becher più grande per mantenere l'ambiente umido e a 37 °C.

3.4.5 – Incubazione per attacco dell'antigene

Gli elettrodi funzionalizzati sono stati incubati in soluzioni di cortisolo a diversa concentrazione, ognuno in un becher differente. Si sono utilizzati due approcci differenti: il primo incubando l'elettrodo per 30 minuti in una sola soluzione di cortisolo a concentrazione nota da 0,1 nM a 200 μ M in PBS 10 mM a pH 7,40 preparate partendo da una soluzione di cortisolo 0,5 mM in DMF o preparate direttamente in PBS; per poi valutare l'aumento della resistenza al trasferimento di carica dovuto all'incubazione e quindi al legame tra anticorpo e cortisolo. Per il secondo approccio sono state utilizzate diverse soluzioni di cortisolo con concentrazioni da 0,5 μ M a 300 μ M preparate in PBS 10 mM a pH 7,40 e ogni elettrodo è stato incubato in tutte le soluzioni per 30 minuti in ordine crescente di concentrazione, valutando per ognuna l'aumento della resistenza al trasferimento di carica. Tutte le soluzioni di cortisolo sono state preparate in falcon da 50 mL usa e getta in modo tale da evitare contaminazioni derivanti dall'impiego ripetuto di vetreria, in quanto il range di concentrazione di cortisolo impiegato è elevato.

Caratterizzazione degli elettrodi

Ogni step di funzionalizzazione è stato studiato nel dettaglio mediante caratterizzazione utilizzando sia misure di fluorescenza con immobilizzazione di un anticorpo secondario marcato che misure elettrochimiche, con diverse tecniche descritte successivamente.

3.5.1 – Caratterizzazione mediante fluorescenza

Alcuni elettrodi funzionalizzati con l'anticorpo primario Ab1949 sono stati caratterizzati mediante fluorescenza mediante attacco di un anticorpo secondario marcato, che si lega a quello primario, per studiare l'omogeneità della distribuzione di quest'ultimo sulla superficie.

Inizialmente i test sono stati svolti su nitrocellulosa per studiare i range di concentrazioni ottimali dei due anticorpi per le misure in fluorescenza: su un foglio di nitrocellulosa si sono, quindi, depositati con una micropipetta diverse quantità di anticorpo, da 0,0001 a 500 ng, a distanza di circa 1,5 cm. I foglietti sono stati poi lavati in PBS e immersi in una soluzione di BSA all' 1% in PBS per un'ora mantenuti sotto leggera agitazione in uno shaker termostato a 37 °C. Sono stati poi lavati per tre volte in delle piastre Petri contenenti PBS per 10 minuti prima di essere incubati in soluzioni di anticorpo secondario a diversa concentrazione, entrambi nelle stesse condizioni di agitazione e temperatura, per una o due ore. A seguito di altri tre lavaggi in PBS analoghi ai precedenti, è stata effettuata la lettura al microscopio a fluorescenza.

Per quanto riguarda le misure di fluorescenza sugli elettrodi bulk, la metodologia è analoga ad eccezione di non mantenere l'agitazione nello shaker, e la concentrazione di anticorpo primario testata è stata da 0,01 a 20 µg/mL con incubazione mediante drop casting sulla superficie. Le immagini acquisite mediante microscopio a fluorescenza sono state analizzate con il software ImageJ al fine di ottenere un valore di intensità di emissione.

3.5.2 – Caratterizzazione elettrochimica

Per la caratterizzazione elettrochimica sono state utilizzate spettroscopia d'impedenza (EIS) e voltammetria ciclica (CV). I dettagli delle modalità sono riportati di seguito.

Spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS)

La caratterizzazione mediante spettroscopia d'impedenza è stata la più utilizzata per studiare la resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}) dopo ogni step di funzionalizzazione. Questa è stata eseguita utilizzando il potenziostato e galvanostato Autolab e una cella a tre elettrodi (WE, RE e CE), come quella riportata in Figura 30, in una soluzione di PBS con $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ come sonda redox, entrambi 5 mM. Per alcuni elettrodi interdigitati è stata testata ferrocene metanolo 1 mM in PBS.

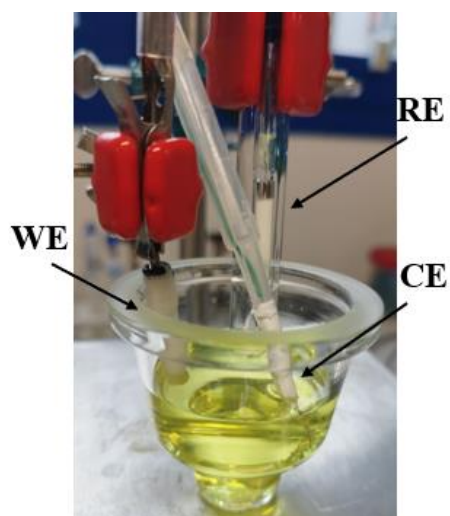


Figura 30 - Setup di cella a 3 elettrodi per misure EIS e CV

Si è, quindi, mantenuto il potenziale di OCP (determinato dallo strumento o trovando il valore di $E/2$ mediante CV dell'elettrodo d'oro non funzionalizzato) al quale sono state applicate variazioni di 5 mV ad una frequenza variabile da 100 kHz a 500 mHz per ottenere il Nyquist Plot (Z' nell'asse x e $-Z''$ nell'asse y) da cui estrapolare R_{ct} mediante fitting del circuito equivalente riportato in Figura 31.

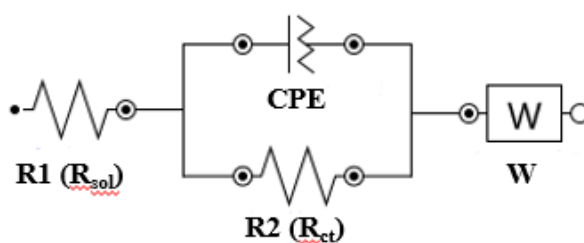


Figura 31 - Circuito chimico equivalente per misure di impedenza

Nello specifico:

- R_1 è la resistenza opposta al passaggio della corrente dalla soluzione di elettrolita (R_{sol})
- R_2 è la resistenza al trasferimento di carica sulla superficie dell'elettrodo (R_{ct})
- CPE è un elemento a fase costante che viene utilizzato al posto della capacità rispetto al circuito di Randles, per migliorare il fitting in quanto il comportamento capacitivo non è ideale

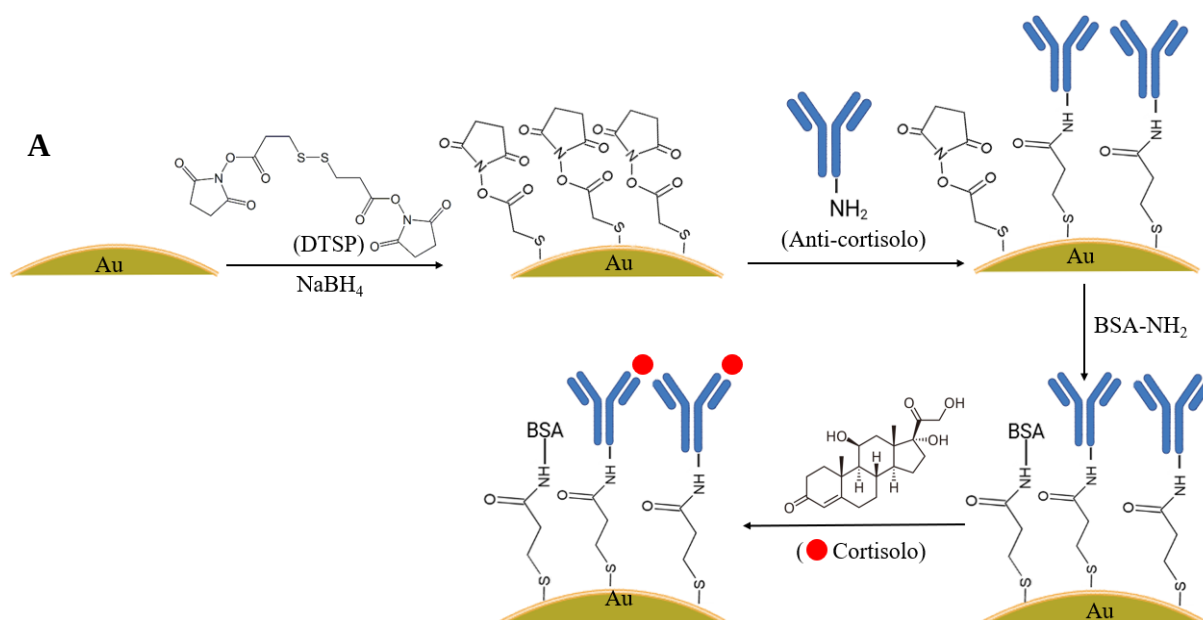
- W è l'elemento diffusivo di Warburg dovuto alla diffusione degli ioni nella cella elettrochimica ed è rappresentata come una retta a 45° in quanto la parte reale e quella immaginaria sono uguali tra loro.

Voltammetria ciclica (CV)

La voltammetria ciclica è stata usata per caratterizzare gli step di funzionalizzazione andando a valutare la diminuzione della corrente dei picchi di ossidazione e riduzione della sonda redox.

Utilizzando la stessa cella a tre elettrodi, per elettrodi bulk si è applicato un potenziale da -0,1 a 0,4 V vs SCE, finestra di potenziale in cui è possibile osservare l'ossidazione e la riduzione della sonda redox. Si sono eseguiti 5 cicli ad una velocità di scansione di 20 mV/s. Le CV degli IDE sono state registrate in ferrocene metanolo 5 mM da -0,4 a 0,7 V vs SCE a 50 mV/s per 3 cicli.

In Figura 32A, B, e C sono riportati rispettivamente gli schemi di funzionalizzazione per la reazione con la DTSP, la reazione con MPA e la caratterizzazione mediante fluorescenza sfruttando l'attacco di un anticorpo secondario marcato che si lega al primario per studiarne l'omogeneità dell'attacco sulla superficie dell'elettrodo.



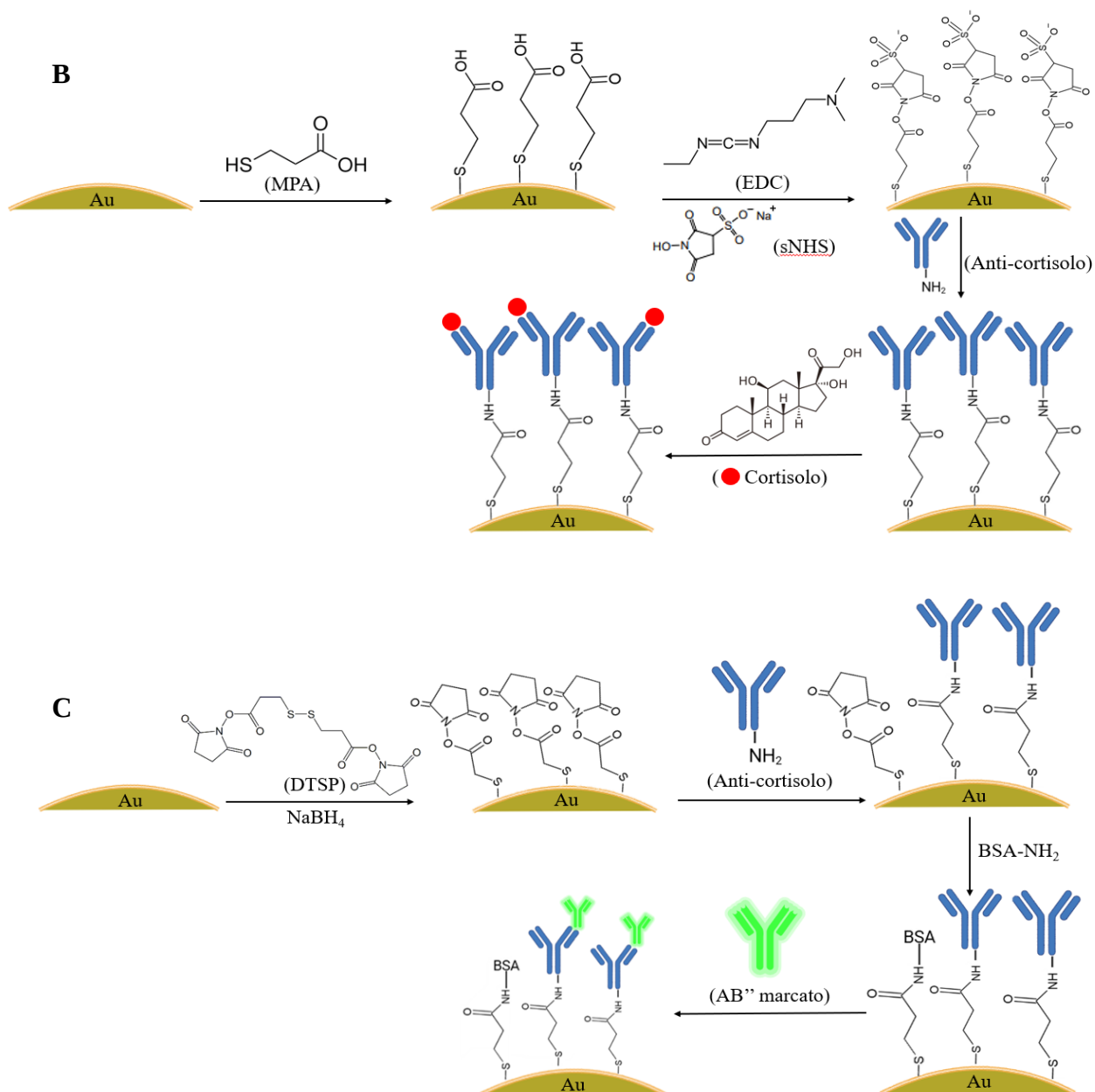


Figura 32 - Funzionalizzazione: A - con DTSP. B - con MPA. C - per misure di fluorescenza

4 - RISULTATI

Sono riportati in seguito i risultati ottenuti dalla variazione dei vari parametri durante la funzionalizzazione e, quindi, l'ottimizzazione di questi per la fabbricazione del biosensore, divisi in ordine di step.

4.1 – Pulizia degli elettrodi e determinazione dell'area elettrochimica

È stato necessario ottimizzare la pulizia degli elettrodi, in particolare di quelli d'oro bulk, per ottenere un punto di partenza della funzionalizzazione che fosse confrontabile tra i vari batch e tra i vari elettrodi all'interno dello stesso batch, sia come area elettrochimica che come resistenza al trasferimento di carica. In particolare, è stato cambiato l'ordine delle operazioni di pulizia, provando quattro metodologie differenti, fino a determinarne quello ottimale.

4.1.1 – Pulizia elettrochimica elettrodi d'oro

Elettrodi bulk

In Figura 33 è riportato un esempio di differenza tra una CV, registrata in H_2SO_4 1 M a 0,1 V/s, di un elettrodo pulito (Figura A) e una di un elettrodo sporco (Figura B).

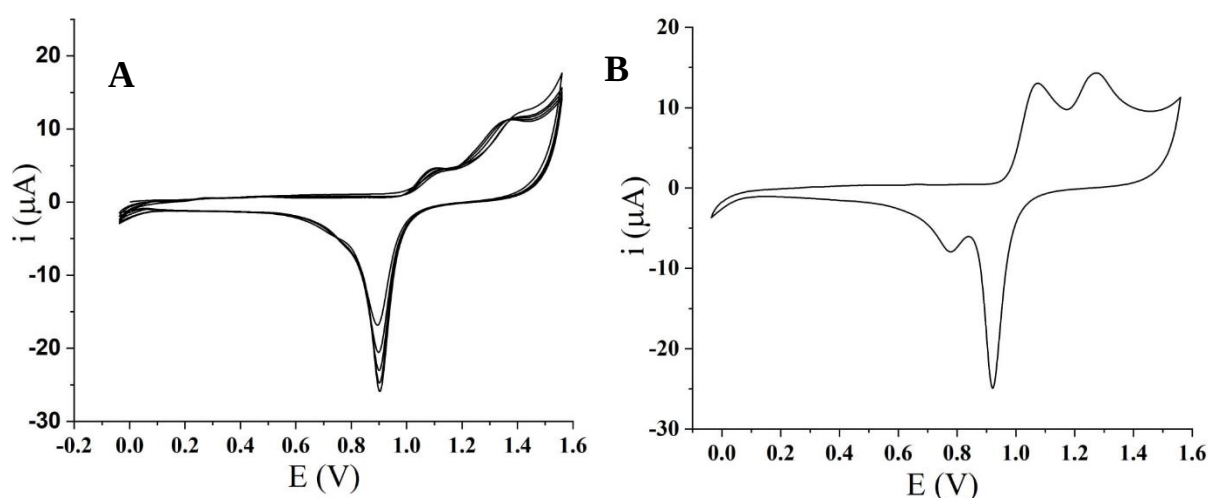


Figura 33. A - CV di un elettrodo d'oro pulito. B - CV di un elettrodo d'oro sporco

Nel primo grafico a sinistra si notano solo i picchi di ossidazione e riduzione dell'oro in quanto la pulizia dell'elettrodo è andata a buon fine. Il picco di ossidazione è leggermente allargato in quanto gli elettrodi sono d'oro policristallino e quindi la superficie è eterogenea e ogni dominio cristallino si ossida ad un potenziale leggermente diverso dagli altri. Nel grafico a destra si può osservare l'ossidazione e la riduzione di un'altra coppia redox nella finestra di potenziale applicata, per cui l'elettrodo non è pulito. È possibile pulire l'elettrodo per via elettrochimica

mediante CV: il picco non relativo all'oro deve diminuire di intensità da un ciclo all'altro, simbolo che l'inquinante viene rimosso lasciando scoperta la superficie d'oro (allo stesso modo i picchi dell'oro devono aumentare di intensità).

In Figura 34 è, invece, riportato un esempio di stripping dei legami Au-S di un elettrodo bulk. In particolare, a sinistra (Figura 34A) è riportato il primo ciclo, mentre a destra (Figura 34B) il secondo e il terzo.

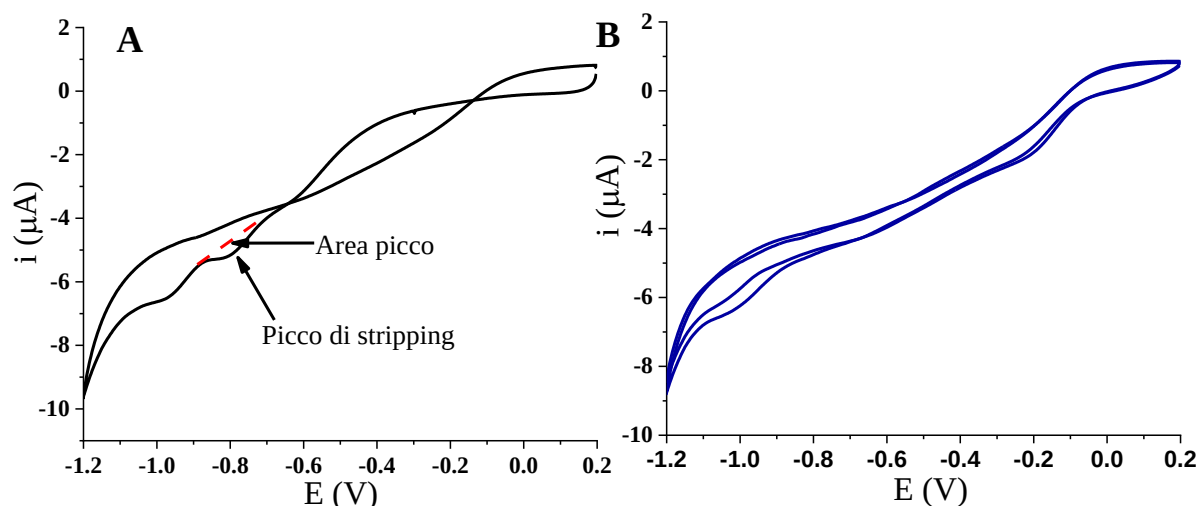


Figura 34. A – Primo ciclo di stripping di un elettrodo Au bulk. B – Cicli 2 e 3 di stripping di un elettrodo Au bulk

Si può osservare il picco di riduzione dovuto allo stripping e si nota che, nel primo ciclo il processo di riduzione è altamente quantitativo, in quanto negli ultimi due cicli il picco di stripping non è più distinguibile. Per questo motivo è possibile integrare il picco solamente del primo ciclo per ottenerne l'area (delimitata in rosso in Figura 34A) per quantificare la quantità di legami Au-S che si sono ridotti.

Elettrodi IDE e screen-printed

Per la pulizia degli elettrodi d'oro interdigitati e screen-printed, che sono più delicati, si è utilizzato lo stripping dei legami Au-S, analogo agli elettrodi bulk, e la CV in H_2SO_4 0,05 M. In Figura 35 è riportato, rispettivamente, un esempio di stripping e uno di CV di un elettrodo IDE; anche in questo caso lo stripping è quantitativo avvenendo limitatamente al primo ciclo.

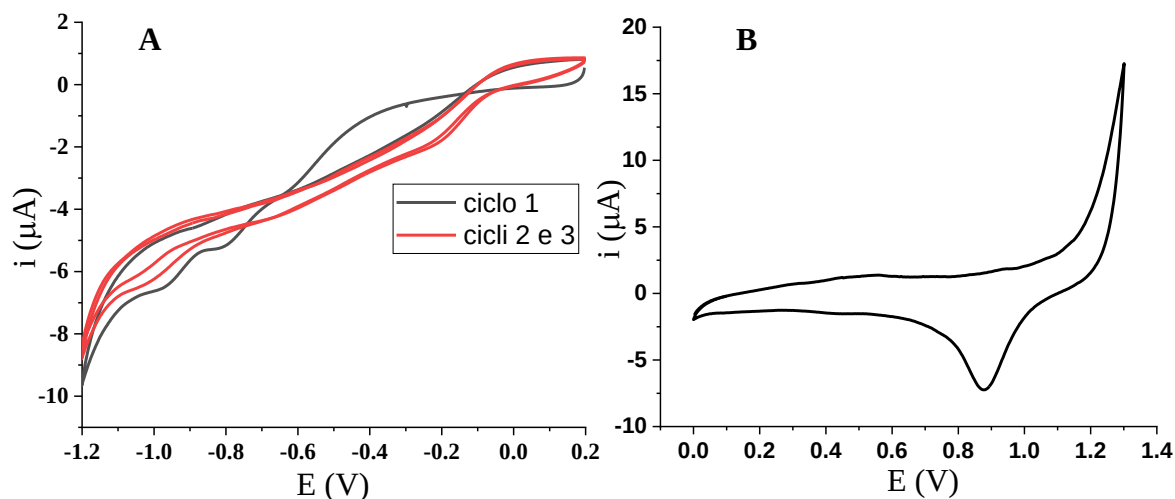


Figura 35. A - Stripping di un elettrodo d'oro IDE. B - CV di un elettrodo d'oro IDE

La CV di caratterizzazione in H₂SO₄ (Figura 35B) ha forma differente rispetto a quella dell'elettrodo bulk. In particolare, il picco di ossidazione non è definito, probabilmente perché il processo è coperto dalla scarica del solvente e si osservano correnti di minore intensità rispetto all'elettrodo bulk a causa della diversa natura dell'elettrodo (in termini sia di materiale elettrodico che di area elettroattiva) e della concentrazione dell'elettrolita.

4.1.2 – Confronto dei metodi di pulizia per elettrodi bulk

Per la pulizia degli elettrodi bulk sono stati utilizzati quattro metodi differenti riportati di seguito, nei quali è stato cambiato soprattutto l'ordine delle varie operazioni:

1. Per il primo batch di funzionalizzazione gli elettrodi sono stati puliti mediante pulizia elettrochimica, quindi CV in acido solforico 1 M, soluzione piranha e, infine, lavaggio in etanolo per 30 minuti. È stata successivamente registrata una CV in acido solforico 0,5 M, per verificare la pulizia dell'elettrodo, e una volta che tutti gli elettrodi sono risultati puliti si è determinata la resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}) e l'area elettrochimica.
2. Per il secondo, invece, si è introdotto lo stripping dei legami Au-S dato che gli elettrodi erano già stati utilizzati, seguito da lavaggio in etanolo per trenta minuti e CV. Alcuni elettrodi che sono risultati sporchi sono stati nuovamente mantenuti in etanolo per dieci minuti e poi in soluzione piranha. Tutti gli elettrodi sono stati di nuovo immersi in etanolo dopo la CV, prima di effettuare le misure.
3. Per il terzo metodo dopo lo stripping gli elettrodi è stata introdotta la pulizia meccanica in allumina, poi sono stati sonicati in acqua e lavati in etanolo per trenta minuti.

- Per il quarto si sono combinate tutte le tipologie di pulizie: dopo lo stripping gli elettrodi sono stati lavati in etanolo per trenta minuti, poi puliti meccanicamente con allumina e sonicati. Il giorno successivo, cioè il giorno di funzionalizzazione, sono stati immersi in soluzione piranha per poi verificare la pulizia mediante CV. Quest'ultimo passaggio è stato poi rimosso sui batch successivi in quanto le CV hanno confermato che gli elettrodi venivano puliti dai passaggi precedenti.

Nello schema rappresentato in Figura 36 sono riassunti i quattro metodi di pulizia utilizzati sugli elettrodi d'oro bulk:

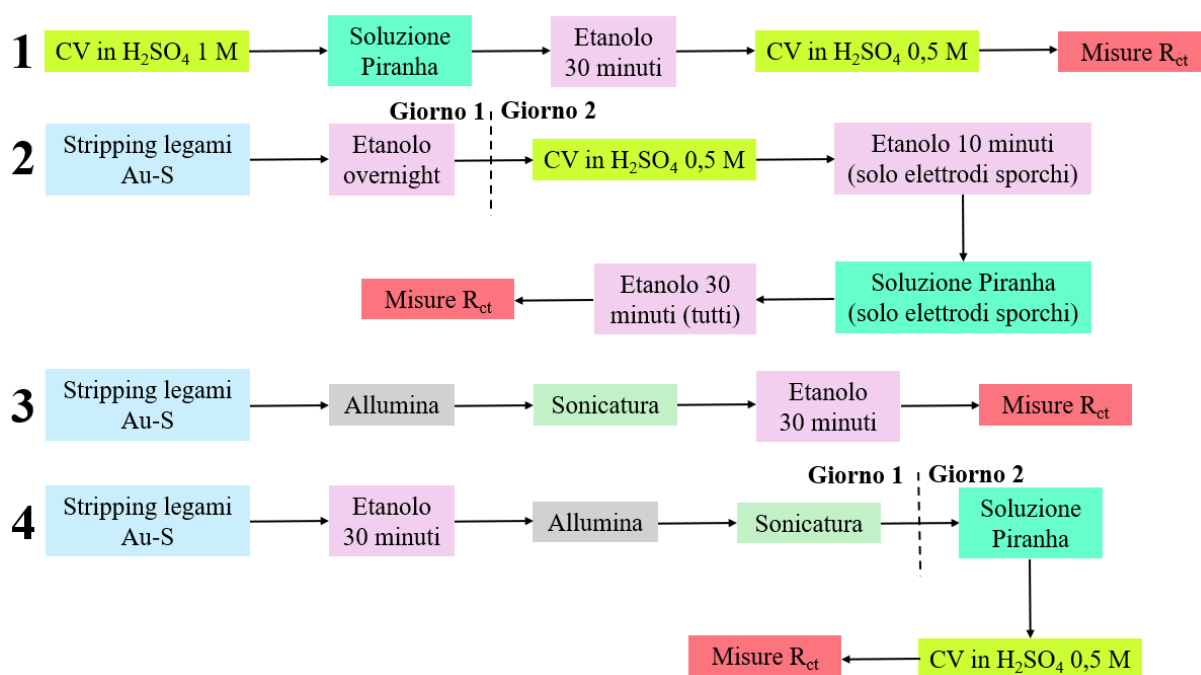


Figura 36 - Schemi dei metodi di pulizia testati su elettrodi bulk

4.1.3 – Caratterizzazione dello step di pulizia mediante EIS

È stata, quindi, determinata la resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}) degli elettrodi una volta puliti: essendo l'oro un materiale conduttivo, più la resistenza è bassa maggiore è il grado di pulizia della superficie dell'elettrodo. In Figura 37 è riportata la differenza di R_{ct} che si è ottenuta dai quattro differenti metodi di pulizia sopra riportati, su un batch di dieci elettrodi bulk ciascuno. Nello specifico, è riportata la media di R_{ct} ottenuta per ogni metodo, e la deviazione standard relativa.

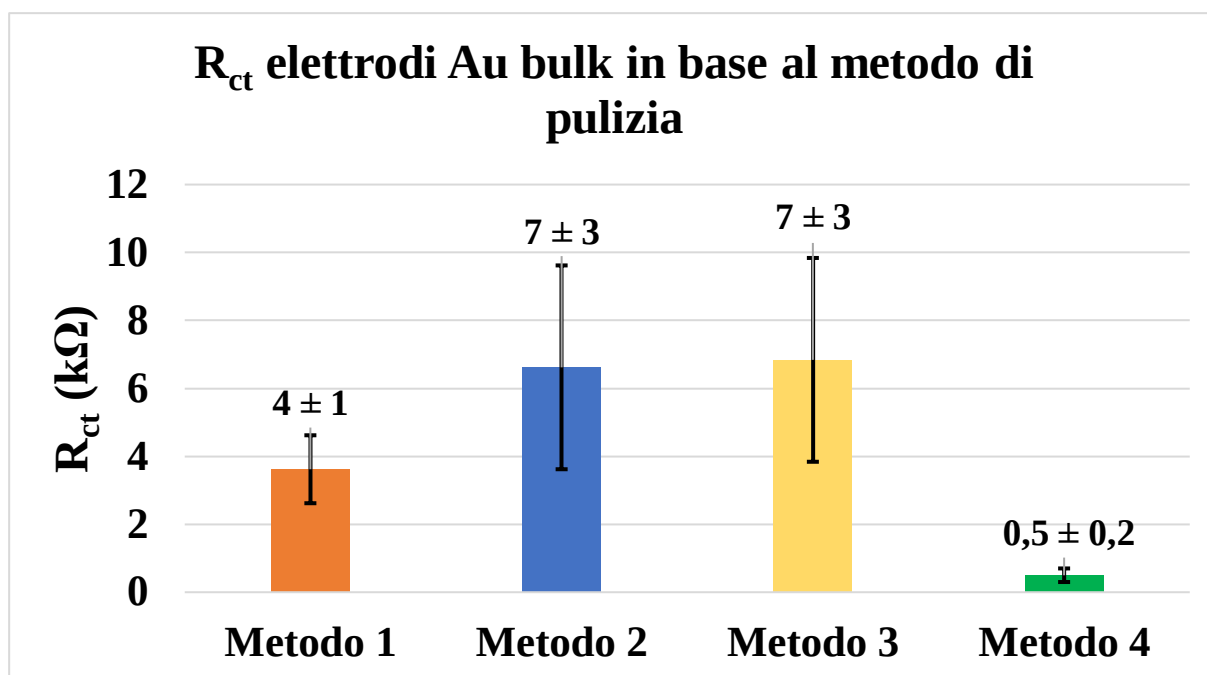


Figura 37 – Confronto delle R_{ct} ottenute in base al metodo di pulizia utilizzato

È possibile osservare che i metodi 2 e 3 non sono utili per una pulizia completa della superficie dell'elettrodo in quanto R_{ct} risulta piuttosto elevato. Con il primo metodo si è ottenuta una resistenza più bassa, ma comunque piuttosto elevata, probabilmente anche a causa del fatto che gli elettrodi erano nuovi, quindi più puliti rispetto a quelli dei batch successivi che sono stati funzionalizzati.

Il metodo 4, invece, offre una pulizia completa dell'elettrodo grazie al passaggio in soluzione piranha subito prima della procedura di funzionalizzazione. Infatti, si è osservato che con questo metodo si ottengono quasi sempre resistenze inferiori a 1 kΩ ma che, se l'elettrodo non viene utilizzato subito, questa tende a riaumentare, probabilmente perché l'elettrodo subisce nuovamente passivazione. Nonostante ciò, si può osservare che con ognuno di questi metodi la deviazione standard relativa rimane sempre piuttosto elevata (intorno al 50%). Questo sottolinea quanto lo step di pulizia dell'elettrodo sia una criticità nella preparazione dei biosensori: nonostante l'ottimizzazione non è stato possibile ottenere un batch con un punto di partenza perfettamente uniforme tra i vari elettrodi, e ciò influenza inevitabilmente la successiva funzionalizzazione.

In Figura 38 viene riportata questa differenza confrontando la misura d'impedenza di un elettrodo che ha subito un lavaggio in soluzione piranha appena prima della misura stessa (curva

blu), rispetto ad uno la cui resistenza è stata determinata dopo quattro giorni dal lavaggio (curva nera), a parità di tutte le altre condizioni utilizzate nella pulizia.

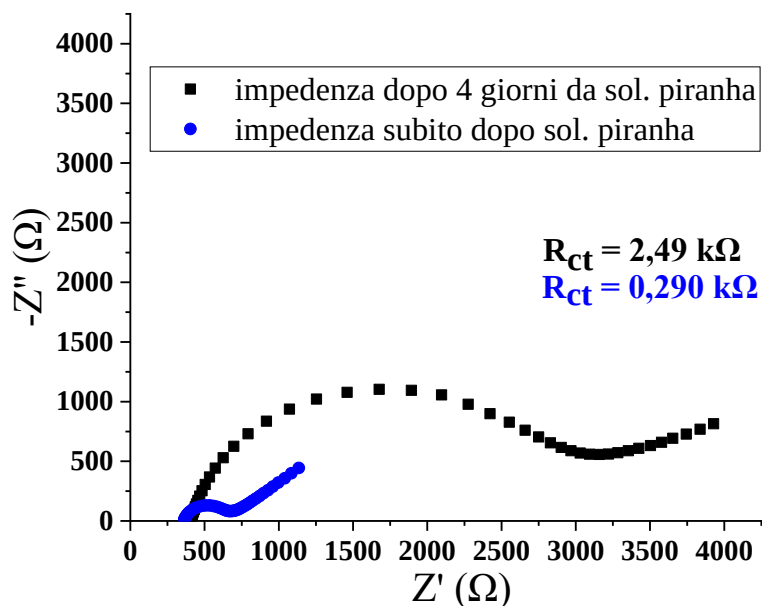


Figura 38 – Influenza su R_{ct} del tempo passato dalla soluzione piranha alla misura d'impedenza

In Figura 39 è, invece, riportata la differenza tra una misura d'impedenza sull'elettrodo d'oro bulk e un IDE d'oro (non è presente quella dell'elettrodo screen-printed in quanto la misura d'impedenza è stata fatta solo dopo incubazione con anticorpo).

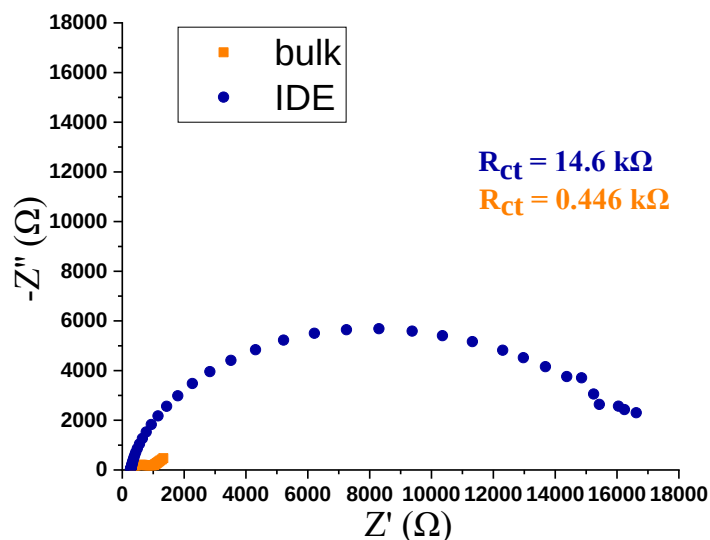


Figura 39 - Misure di impedenza di elettrodi d'oro bulk e IDE

Si osserva come gli elettrodi interdigitati posseggano una resistenza al trasferimento di carica molto più elevata; inoltre, determinando R_{ct} su diversi elettrodi, si sono ottenuti valori molto diversi da loro. Per i test di questi elettrodi in Fe^{2+}/Fe^{3+} si è sostituita la CPE con una capacità nel circuito equivalente in quanto si è notato che migliora il fitting.

Per i test effettuati in ferrocene metanolo come sonda redox, invece, si è ottenuto un grafico che non è possibile fittare con un circuito equivalente simile a quelli utilizzati; perciò, non è stato possibile determinarne il valore di R_{ct} . Per ciascuno degli step di funzionalizzazione degli IDE, continuando la caratterizzazione mediante EIS in ferrocene metanolo si ottengono sempre curve analoghe, per cui non è stato possibile ricavare un fitting adeguato e che quindi non sono state riportate: tutte le misure di impedenza in seguito sono state eseguite in $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Questo è probabilmente dovuto ad una maggiore resistenza al trasferimento di carica intrinseca dell'elettrodo d'oro interdigitato rispetto a quello bulk.

4.1.4 – Caratterizzazione dello step di pulizia mediante CV

Sia gli elettrodi bulk che IDE sono stati caratterizzati dopo la pulizia mediante CV nella sonda redox: per i bulk Fe^{2+}/Fe^{3+} , per gli IDE Fe^{2+}/Fe^{3+} e ferrocene metanolo. Nel caso in cui l'elettrodo sia sporco, e quindi la superficie sia parzialmente ricoperta, si otterranno dei picchi di ossidazione e riduzione meno intensi in CV.

In Figura 40 è riportato, in modo analogo alla misura d'impedenza, il confronto tra la CV fatta subito dopo la pulizia in soluzione piranha e quella fatta quattro giorni dopo questo step di pulizia. Analogamente alla misura EIS si nota che l'elettrodo viene passivato e quindi l'intensità dei picchi redox tende a diminuire (curva nera). Inoltre, avendo picchi così poco definiti come quelli in figura risulta anche difficile determinare il valore di $E/2$. È, quindi, appropriato lavare l'elettrodo in soluzione piranha subito prima di funzionalizzarlo per avere più superficie disponibile per l'attacco del cross-linker.

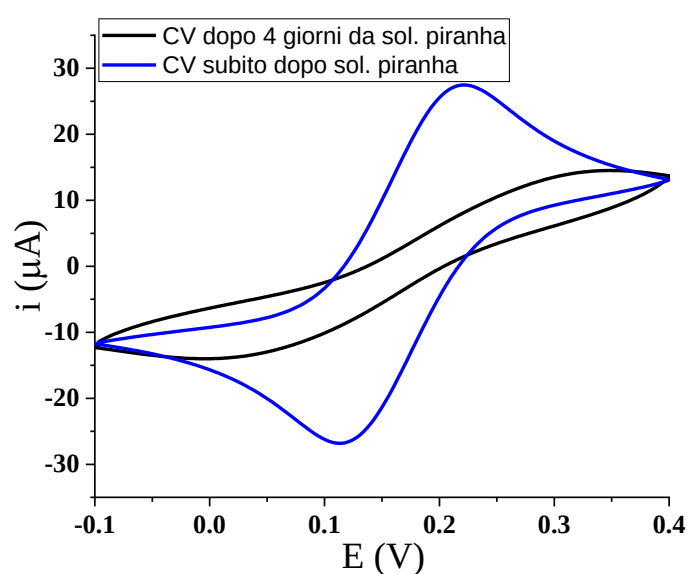


Figura 40 - CV di confronto in base ai tempi di passaggio in soluzione piranha

Dalla CV dell'elettrodo d'oro pulito è possibile determinare il valore di $E/2$, cioè l'OCP, facendo la media tra il potenziale del picco di ossidazione e quello del picco di riduzione.

In Figura 41A sono riportate le CV di un elettrodo bulk e di un IDE in sonda redox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM. Si è osservato che, nonostante la finestra di potenziale che è stata utilizzata sia più ampia, la CV non mostra la presenza di picchi definiti di ossidazione e riduzione del ferro.

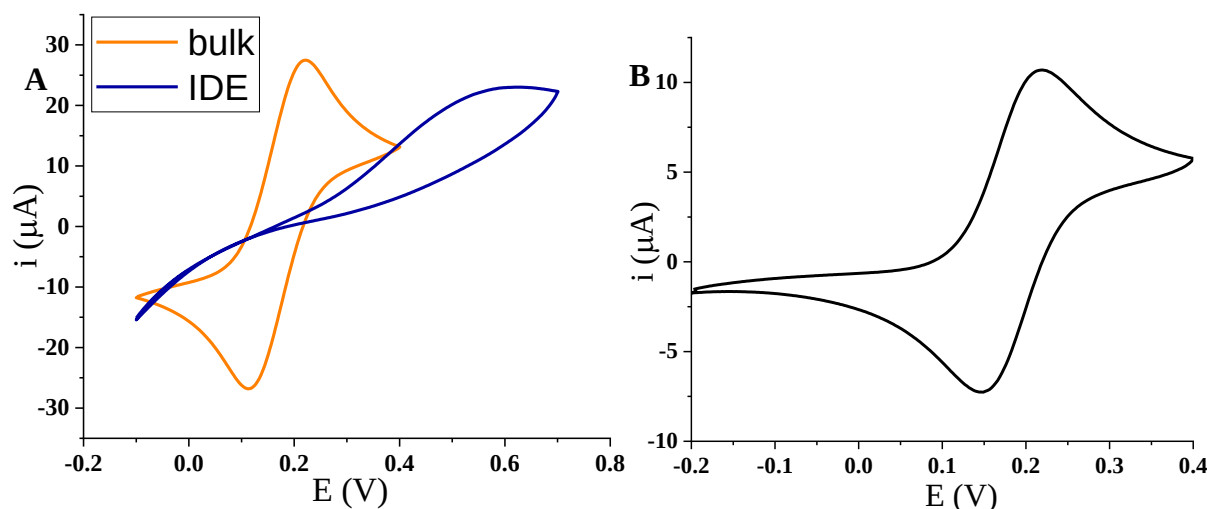


Figura 41. A – CV di IDE e bulk a confronto in Fe^{2+}/Fe^{3+} . B - CV di IDE in $FcMeOH$

Si può, quindi, ipotizzare che questa tipologia di elettrodi che hanno una natura diversa rispetto a quelli bulk, e uno spessore dello strato d'oro minore, siano più suscettibili a legare degli anioni CN^- , rendendo l'oro non disponibile all'ossidazione e riduzione. In Figura 41B è, invece, riportata la CV di un IDE in ferrocene metanolo 5 mM. In questa sonda redox si può osservare che i picchi redox sono chiaramente visibili. Per questo tipo di elettrodi è, quindi, necessario utilizzare ferrocene metanolo come sonda redox per le misure di impedenza ma, come discusso precedentemente, il circuito chimico equivalente per il fitting della curva, e quindi la determinazione di R_{ct} , va modificato.

4.1.5 – Confronto delle aree elettrochimiche di elettrodi bulk

In Figura 42 è riportato un esempio di picco di desorbimento dell'ossigeno che si ottiene dal segmento di riduzione in CV dopo aver applicato un potenziale di 1,559 V vs SCE per 100 secondi all'elettrodo d'oro. Integrando il picco, si ottiene un'area (delimitata in rosso) da cui si risale all'area elettrochimica dell'elettrodo, cioè l'area elettrochimicamente attiva.

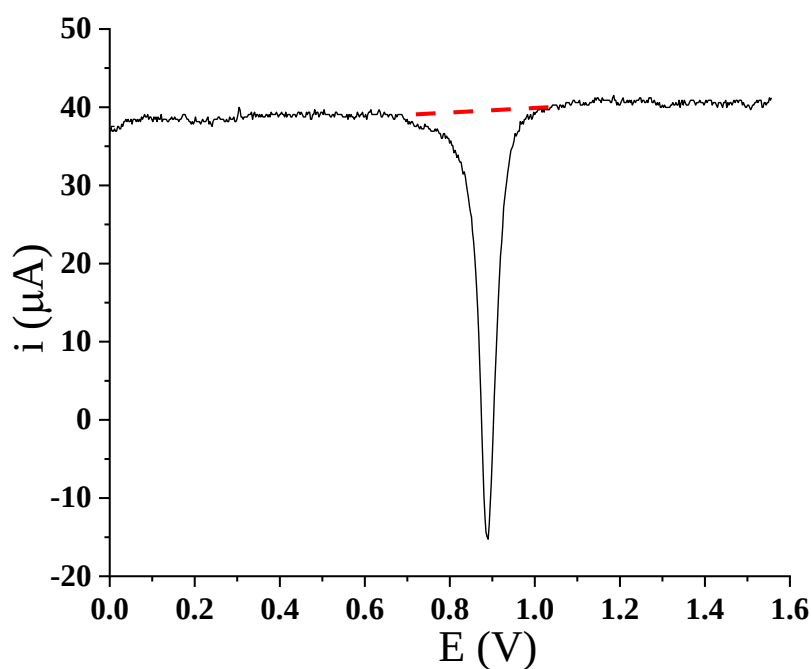


Figura 42 – Segmento di riduzione per desorbimento dell'ossigeno

In Figura 43 sono riportati i dati di media e deviazione standard del roughness factor determinato nei primi due batch (di dieci elettrodi bulk ciascuno) di funzionalizzazione:

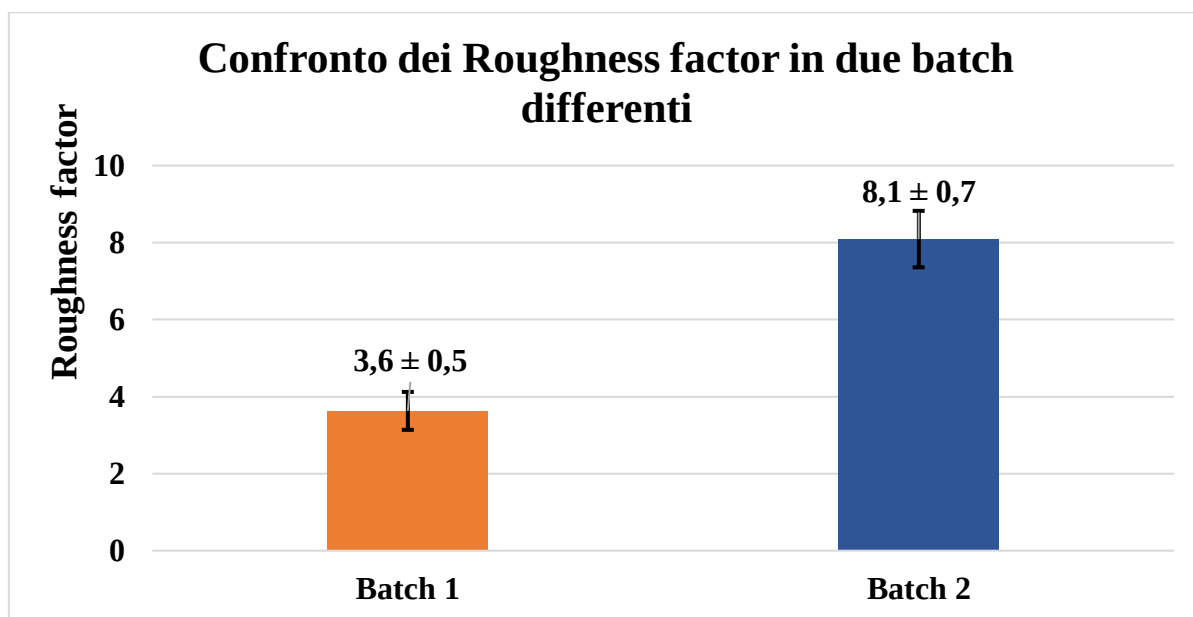


Figura 43 – Confronto aree elettrochimiche in diversi batch

Si è osservato che i valori ricavati di roughness factor (e quindi l'area elettrochimica) possono variare da un batch all'altro per la pulizia e la funzionalizzazione intermedie che vengono effettuate; tuttavia, i valori sono piuttosto simili all'interno di uno stesso batch. Per questo

motivo si è deciso di non determinare più questo parametro considerando le aree elettrochimiche simili tra loro dopo aver subito lo stesso processo di pulizia.

4.2 – Reazione con il cross-linker

Sono riportate in seguito le caratterizzazioni degli elettrodi funzionalizzati con i due cross-linker utilizzati.

4.2.1 – Funzionalizzazione con MPA

In Tabella 2 sono indicate le R_{ct} ottenute da un batch di quattro elettrodi funzionalizzati con MPA overnight e le relative resistenze normalizzate (R_n), cioè il rapporto tra R_{ct} dell'elettrodo funzionalizzato con MPA e quella dell'elettrodo d'oro pulito e non funzionalizzato.

Tabella 2 – R_{ct} e R_n di elettrodi funzionalizzati con MPA

Elettrodo	R_{ct} (k Ω)	R_n (R_{ct} MPA/ R_{ct} Au)
4	22,2	43,9
6	13,2	16,9
8	35,5	29,3
9	28,6	46,2
Media	25 ± 9	34 ± 14

Si osserva che i valori di R_{ct} ottenuti sono differenti tra loro ma in tutti i casi i valori di R_n sono molto elevati, ad indicare che la funzionalizzazione è avvenuta con successo e la superficie dell'elettrodo d'oro è stata legata dai gruppi SH liberi. Per un elettrodo (numero 4) si è misurata R_{ct} in seguito all'attacco con MPA ($R_{ct} = 22,2$ k Ω) e anche dopo attivazione con sNHS e EDC ($R_{ct} = 19,6$ k Ω); questi valori sono concordi in quanto si tratta solo di attivare i gruppi del cross-linker senza variare lo spessore dello strato di funzionalizzazione. Si nota, infatti, solo una leggera diminuzione della resistenza al trasferimento di carica che è probabilmente dovuta ai vari lavaggi effettuati tra le misure e tra i vari step, immergendo l'elettrodo in PBS.

In Figura 44 è riportato il confronto tra la curva d'impedenza dopo la funzionalizzazione in MPA (curva nera) e quella dopo l'attivazione del cross-linker (curva verde).

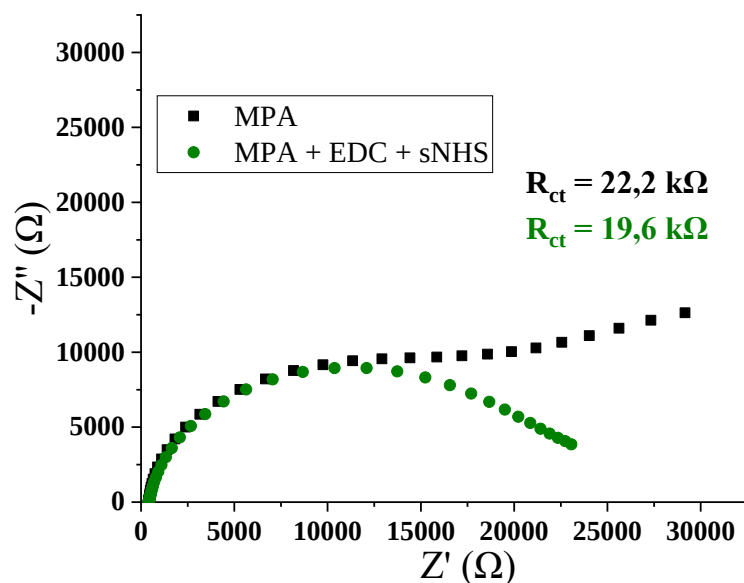


Figura 44 – Confronto impedenze prima e dopo attivazione dell'MPA con EDC e sNHS

4.2.2 – Funzionalizzazione con DTSP

Molti batch sono stati funzionalizzati mediante DTSP, utilizzando sempre lo stesso tempo di reazione di due ore e le stesse concentrazioni. In Figura 45 sono riportate le medie degli R_{ct} ottenuti utilizzando la DTSP come cross-linker nei vari batch composti da 7 elettrodi, a parità di condizioni di pulizia con il metodo ottimale (metodo 4).

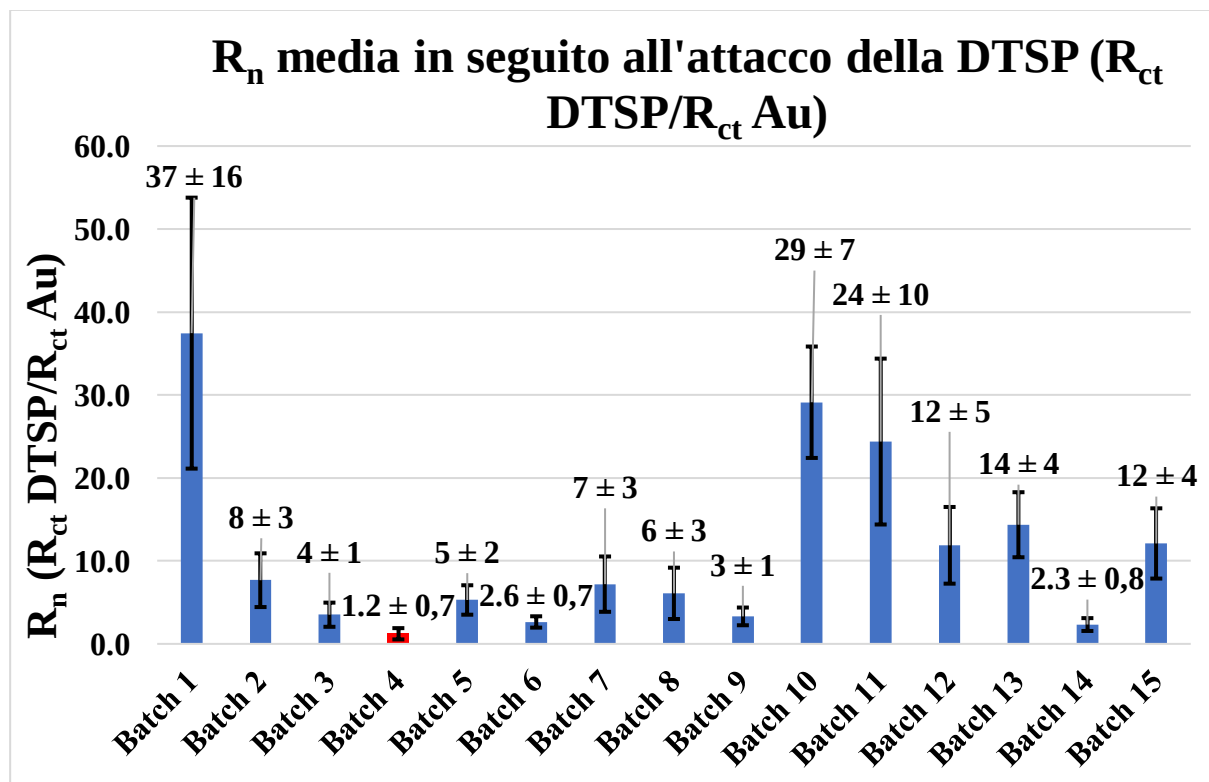


Figura 45 – R_n medio ottenuto dopo l'attacco della DTSP nei vari batch

Si osserva, innanzitutto, che i valori di R_n sono quasi tutti maggiori di 1, ad eccezione del batch 4 (segnato in rosso) in cui la variazione di resistenza è minima e R_n minore di 1 per quasi tutti gli elettrodi. Ad eccezione di questo batch solo il 3,76% degli elettrodi funzionalizzati con DTSP ha mostrato un R_n minore o uguale ad 1, possibilmente dovuto ad una pulizia non ottimale dell'elettrodo o ad un distacco della funzionalizzazione dalla superficie.

I valori di R_{ct} ricavati, inoltre, sono piuttosto diversi tra i vari batch: questo è, almeno in parte, dovuto sicuramente alle aree elettrochimiche che, come precedentemente mostrato, possono variare. Anche all'interno dello stesso batch le resistenze ottenute possono variare di molto, infatti le deviazioni standard sono elevate: questo è probabilmente dovuto al fatto che, come dimostrato precedentemente, anche in seguito a pulizia ottimizzata si ottengono valori di partenza differenti, nonostante questi siano sempre minori di 1 k Ω .

Una variazione su questo step è stata quella di introdurre una leggera agitazione magnetica in modo da non avere problemi legati alla diffusione del cross-linker verso la superficie dell'elettrodo. In Figura 46 è riportato il confronto tra la misura d'impedenza di un elettrodo d'oro pulito e non funzionalizzato e quella di un elettrodo d'oro con DTSP mantenuta in agitazione nelle due ore di reazione.

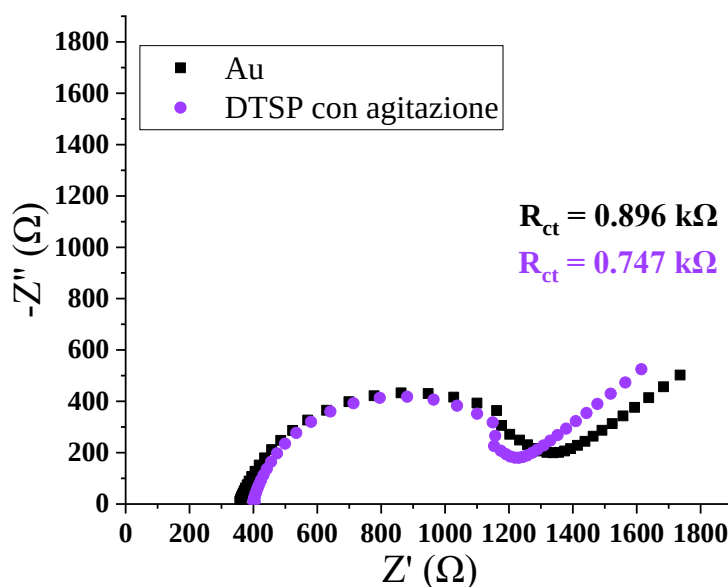


Figura 46 – Confronto impedenza Au e DTSP con agitazione

Si ottiene una resistenza analoga a quella dell'oro pulito, perciò si può dedurre che con l'agitazione, seppur leggera, gli strati di cross-linker vengono delaminati e l'elettrodo non viene funzionalizzato.

È stato effettuato, inoltre, un test utilizzando DTSP come cross-linker ma aumentando il tempo di reazione a tre ore, senza utilizzare l'agitazione. In Tabella 3 sono riportati i valori di R_{ct} e R_n dei quattro elettrodi testati con questo metodo.

Tabella 3 – Variazione dei valori di R_{ct} in seguito a reazione con DTSP per 3h

Elettrodo	R_{ct} DTSP (k Ω)	R_n (R_{ct} DTSP/ R_{ct} Au)
1	2,23	1,99
2	9,79	8,16
3	3,37	3,37
4	3,59	2,58
Media	5 ± 3	4 ± 3

Da questa misura emerge che l'aumento del tempo da due a tre ore non ha un'influenza significativa sul valore di R_{ct} e, quindi, sulla quantità di cross-linker legato alla superficie.

In ogni caso, avendo riscontrato un aumento di R_{ct} in quasi tutte le misure di impedenza effettuate in seguito all'attacco della DTSP, si conferma il possibile utilizzo di questo cross-linker per la funzionalizzazione degli elettrodi d'oro. Confrontando, invece, i due cross-linker utilizzati, si sottolinea che l'MPA copre in modo maggiore la superficie d'oro, probabilmente anche a causa del fatto che la reazione viene lasciata overnight, quindi per un tempo molto più prolungato rispetto a quella con la DTSP. Un'altra causa si può identificare anche nel fatto che l'MPA possiede già i gruppi SH liberi, per cui l'attacco all'elettrodo è facilitato rispetto alla DTSP in cui il legame SH deve essere ottenuto mediante riduzione del ponte disolfuro.

Caratterizzazione mediante CV

Gli elettrodi bulk funzionalizzati con DTSP sono stati caratterizzati anche mediante CV: in Figura 47 ne è riportato un esempio, confrontato con la CV dell'elettrodo d'oro non funzionalizzato.

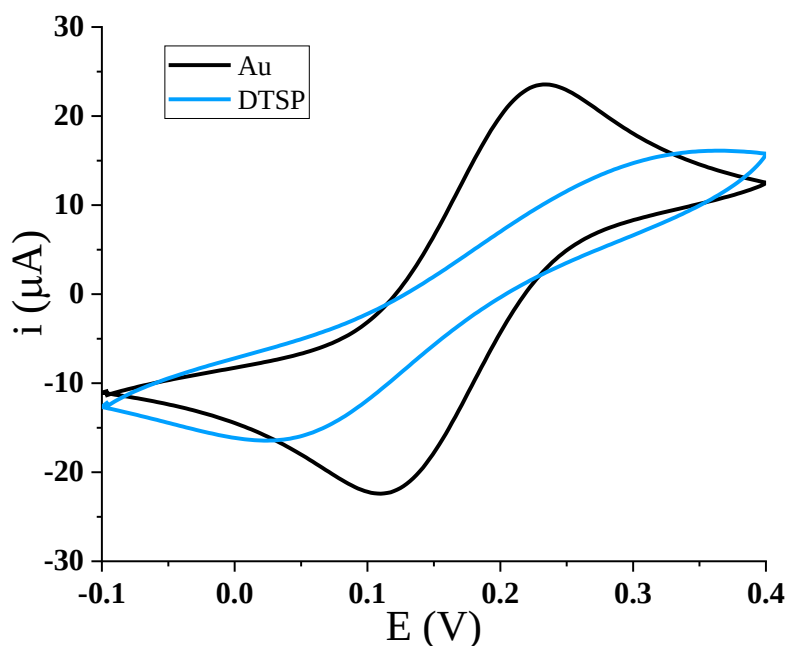


Figura 47 – Confronto fra CV ottenute su un elettrodo d'oro e a seguito della funzionalizzazione con DTSP

Si può notare che i picchi redox diminuiscono di intensità, in quanto la superficie d'oro viene funzionalizzata e quindi è meno disponibile e, di conseguenza, passa meno corrente. Ciò è in analogia con quanto ottenuto con le misure EIS, cioè con un aumento della resistenza al trasferimento di carica.

4.3 – Incubazione in anticorpo

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione di questo step divisi in base all'anticorpo utilizzato: quello da coniglio e quello da topo.

4.3.1 – Risultati con anti-cortisolo da coniglio

Per questo anticorpo tutte le prove sono state effettuate utilizzando l'incubazione a 37 °C e mantenendo un tempo d'incubazione di due ore. La concentrazione utilizzata è sempre la stessa, ed è pari a 20 µg/mL.

La caratterizzazione di questo step utilizzando l'anticorpo anti-cortisolo da coniglio è stata eseguita una sola volta: si è preferito, poi, evitare il più possibile misure EIS sull'elettrodo funzionalizzato in maniera tale da ridurre al minimo la delaminazione della funzionalizzazione stessa, dovuta ai vari lavaggi anche dalla sonda redox. In Tabella 4 sono riportate le R_{ct} medie con le relative deviazioni standard e, per gli elettrodi bulk, la media della resistenza normalizzata rispetto a quella determinata sull'elettrodo d'oro pulito ($R_{ct} AB'/R_{ct} Au$) per

poterle, poi, confrontare con quelle registrate dopo la funzionalizzazione con l'anticorpo da topo. Come cross-linker in questo caso è stata usata la DTSP.

Tabella 4 – Resistenze ottenute con AB' anti-cortisolo da coniglio

Tipo di elettrodo	R_{ct} (k Ω)	R_n (R_{ct} AB'/ R_{ct} Au)
Au bulk	27 ± 4	48 ± 17
Au IDE	8 ± 1	
Au drop-sens	$1,7 \pm 0,3$	

Si osserva che i valori delle resistenze al trasferimento di carica degli elettrodi bulk sono più elevate rispetto a quelle ottenute con la DTSP per cui l'anticorpo si lega sicuramente al cross-linker. Non avendo ulteriori dati per i valori di R_{ct} relativi al cross-linker nelle altre tipologie di elettrodi non è possibile avere un confronto ma l'attacco dell'anticorpo dovrebbe essere comunque analogo a quello degli elettrodi bulk. La quantità posseduta di questo anticorpo non è stata sufficiente per effettuare misure più approfondite.

4.3.2 – Risultati con anti-cortisolo da topo

La quasi totalità delle prove è stata svolta utilizzando questo anticorpo per cui si sono effettuate prove diverse sia per quanto riguarda il tempo e la temperatura d'incubazione (1 e 2 h e a temperatura ambiente o a 37 °C), sia per quanto riguarda la concentrazione d'anticorpo. Rispetto al riferimento di 1 $\mu\text{g/mL}$ ⁷, infatti, si sono svolti test sia in diluizione, che con anticorpo più concentrato. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti divisi in base al cross-linker utilizzato.

Cross-linker: MPA

Anche in questo caso è stata testata un'incubazione con leggera agitazione per evitare problemi di diffusione dell'anticorpo verso la superficie dell'elettrodo ma si è osservata una delaminazione della funzionalizzazione con un'importante riduzione della resistenza al trasferimento di carica. Un esempio è riportato in Figura 48 dove è riportata la misura d'impedenza per l'elettrodo dopo l'incubazione in anticorpo e prima, cioè dopo l'attivazione con sNHS e EDC.

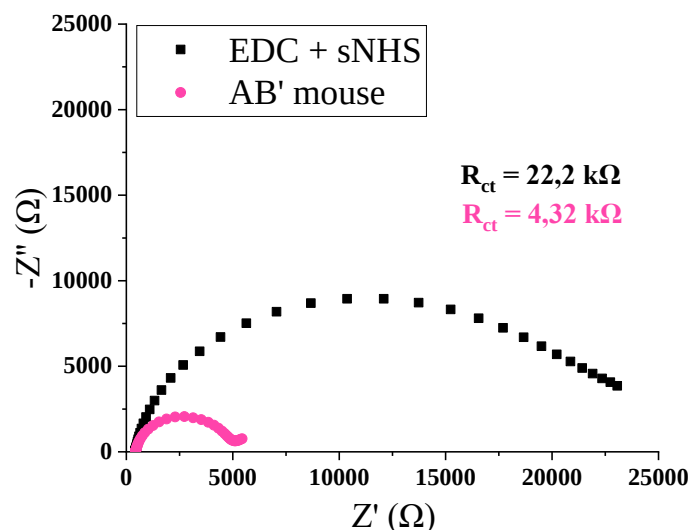


Figura 48 – Confronto di impedenze con incubazione sotto blanda agitazione

In Figura 49 sono, invece, riportati i valori di R_{ct} ottenuti sul batch di 4 elettrodi, funzionalizzato senza agitazione in confronto ad un bianco (colonna blu) funzionalizzato con MPA e attivato con EDC e sNHS, poi lasciato in incubazione in PBS invece che in anticorpo.

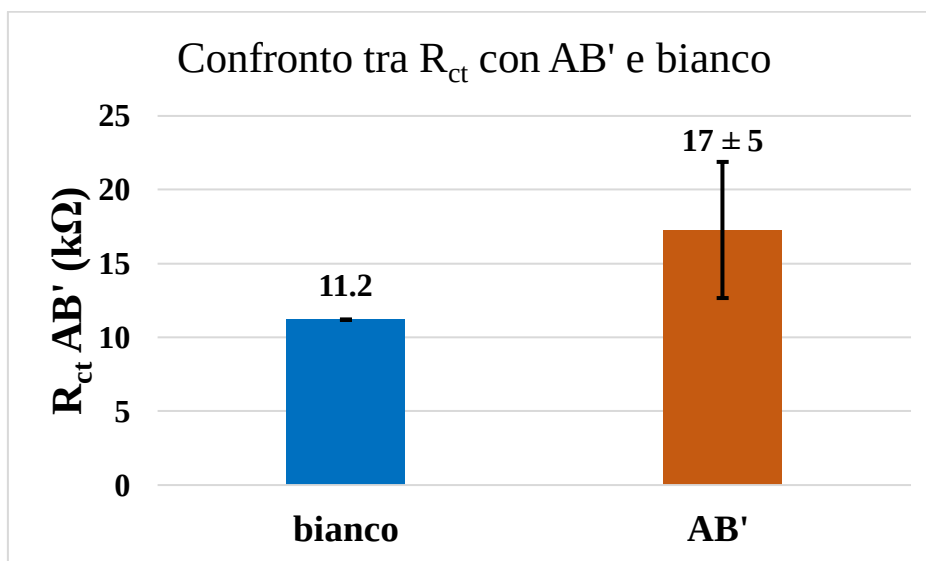


Figura 49 – Confronto R_{ct} tra bianco ed elettrodi funzionalizzati

Si evidenzia che, nonostante la mancanza di agitazione, le resistenze ottenute sono più basse rispetto a quelle funzionalizzate solo con MPA riportate nel capitolo 4.2.1. Inoltre, le resistenze ottenute sono analoghe a quella relativa al bianco senza anticorpo, per cui se ne può dedurre che l'anticorpo si leghi all'MPA in quantità molto piccole o, comunque, che la funzionalizzazione venga facilmente delaminata. Per questo motivo si è scelto di utilizzare la DTSP come cross-linker.

Cross-linker: DTSP

In Tabella 5 è riportata la differenza tra la R_{ct} dell'elettrodo bulk funzionalizzato con DTSP e il bianco, cioè l'elettrodo lasciato un'ora in PBS invece che in soluzione di anticorpo: non essendoci molecole che si leghino alla DTSP, in questo caso R_{ct} dovrebbe rimanere all'incirca costante (R_n circa 1).

Tabella 5 – Prova del bianco rispetto all'anticorpo

	R_{ct} DTSP	R_{ct} bianco (PBS)	R_n (R_{ct} PBS/ R_{ct} DTSP)
Media (batch di 5 elettrodi)	4 ± 2	5 ± 2	$1,3 \pm 0,3$

Si nota che il valore di R_{ct} rimane pressoché costante: ciò significa che eventuali incrementi nei batch in cui si è utilizzato l'anticorpo possono dipendere solo dall'attacco di quest'ultimo al cross-linker.

In Figura 50 sono riportati i valori di R_n dell'anticorpo rispetto al cross-linker (R_{ct} AB'/ R_{ct} DTSP) per un batch di 5 elettrodi incubati a temperatura ambiente per un'ora utilizzando diverse concentrazioni di anticorpo a parità di condizioni di pulizia.

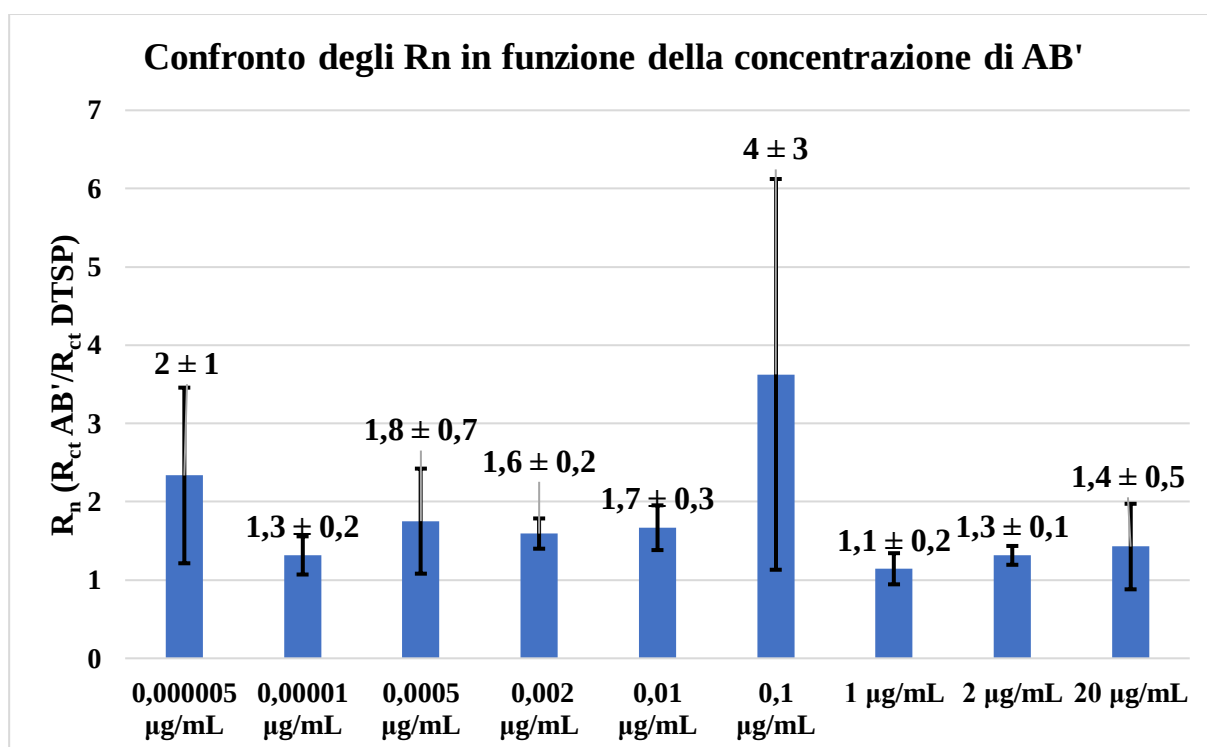


Figura 50 – Confronto dell'aumento di R_{ct} in base alla concentrazione di anticorpo

Nel calcolo della media sono stati rimossi i valori di $R_n < 1$ in quanto un tale valore indica che si è verificata una delaminazione della funzionalizzazione o comunque che l'anticorpo non si è legato, per cui non è utile per comprendere l'effetto della concentrazione sulla quantità che si attacca al cross-linker. In tutte le concentrazioni testate con questa modalità (1 h e temperatura ambiente), comunque, si sono osservati degli elettrodi con un calo di R_{ct} a seguito dell'attacco dell'anticorpo.

Nonostante le concentrazioni differenti, i valori di R_n sono molto simili tra loro: anche se le medie risultano un po' diverse, con le deviazioni standard rientrano nello stesso intervallo. Inoltre, quasi tutti i valori sono di poco superiori ad 1; rispetto al bianco riportato precedentemente, quindi, la quantità di anticorpo che si lega al cross-linker non è elevata.

In Figura 51 sono riportate le R_{ct} dell'anticorpo incubato per 2 h a 37 °C a concentrazione di 1 e 20 $\mu\text{g/mL}$ confrontate con quelle ottenute alla stessa concentrazione per 1 h a temperatura ambiente, utilizzando 4 elettrodi per ogni variabile. Non è riportato R_n in confronto al cross-linker in quanto non è stata determinata R_{ct} in questo step per evitare di delaminare la funzionalizzazione.

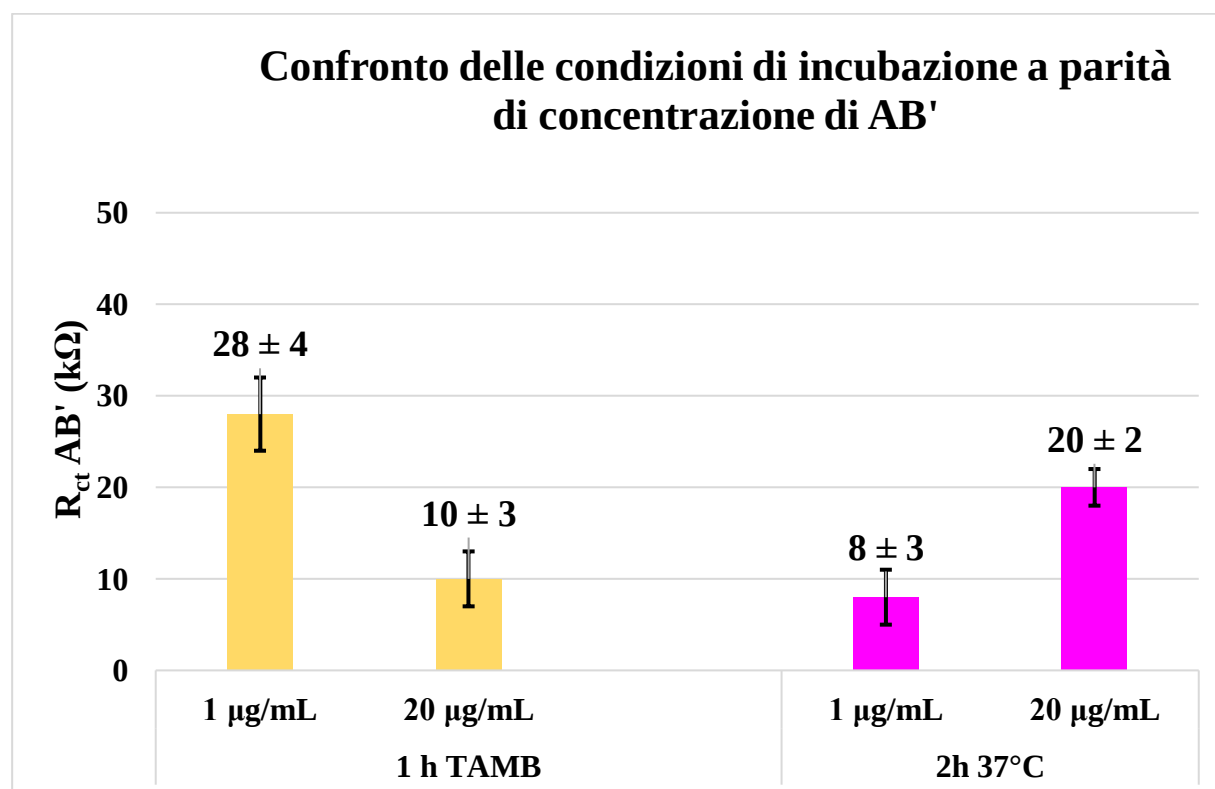


Figura 51 – Effetto delle condizioni di incubazioni

A parità di concentrazione e di condizioni di reazioni con il cross-linker si può evidenziare una resistenza maggiore per l'anticorpo più concentrato e l'aumento di tempo di incubazione e di temperatura hanno un effetto positivo in questo senso.

Caratterizzazione con CV

In Figura 52A è riportato il confronto delle CV dell'elettrodo funzionalizzato con la DTSP e quella dell'elettrodo dopo incubazione in anticorpo per 2 h a 37 °C. Le analisi EIS di quest'ultimo sono riportate in Figura 52B.

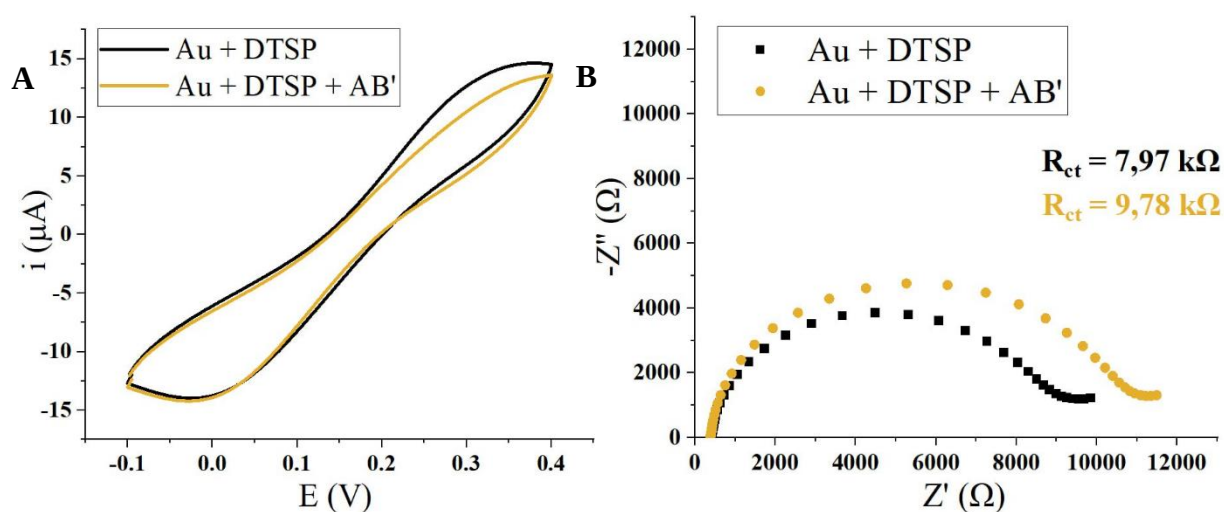


Figura 52. A – CV prima e dopo incubazione in AB'. B - Misura EIS prima e dopo incubazione in AB'

Dalla riduzione dell'intensità dei picchi redox si evidenzia che l'anticorpo si lega alla DTSP.

4.3.3 – Confronto tra i due anticorpi

Infine, in Figura 53 sono riportate le differenze di R_{ct} a parità di concentrazione (20 $\mu\text{g/mL}$), condizioni di incubazione (2 h a 37 °C) e cross-linker (DTSP), oltre che di condizioni di pulizia. Per ognuno dei due anticorpi è stato utilizzato un batch di nove elettrodi.

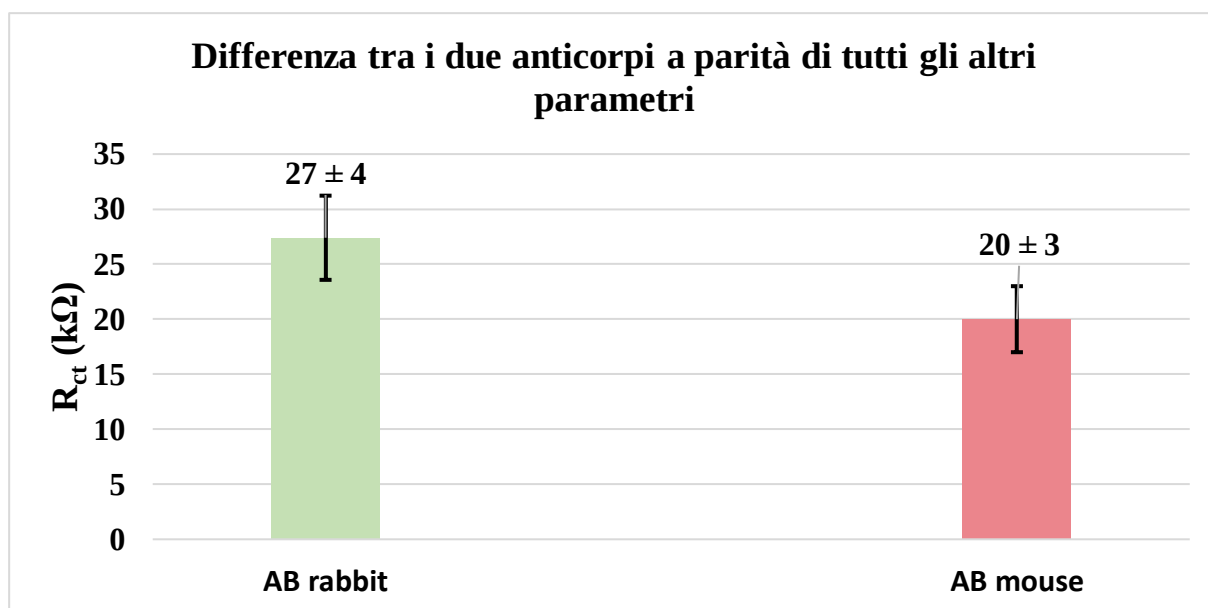


Figura 53 – Differenze di R_{ct} tra gli anticorpi nelle stesse condizioni

Se ne ricava che i valori sono molto simili tra loro: quello da coniglio sembra essere leggermente migliore, probabilmente anche per il fatto che è stato acquistato nuovo e, quindi, è stato conservato per meno tempo. Si può dedurre che non c'è una differenza sostanziale sulla quantità di anticorpo che si lega al cross-linker variando solo la tipologia di anticorpo utilizzato. Anche R_n rispetto all'elettrodo d'oro è analogo tra i due anticorpi, in quanto il punto di partenza è abbastanza simile grazie alla pulizia ottimizzata.

4.4 – Lavaggio in BSA

È riportata in seguito la caratterizzazione dello step del lavaggio in BSA utilizzando l'analisi EIS e la CV. I risultati riportati in seguito sono riferiti all'utilizzo di DTSP come cross-linker e anticorpo anti-cortisolo da topo che sono stati quelli più utilizzati.

4.4.1 – Caratterizzazione con analisi EIS

In Figura 54 sono riportati i valori di R_n dello step con BSA rispetto allo step con AB' (R_{ct} BSA/ R_{ct} AB') variando i tempi e le concentrazioni di BSA indicate in percentuali massa/volume. Le funzionalizzazioni sono state effettuate mantenendo costanti tutte le altre condizioni: DTSP come cross-linker, AB' 20 µg/mL per 2 h a 37 °C e incubazione in BSA a 37 °C.

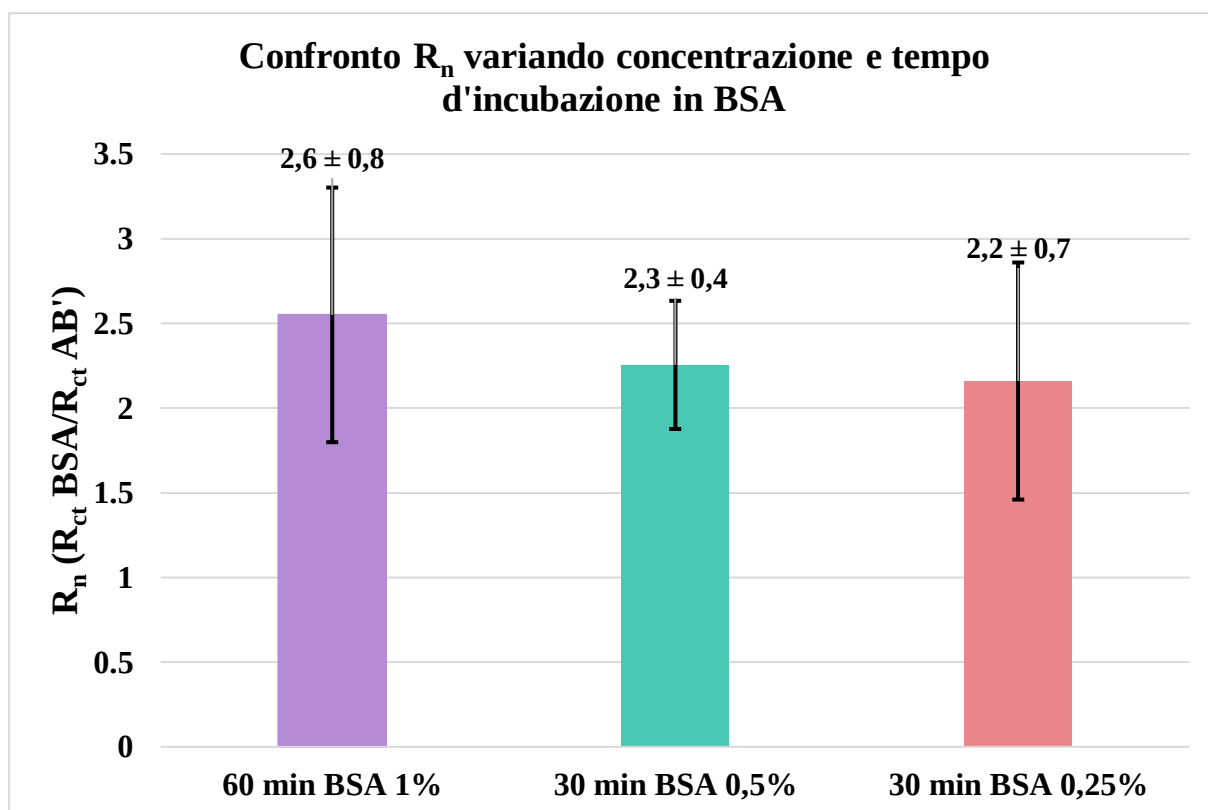


Figura 54 – Confronto dei valori di R_n ottenuti variando le modalità di lavaggio in BSA

I valori ottenuti sono statisticamente analoghi tra loro: il primo ha una deviazione standard maggiore in quanto si hanno molte più misure a disposizione con questo metodo. Dato che la BSA serve a saturare il cross-linker non attaccato dall'anticorpo, l'incubazione in questa a concentrazione 0,25% m/v per 30 minuti è, probabilmente, già sufficiente per saturare la DTSP.

I valori di R_n ottenuti sono, comunque, molto elevati: ciò significa che rimangono molti siti liberi del cross-linker, e quindi si lega poco anticorpo nello step precedente, soprattutto considerando che l'anticorpo è di dimensioni maggiori e, quindi, a parità di siti legati dovrebbe aumentare in modo più marcato il valore di R_{ct} .

4.4.2 – Caratterizzazione con CV

In Figura 55 sono riportate in confronto le CV dello step in BSA per tutte le concentrazioni e tempi differenti utilizzati. Queste sono, inoltre, confrontate con la CV dello step precedente, cioè quella dopo l'incubazione in anticorpo.

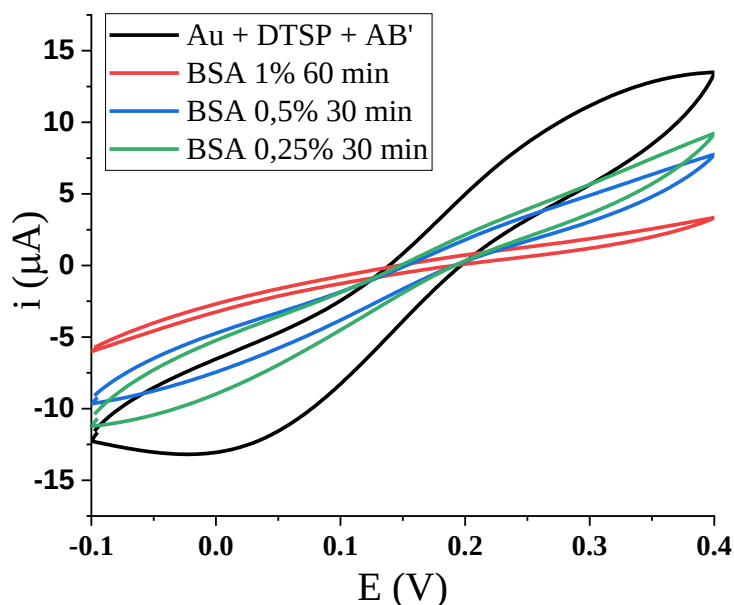


Figura 55 – Confronto delle CV in base alla concentrazione di BSA

Risulta evidente che questo step è quello che maggiormente aumenta la resistenza al trasferimento di carica, portando alla quasi completa scomparsa dei picchi redox caratteristici del ferro. Questo può rappresentare uno svantaggio in quanto la funzionalizzazione dell'elettrodo rende quest'ultimo troppo resistivo se troppo spessa, per cui per lo step successivo, cioè l'attacco del cortisolo all'anticorpo, un aumento della R_{ct} potrebbe non venire distinto sufficientemente, o comunque risultare in un R_n molto basso. Ciò si può osservare meglio in Figura 56, dove sono riportate a confronto tutte le CV di funzionalizzazione dell'elettrodo.

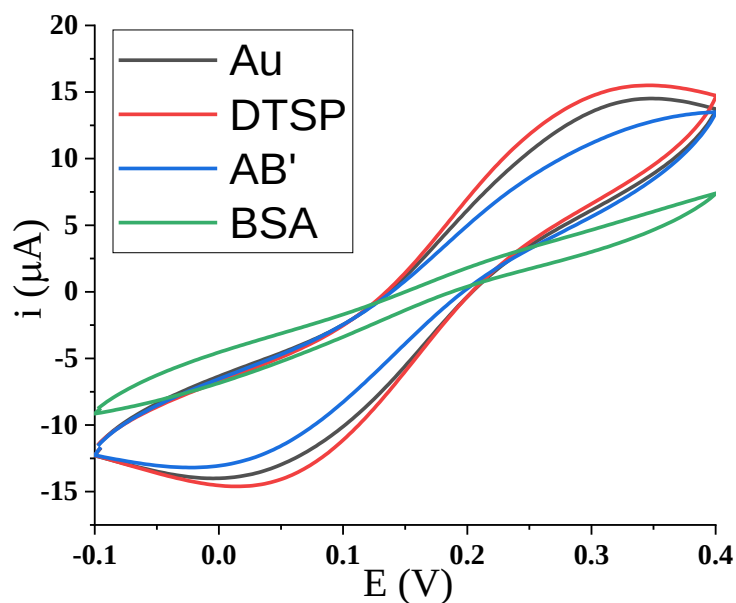


Figura 56 – CV di funzionalizzazione a confronto

4.5 – Caratterizzazione dell'anticorpo con fluorescenza

In seguito, si riportano i dati ottenuti da analisi con microscopio a fluorescenza utilizzando un anticorpo secondario marcato, sia utilizzando la nitrocellulosa come substrato, sia sugli elettrodi veri e propri. Tali test, condotti mediante una tecnica indipendente, sono stati utili al fine di validare ulteriormente la metodologia di funzionalizzazione sin qui impiegata.

4.5.1 – Test su nitrocellulosa

In Figura 57 sono riportati alcuni esempi di acquisizioni di immagini con microscopio a fluorescenza dell'anticorpo primario incubato in anticorpo secondario marcato per fluorescenza. Per i test su nitrocellulosa si sono utilizzati l'ingrandimento 4x e come tempi di acquisizione 5, 50 e 100 ms. È necessario, infatti, utilizzare tempi di acquisizione sufficientemente lunghi per acquisire bene l'immagine, ma non abbastanza da andare a saturazione di questa e non distinguere le diverse intensità di emissione. Per cui, per gli spot di anticorpo primario più diluiti si è utilizzato un tempo di acquisizione più lungo e viceversa per gli spot più concentrati.

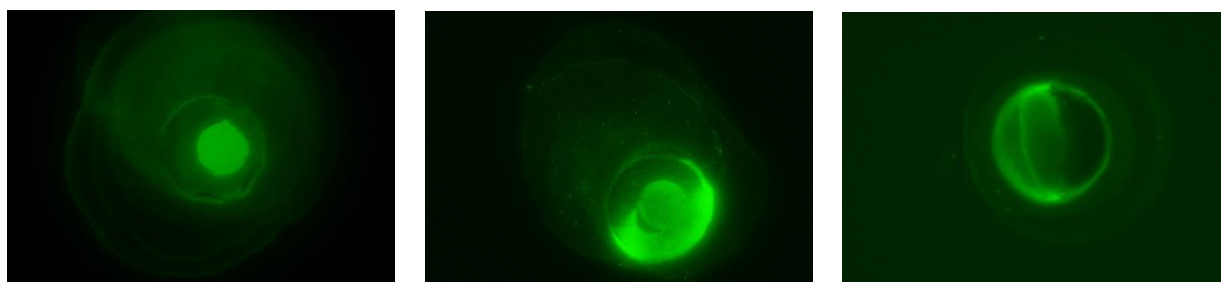


Figura 57 – Esempi di acquisizioni con microscopio a fluorescenza su spot in nitrocellulosa

Successivamente sono riportate, in Figura 58, le intensità di emissione della fluorescenza (intensity density) determinate per i diversi spot variando le quantità di spot dell'anticorpo primario (da 10, 100 e 500 ng) e le concentrazioni di anticorpo secondario (diluizioni di 300, 600 e 1000 volte dallo stock a concentrazione 2 mg/mL).

Si puntualizza che i valori di intensità ottenuti utilizzando ImageJ sono valori semiquantitativi; risulta difficile, infatti, selezionare un'area omogenea in quanto anche il teflon degli elettrodi bulk emette ed anche in nitrocellulosa si osserva una diffusione della macchia dallo spot effettuato con la micropipetta. In più, in generale, non si ottengono mai intensità di emissione omogenee in tutta la superficie. Tuttavia, questo metodo può fornire un ordine di grandezza dell'emissione per riuscire a confrontare le diverse concentrazioni dei due anticorpi. In Figura 58 sono riportate le emissioni determinate variando le quantità di spot dell'anticorpo primario

(primo numero indicato in legenda) e le diluizioni di AB'' (secondo numero), entrambi in ordine dal più diluito al più concentrato, e variando i tempi di acquisizione.

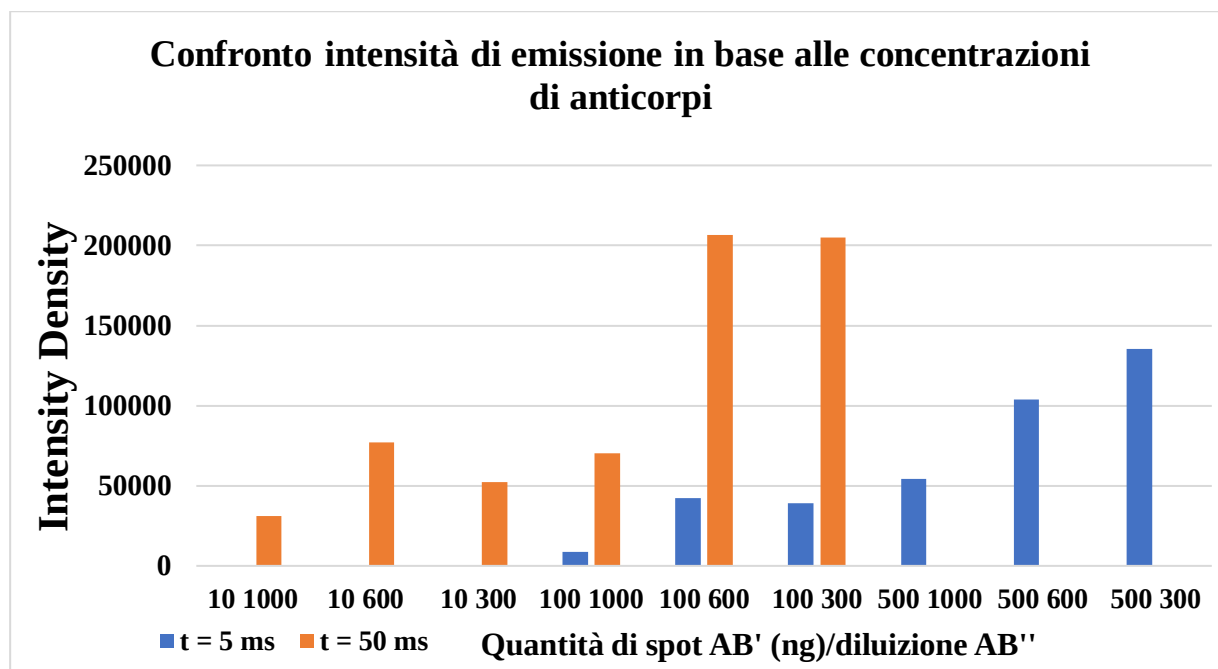


Figura 58 - Confronto intensità di fluorescenza variando le concentrazioni di anticorpi

Come atteso l'intensità di emissione aumenta al crescere della quantità di anticorpo primario mentre per l'anticorpo secondario non si notano differenze sostanziali tra la diluizione di 300 e 600 volte dallo stock: è, quindi, probabile che già con l'aliquota più diluita l'anticorpo primario è stato saturato dal secondario. Per questo motivo nei test su elettrodi è stata utilizzata la diluizione di 600 volte dallo stock.

4.5.2 – Test su elettrodi d'oro bulk

Le considerazioni effettuate per i test su nitrocellulosa sono valide anche per l'uso di elettrodi bulk, per cui si sono utilizzati diverse concentrazioni di anticorpo primario e diversi tempi di acquisizione. Inoltre, le superfici sono state visualizzate anche con ingrandimento 10x. Rispettivamente in Figura 59A e B sono riportate le immagini acquisite con tempo di 500 ms per uno stesso elettrodo con ingrandimenti 4x e 10x mentre in Figura 59C l'immagine di un elettrodo non funzionalizzato con l'anticorpo ma lasciato in incubazione in PBS al suo posto, per avere un bianco di confronto.

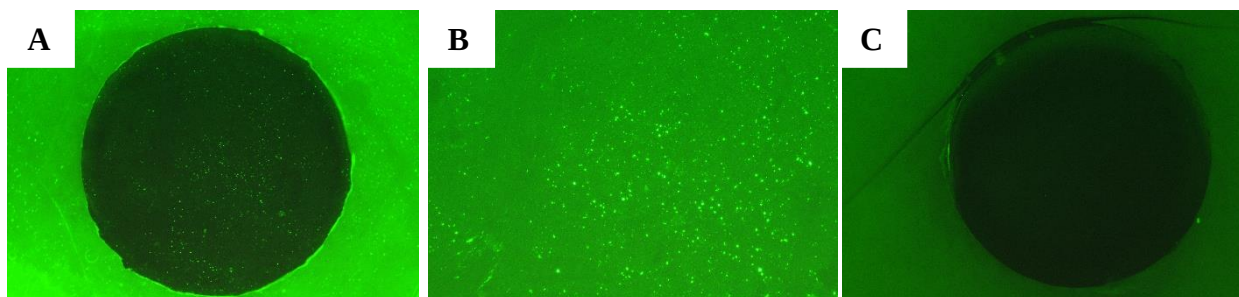


Figura 59 – Acquisizioni con microscopio a fluorescenza di elettrodi d'oro funzionalizzati con:
A – ingrandimento 4x. B – ingrandimento 10x C – ingrandimento 4x senza AB'

Si nota che il teflon ha una forte emissione alla lunghezza d'onda d'emissione dell'anticorpo secondario. In più, confrontando l'emissione del teflon con quella nel bianco (Figura C) si nota un'emissione più intensa negli elettrodi funzionalizzati, per cui è possibile che durante l'incubazione dell'anticorpo primario questo si leghi anche al teflon. Osservando la superficie dell'elettrodo funzionalizzato, che è quello a concentrazione maggiore di 20 $\mu\text{g/mL}$, si evidenzia che, comunque, la superficie non è del tutto omogenea.

In Figura 60 sono riportate le intensità di emissione di elettrodi funzionalizzati con anticorpo secondario (diluizione di 600 volte dallo stock) variando il tempo di incubazione in AB'' (1 e 2 h) e le concentrazioni di anticorpo primario: in particolare un bianco, cioè senza anticorpo, 1, 2 e 20 $\mu\text{g/mL}$.

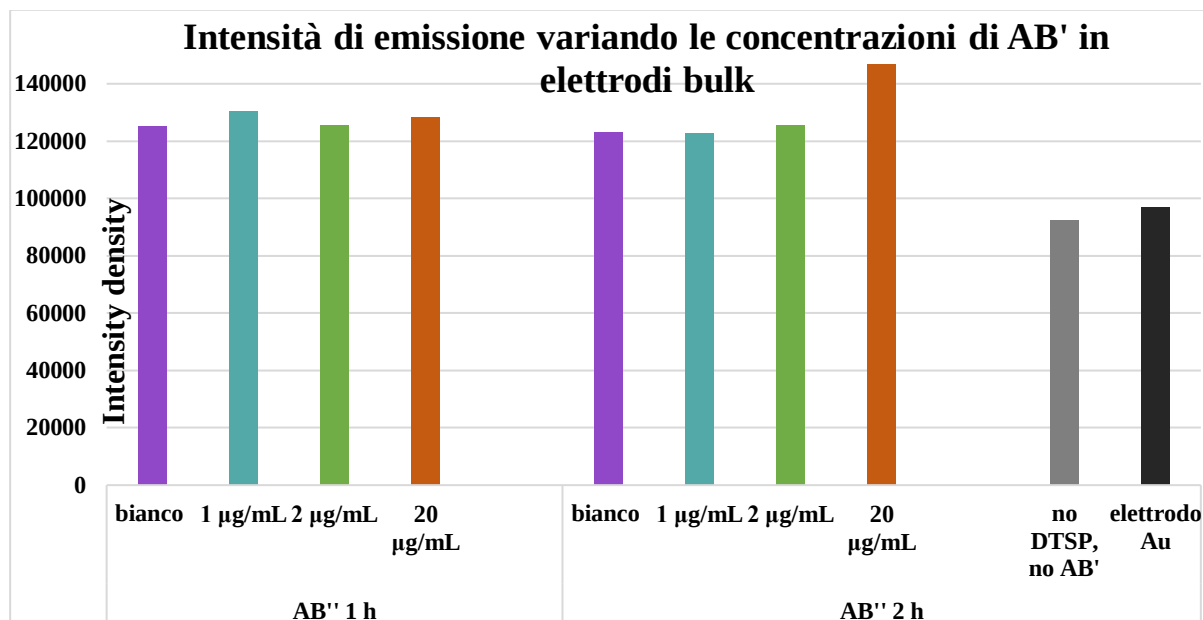


Figura 60 – Intensità di emissione per elettrodi bulk a varie concentrazioni di AB'

Le ultime due colonne rappresentano dei bianchi rispetto al cross-linker: in grigio è rappresentata l'intensità di emissione di un elettrodo lasciato in acetone invece che messo in

reazione con il cross-linker e incubato in PBS invece che in anticorpo primario. L'ultima colonna in nero, invece, rappresenta quella di un elettrodo d'oro pulito senza nessun trattamento.

Si evidenzia che, in confronto all'elettrodo d'oro pulito, le intensità di emissione sono maggiori, anche per il bianco: è, quindi, probabile che si abbia anche dell'emissione di aspecifico, che può legarsi al cross-linker e a cui poi si lega l'anticorpo secondario marcato.

Rispetto al bianco si può notare una maggiore intensità per l'elettrodo funzionalizzato con anticorpo primario a concentrazione di 20 $\mu\text{g/mL}$ e incubato in anticorpo secondario per due ore. Inoltre, tra le immagini acquisite, questa concentrazione è quella che ha mostrato una maggiore omogeneità dell'anticorpo primario sulla superficie dell'elettrodo.

I dati di fluorescenza sono stati confermati dalle analisi EIS: gli stessi elettrodi riportati nella figura precedente sono stati utilizzati per la misura d'impedenza. Questa è riportata in Figura 61 per gli elettrodi incubati in AB'' per 2 h, dove sono indicati anche i valori di R_{ct} e le resistenze normalizzate dell'anticorpo primario rispetto al cross-linker ($R_{ct} \text{ AB}'/R_{ct} \text{ DTSP}$).

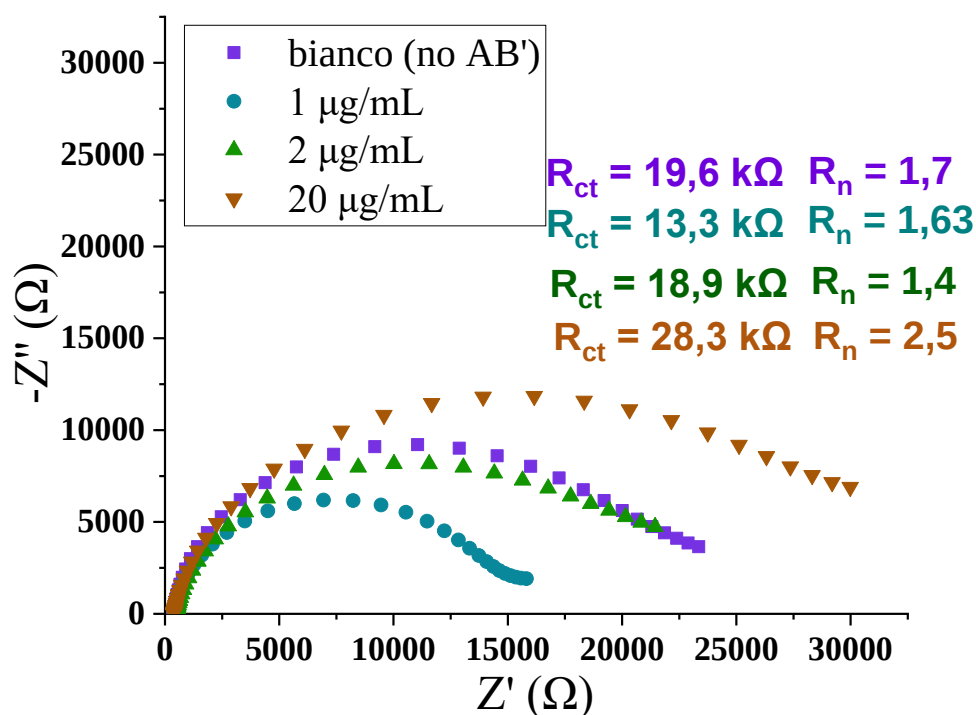


Figura 61 – Misure EIS a diversa concentrazione di anticorpo rispetto alle misure di fluorescenza

Si visualizza che le R_{ct} del bianco e dell'anticorpo a 2 $\mu\text{g/mL}$ sono molto simili, analogamente a quanto mostrato nelle misure di fluorescenza. Quella dell'anticorpo a 1 $\mu\text{g/mL}$ risulta più

bassa, ma R_n è simile in quanto la resistenza con il cross-linker era già più bassa. Invece, per l'anticorpo a 20 $\mu\text{g/mL}$ si osserva sia un valore più alto in R_{ct} che in R_n ; anche in questo caso viene confermata la misura in fluorescenza dove l'intensità di emissione risultava maggiore.

4.6 – Conservazione dell'elettrodo funzionalizzato overnight

Per verificare la stabilità della funzionalizzazione durante una conservazione dell'elettrodo a bagno in PBS overnight, è stata effettuata sia un'analisi EIS, sia una CV dell'elettrodo subito dopo la funzionalizzazione con BSA e il giorno dopo conservandolo in frigorifero. In Figura 62A e B sono riportate rispettivamente queste analisi a confronto:

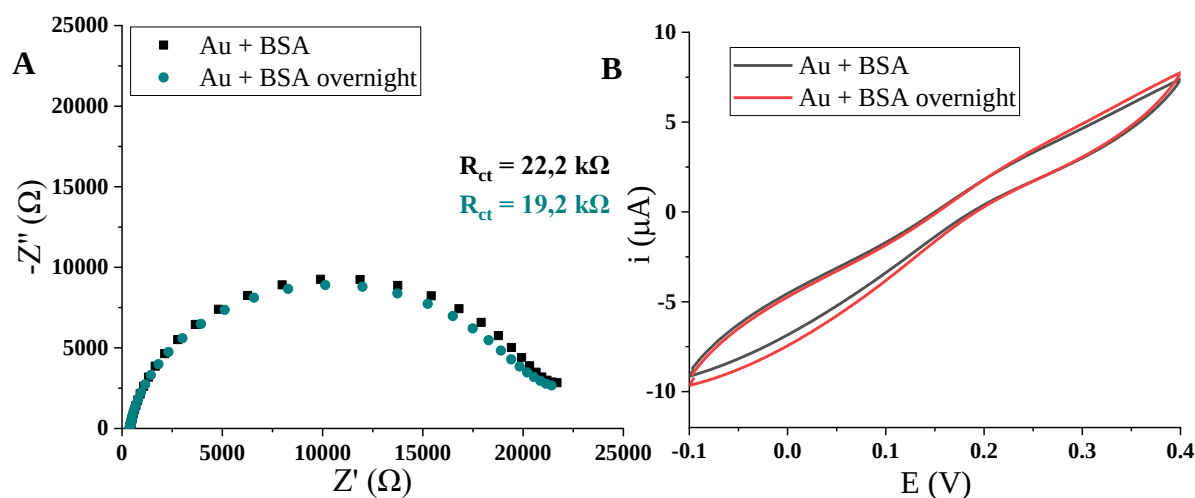


Figura 62 – Effetto della conservazione overnight su A- misura EIS. B – CV

Dall'impedenza si evince che il valore di R_{ct} cala leggermente; quindi, una minima parte della funzionalizzazione si distacca. Ciò viene confermato dalle CV, dalle quali si evince che la superficie d'oro è lievemente più esposta. Tuttavia, si evidenzia che non si possono notare picchi redox in entrambi i casi, per cui la funzionalizzazione sull'elettrodo è ancora presente e questo può essere conservato overnight con tale modalità.

4.7 – Incubazione in cortisolo e caratterizzazione del biosensore

In questo capitolo sono riportati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dell'ultimo step: l'incubazione in soluzioni di cortisolo a concentrazioni note per valutare la capacità di legarlo. Si sono utilizzati due metodi differenti per la caratterizzazione: incubando lo stesso elettrodo funzionalizzato in soluzioni di cortisolo a concentrazione crescente, o incubando ogni elettrodo in una sola soluzione di cortisolo a concentrazione nota per valutare il valore di R_n .

4.7.1 – Incubazione dell’elettrodo funzionalizzato in soluzioni a concentrazione crescente di cortisolo

Caratterizzazione EIS

In Figura 63 sono riportati degli esempi di grafici ottenuti con misura d’impedenza utilizzando i due diversi anticorpi a parità di condizioni di cross-linker (DTSP), tempo di incubazione in AB’ (2 h a 37 °C), e di saturazione in BSA (1% per 1 h a 37 °C). Nello specifico, in Figura A è riportato l’anticorpo da coniglio a concentrazione 20 µg/mL, mentre in Figura B l’anticorpo da topo 10 µg/mL.

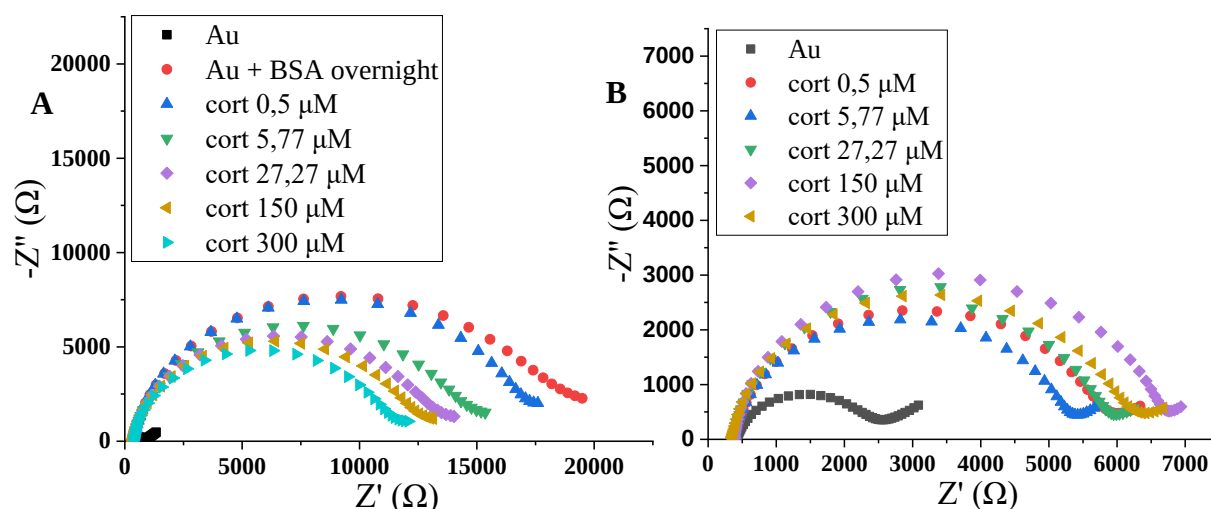


Figura 63 – Misure EIS con incubazione a concentrazioni crescenti di cortisolo con:
A – AB’ da coniglio. B – AB’ da topo

In Tabella 6 sono riportati i valori di R_{ct} delle curve in Figura 63:

Tabella 6 – Valori di R_{ct} per i test a concentrazione crescente di cortisolo

	R_{ct} BSA (kΩ)	R_{ct} cort 0,5 µM (kΩ)	R_{ct} cort 5,77 µM (kΩ)	R_{ct} cort 27,27 µM (kΩ)	R_{ct} cort 150 µM (kΩ)	R_{ct} cort 300 µM (kΩ)
AB’ da coniglio	17,1	16,0	13,5	12,3	11,6	10,6
AB’ da topo		5,28	4,78	5,35	6,13	5,68

Si evidenzia che per entrambe le tipologie di anticorpo con questa modalità di utilizzo del sensore la resistenza al trasferimento di carica diminuisce ad ogni incubazione, o comunque aumenta leggermente, ma non abbastanza da poterlo attribuire all’immobilizzazione del cortisolo da parte dell’anticorpo. Ciò significa che i lavaggi del sensore portano ad una delaminazione della funzionalizzazione più di quanto l’anticorpo riesca a legare il cortisolo.

Inoltre, il fatto che già dalla prima incubazione R_{ct} diminuisca, rispetto alla funzionalizzazione con BSA, esclude l'eventualità che la concentrazione di cortisolo $0,5 \mu\text{M}$ possa saturare l'anticorpo presente sull'elettrodo.

Per quanto riguarda l'utilizzo dell'anticorpo da coniglio, questo è stato l'unico batch testato in questo modo, per cui i dati non sono sufficienti a trarre altre conclusioni, mentre per l'anticorpo da topo si è sempre osservato questo trend in tutti i batch in cui il sensore è stato caratterizzato con questa modalità.

In Figura 64 è riportato il confronto tra le misure di CV dopo l'incubazione nelle soluzioni di cortisolo a diverse concentrazioni:

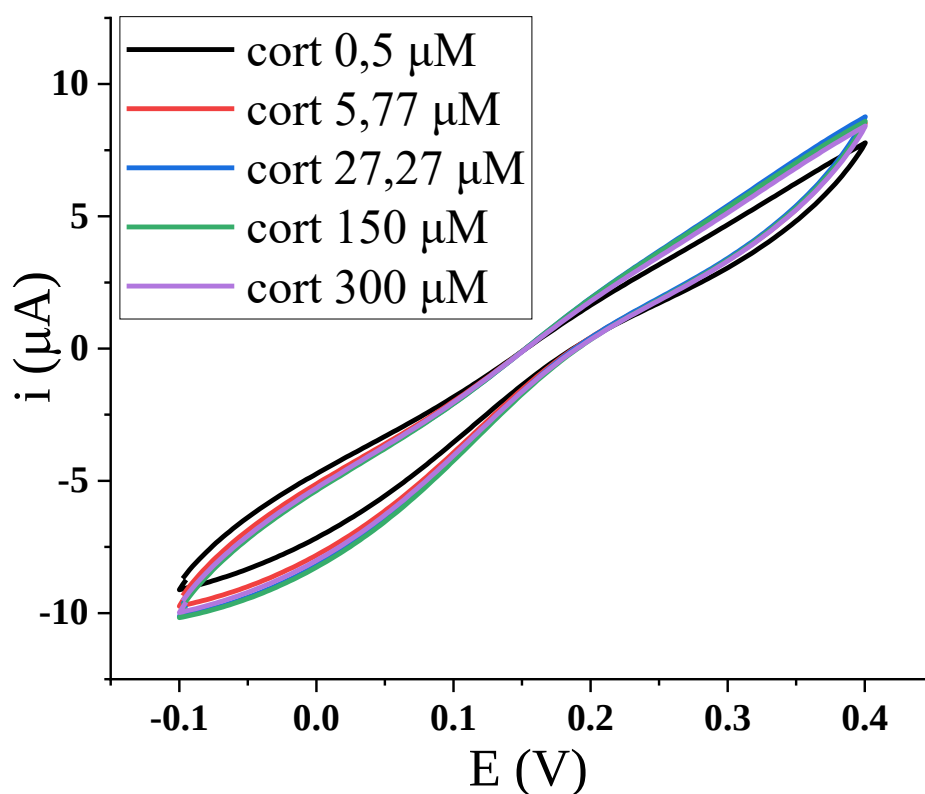


Figura 64 – Confronto di CV dopo incubazioni in cortisolo a concentrazioni crescenti

Analogamente ai risultati ottenuti dalle misure EIS, anche i voltammogrammi suggeriscono che la superficie dell'elettrodo potrebbe essere progressivamente più esposta a seguito delle incubazioni a concentrazione crescente. Inoltre, dopo l'incubazione in alcune soluzioni (in Figura da $5,77 \mu\text{M}$) si osserva un aumento della pendenza dei voltammogrammi in quanto legando il cortisolo l'elettrodo diventa più resistivo, nonostante la R_{ct} misurata con EIS non sempre aumenta tra un'incubazione e l'altra, come mostrato precedentemente in Figura 63.

4.7.2 – Incubazione dell'elettrodo funzionalizzato in una sola soluzione di cortisolo

Con questo approccio ogni elettrodo è stato incubato in una sola soluzione di cortisolo a concentrazione nota ed è stato valutato il valore di resistenza normalizzata facendo il rapporto tra R_{ct} a seguito dell'immobilizzazione del cortisolo e quella precedente con BSA. In Figura 65 è riportato un esempio di misura EIS su un batch di elettrodi funzionalizzati con AB' da topo, in cui tre elettrodi sono stati incubati in cortisolo 0,01 nM e altri tre in cortisolo 200 μ M. In più un elettrodo è stato utilizzato come bianco, cioè, è stato incubato in cortisolo 0,01 nM ma senza essere incubato in anticorpo.

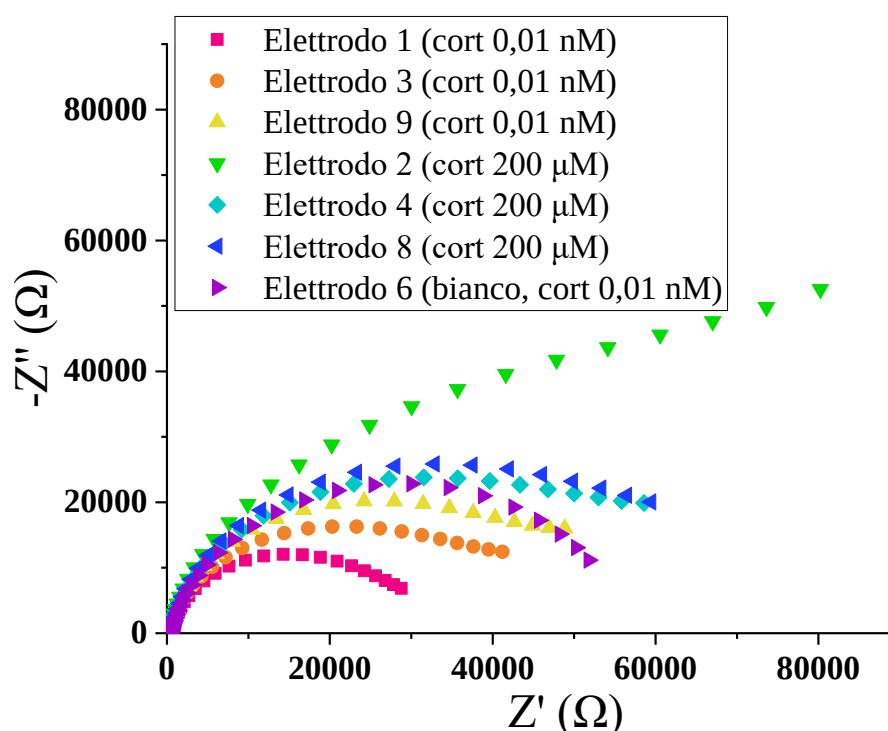


Figura 65 – Misure EIS per incubazione a diverse concentrazioni di cortisolo

In Tabella 7 sono riportati i valori di R_{ct} e R_n relativi alle misure sopra riportate:

Tabella 7 – Valori di R_{ct} e R_n per elettrodi incubati in cortisolo a diversa concentrazione

	Elettrodo	R_{ct} (k Ω)	R_n (R_{ct} cort/ R_{ct} BSA)	R_n medio
	6 (bianco, cort 0,01 nM)	56,4	0,99	0,99
Incubazione in cortisolo 0,01 nM	1	24,7	1,06	1,1 $\pm$ 0,1
	3	38,9	1,09	
	9	48,9	1,19	
Incubazione in cortisolo 200 μ M	2	106	2,40	1,9 $\pm$ 0,4
	4	61,1	1,75	
	8	62,3	1,65	

Da questa analisi si evince che è possibile utilizzare questo metodo di funzionalizzazione per l'utilizzo del biosensore: infatti, si può notare sia una resistenza al trasferimento di carica maggiore sia una R_n più elevata per gli elettrodi incubati a concentrazioni maggiori di cortisolo. Questa differenza di R_n può, di fatto, essere attribuita solo all'immobilizzazione del cortisolo da parte dell'anticorpo. Si evidenzia, infatti, che gli elettrodi incubati in cortisolo molto diluito (0,01 nM) sono risultati in un R_n quasi analogo al bianco, in cui il cortisolo non può essere stato immobilizzato, data la mancanza di anticorpo nella funzionalizzazione. Tuttavia, nei batch successivi mantenendo questa modalità di funzionalizzazione si è ottenuta una diminuzione R_{ct} a seguito dell'incubazione in anticorpo, come nei sensori utilizzati con l'altra metodologia.

4.8 – Cambio di forza ionica

In ultima analisi, è stata valutata la variazione della forza ionica della soluzione per la misura EIS: mantenendo la sonda redox Fe^{2+}/Fe^{3+} ad una concentrazione 5 mM, si è utilizzato PBS 0,1 M a pH 7,4. In Figura 66 è riportato il confronto delle misure EIS e CV utilizzando BSA 0,25% in PBS 10 mM per 30 minuti utilizzando la sonda redox in PBS 10 mM e 0,1 M rispetto all'elettrodo d'oro.

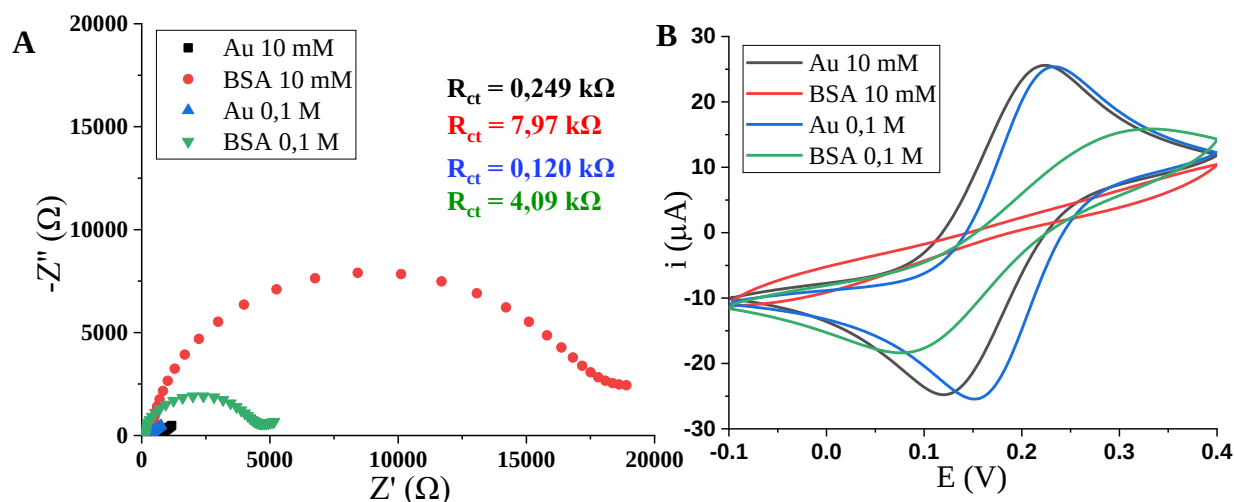


Figura 66 – Effetto della variazione di forza ionica su: A – misure EIS. B – CV

L'aumento della concentrazione di elettrolita porta ad una maggiore conducibilità della soluzione e, quindi, ad una minore resistenza (R_s). Ciò comporta anche una diminuzione di R_{ct} e influenza la CV portando ad una miglior definizione dei picchi avvicinandosi ad una situazione ideale di reversibilità della sonda redox, e quindi ad una diminuzione del ΔE tra l'ossidazione e la riduzione. Nonostante i picchi dell'oro siano uguali tra loro, l'aumento di forza ionica porta anche ad una maggiore intensità dei picchi. Ciò si osserva particolarmente

dal primo step di funzionalizzazione e si può notare in Figura 66 dall'ultimo step con la saturazione dei siti da parte della BSA. Si evidenzia, soprattutto, come il picco non sia del tutto schiacciato, cosa che invece avviene con l'utilizzo di PBS 10 mM.

In Tabella 8 sono riportati i valori medi di R_n e R_{ct} variando la forza ionica della soluzione e utilizzando BSA 0,25% con immersione degli elettrodi, o BSA 0,5% mediante drop casting di 30 μ L sulla superficie dell'elettrodo, entrambe a 37 °C per 30 minuti.

Tabella 8 – Valori di R_{ct} e R_n variando la forza ionica della sonda redox

	R_{ct} Au ($k\Omega$)	R_{ct} DTSP ($k\Omega$)	R_{ct} AB ($k\Omega$)	R_{ct} BSA ($k\Omega$)
PBS 10 mM	$0,4 \pm 0,2$	9 ± 3	9 ± 3	17 ± 3 (drop casting 0,5%) $15,4 \pm 1,2$ (immersione 0,25%)
PBS 0,1 M	$0,20 \pm 0,07$	$2,2 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,5$ (drop casting 0,5%) $3,6 \pm 0,7$ (immersione 0,25%)
		R_n DTSP/Au	R_n AB/DTSP	R_n BSA/AB
PBS 10 mM		30 ± 21	$1,1 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$ (drop casting) $2,2 \pm 0,7$ (immersione)
PBS 0,1 M		12 ± 6	$1,1 \pm 0,2$	$1,08 \pm 0,05$ (drop casting) $1,2 \pm 0,1$ (immersione)

Analogamente a quanto riportato nelle figure, si può osservare un'importante diminuzione dei valori di R_{ct} nell'utilizzo di PBS 0,1 M; inoltre ciò comporta anche una minore deviazione standard nell'utilizzo di una forza ionica maggiore.

.

5 – CONCLUSIONI

È stato reso evidente il ruolo fondamentale dell'ottimizzazione dei vari step di funzionalizzazione, in quanto ogni singolo parametro può influenzare in modo decisivo le prestazioni finali del sensore. È stato dimostrato che, nonostante manchi ancora di riproducibilità, è possibile fabbricare un immunosensore per la determinazione del cortisolo nei fluidi biologici utilizzando la modalità di funzionalizzazione riportata e la spettroscopia d'impedenza (EIS) come tecnica elettrochimica.

In conclusione, per quanto riguarda l'ottimizzazione degli step di funzionalizzazione, si può affermare quanto segue:

- Il tipo di substrato utilizzato (elettrodo bulk d'oro) è sicuramente il più adatto per l'ottimizzazione. In seguito, è conveniente utilizzare substrati miniaturizzati o SPE, che offrono diversi vantaggi, utilizzando la metodica ottimizzata. Per la pulizia degli elettrodi bulk, la combinazione migliore risulta in stripping dei legami Au-S, seguita da lavaggio in etanolo per 30 minuti, pulizia meccanica in allumina e sonicazione in acqua per circa 5 minuti. Per ultimo, si effettua il lavaggio in soluzione piranha per 10 minuti prima di procedere con la funzionalizzazione.
- La DTSP è migliore come cross-linker rispetto all'MPA e una reazione di riduzione di due ore, senza agitazione, è sufficiente per garantire l'attacco alla superficie d'oro dell'elettrodo creando dei monostrati auto-assemblati (SAM). Rimane comunque aperta la possibilità di utilizzare altri mercaptoacidi con una diversa lunghezza della catena alifatica, o anche miscele di questi, per favorire il legame con l'anticorpo diminuendo l'ingombro sterico.
- L'anticorpo utilizzato è indifferente: sia con quello ricavato da topo, che quello da coniglio, si ottengono risultati tra loro analoghi. È meglio utilizzare un'incubazione di due ore e a 37 °C, mentre per quanto riguarda la concentrazione ottimale è probabile che questa sia compresa tra 1 e 20 µg/mL. Nel primo caso, infatti, R_n prima e dopo l'attacco dell'anticorpo rimane circa 1, il che indica che poche molecole si attaccano al cross-linker. Nel secondo caso, invece, si ottiene uno strato più spesso e resistivo che rende l'elettrodo d'oro quasi del tutto indisponibile, appiattendolo i voltammogrammi.
- Nel caso di utilizzo di un anticorpo secondario, ad esempio per misure di fluorescenza o immunodosaggi, si può utilizzare un'incubazione di due ore a 37 °C con una

concentrazione di 3,33 $\mu\text{g/mL}$, che è sufficiente a saturare l'anticorpo primario. Per una superficie più omogenea in misure di fluorescenza è meglio utilizzare, invece, l'anticorpo primario a concentrazione di 20 $\mu\text{g/mL}$.

- La saturazione con la BSA è uno step fondamentale per l'utilizzo del sensore in fluidi biologici. Non si sono notate differenze tra l'incubazione in immersione o mediante drop-casting sulla superficie dell'elettrodo. In qualsiasi caso, l'utilizzo di BSA 0,25% m/v per 30 minuti e a 37 °C è sufficiente a saturare i siti del cross-linker rimasti liberi e non reagiti con l'anticorpo. Questo step è quello che maggiormente contribuisce all'aumento di R_{ct} durante la funzionalizzazione.
- La caratterizzazione del biosensore utilizzando una sola concentrazione di cortisolo per ogni elettrodo è sicuramente vantaggiosa per evitare continui lavaggi che vanno a delaminare la funzionalizzazione che rimane, comunque, abbastanza delicata. Questa modalità di lavoro, però, è intrinsecamente legata alla riproducibilità in quanto ogni elettrodo può essere diverso dagli altri, sia come natura dello stesso che per la funzionalizzazione che, anche se svolta contemporaneamente, non sarà identica per ognuno. Per minimizzare tali differenze, si può utilizzare la resistenza normalizzata. Il funzionamento del biosensore è stato dimostrato in un intervallo di concentrazione 0,01 nM – 200 μM .
- L'aumento della forza ionica della soluzione contenente la sonda redox può contribuire a ottenere valori di R_{ct} più bassi, rendendo la misura più sensibile ad eventuali aumenti al legame anticorpo-cortisolo.

Oltre all'ottimizzazione degli step di funzionalizzazione sopra riportati, è stata dimostrata l'opportunità di conservare l'immunosensore preparato per una notte in frigorifero lasciando del PBS sulla superficie mediante drop-casting e mantenendo l'ambiente umido per evitare che l'elettrodo rimanga a secco. Anche la possibilità di utilizzare la CV nella finestra di potenziale in cui è osservabile la reazione di ossidoriduzione della sonda redox, per la caratterizzazione dei vari step, è stata dimostrata in confronto alle misure EIS.

6 – BIBLIOGRAFIA

1. Weber, C. J., Clay, O. M., Lycan, R. E., Anderson, G. K. & Simoska, O. Advances in electrochemical biosensor design for the detection of the stress biomarker cortisol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 416 87–106 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00216-023-05047-1> (2024).
2. Syahira, A. *et al.* Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *J. Environ. Res. Public Health* 17, (2021).
3. Chan, S. & Debono, M. Review: Replication of cortisol circadian rhythm: New advances in hydrocortisone replacement therapy. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* vol. 1 129–138 Preprint at <https://doi.org/10.1177/2042018810380214> (2010).
4. Vignesh, V. *et al.* Advancements in Cortisol Detection: From Conventional Methods to Next-Generation Technologies for Enhanced Hormone Monitoring. *ACS Sensors* vol. 9 1666–1681 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c01912> (2024).
5. Aardal, E. & Holm, A.-C. Aardal and Holm: Cortisol in Saliva Cortisol in Saliva-Reference Ranges and Relation to Cortisol in Serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* vol. 33 (1995).
6. Iqbal, T., Elahi, A., Wijns, W. & Shahzad, A. Cortisol detection methods for stress monitoring in connected health. *Health Sciences Review* 6, 100079 (2023).
7. Arya, S. K., Chornokur, G., Venugopal, M. & Bhansali, S. Antibody functionalized interdigitated μ -electrode (ID μ E) based impedimetric cortisol biosensor. *Analyst* 135, 1941–1946 (2010).
8. Karuppaiah, G., Lee, M. H., Bhansali, S. & Manickam, P. Electrochemical sensors for cortisol detection: Principles, designs, fabrication, and characterisation. *Biosensors and Bioelectronics* vol. 239 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115600> (2023).
9. Kim, Y. J. *et al.* Stimulated Salivary Cortisol as a Noninvasive Diagnostic Tool for Adrenal Insufficiency. *Endocrinology and Metabolism* 35, 628–635 (2020).
10. Arya, S. K., Chornokur, G., Venugopal, M. & Bhansali, S. Antibody modified gold micro array electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol in saliva and ISF. in *Procedia Engineering* vol. 5 804–807 (Elsevier Ltd, 2010).
11. Zea, M. *et al.*) Overview of Electrochemical Techniques for Cortisol Detection Published in the Last Five Years. 2) Recent Advances in Cortisol Detection by Electrochemical Immunoassays. 3) Potential of Biosensing Techniques for Cortisol Detection in Biological Matrices. 4) Importance of Cortisol Quantification for Clinical Applications Electrochemical Sensors for Cortisol Detections: Almost There. (2020).

12. Ljubijankić, N. *et al.* DAILY FLUCTUATION OF CORTISOL IN THE SALIVA AND SERUM OF HEALTHY PERSONS NEVZETA LJUBIJANKIĆ ET AL.: DAILY FLUCTUATION OF CORTISOL IN THE SALIVA AND SERUM OF HEALTHY PERSONS. *BOSNIAN JOURNAL OF BASIC MEDICAL SCIENCES* vol. 8 (2008).
13. Sauvé, B., Koren, G., Walsh, G., Tokmakejian, S. & Van Uum, S. H. M. Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clinical and Investigative Medicine* 30, (2007).
14. Buckert, M., Schwieren, C., Kudielka, B. M. & Fiebach, C. J. Acute stress affects risk taking but not ambiguity aversion. *Front Neurosci* <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00082> (2014) doi:10.3389/fnins.2014.00082.
15. Stetler, C. A. & Guinn, V. Cumulative cortisol exposure increases during the academic term: Links to performance-related and social-evaluative stressors. *Psychoneuroendocrinology* 114, (2020).
16. Herriot, H., Wrosch, C., Hamm, J. M. & Pruessner, J. C. Stress-Related Trajectories of Diurnal Cortisol in Older Adulthood Over 12 Years. *Psychoneuroendocrinology* 121, (2020).
17. Casals, G. & Hanzu, F. A. Cortisol measurements in Cushing's syndrome: Immunoassay or mass spectrometry? *Ann Lab Med* 40, 285–296 (2020).
18. Sesay, A. M., Micheli, L., Tervo, P., Palleschi, G. & Virtanen, V. Development of a competitive immunoassay for the determination of cortisol in human saliva. *Anal Biochem* 434, 308–314 (2013).
19. Aydin, S. *et al.* An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. *Journal of International Medical Research* vol. 53 Preprint at <https://doi.org/10.1177/03000605251315913> (2025).
20. Zhang, Y. *et al.* Recent Advance in Cortisol Immunosensing Technologies and Devices. *Chemosensors* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020090> (2023).
21. Sakamoto, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* vol. 72 32–42 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z> (2018).
22. Ashton, R., Rizwan, M. & Gwenin, C. Development of low-cost impedimetric biosensors for the quantitative detection of cortisol and the human growth hormone. *Sensors and Actuators Reports* 9, (2025).
23. Lewis, J. G. & Elder, P. A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma cortisol. *J Steroid Biochem* 22, 673–676 (1985).

24. Aydin, S. *et al.* An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. *Journal of International Medical Research* vol. 53 Preprint at <https://doi.org/10.1177/03000605251315913> (2025).
25. *ELISA Basics Guide*.
26. Kim, Y., Yang, J., Hur, H., Oh, S. & Lee, H. H. Highly sensitive colorimetric assay of cortisol using cortisol antibody and aptamer sandwich assay. *Biosensors (Basel)* 11, (2021).
27. Ran, J., Luo, D. & Liu, B. A dual-mode biosensor for salivary cortisol with antibody-aptamer sandwich pattern and enzyme catalytic amplification. *Journal of Solid State Electrochemistry* 27, 399–408 (2023).
28. Kobayashi, Y., Tsubota, N., Miyai, K. & Watanabe, F. *FLUORESCENCE QUENCHING IMMUNOASSAY OF SERUM CORTISOL*.
29. Kobayashi, Y., Amitani, K., Watanabe, F. & Miyai, K. *FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY FOR CORTISOL*. *Clinica Chimica Acta* vol. 92 (1979).
30. Nasir, M. S. & Jolley, M. E. Fluorescence Polarization: An Analytical Tool for Immunoassay and_ Drug Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 2, 177–190 (2022).
31. Johannsen, B. *et al.* One-step, wash-free, bead-based immunoassay employing bound-free phase detection. *Anal Chim Acta* 1153, (2021).
32. Radha, R., Shahzadi, S. K. & Al-Sayah, M. H. Fluorescent immunoassays for detection and quantification of cardiac troponin i: A short review. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26164812> (2021).
33. Betterle, C. & Zanchetta, R. The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases. *Autoimmunity Highlights* vol. 3 67–78 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13317-012-0034-3> (2012).
34. Zha, C. *et al.* Indirect signal amplification strategy with a universal probe-based lateral flow immunoassay for the rapid quantitative detection of fumonisin B1. *Analytical Methods* 14, 708–716 (2022).
35. Riegger, L. *et al.* Read-out concepts for multiplexed bead-based fluorescence immunoassays on centrifugal microfluidic platforms. *Sens Actuators A Phys* 126, 455–462 (2006).
36. Yuan, J., Wang, E. & Fox, B. A. Immune Monitoring Technology Primer: Protein microarray ('seromics'). *J Immunother Cancer* 4, (2016).

37. Karachaliou, C. E. *et al.* Cortisol Immunosensors: A Literature Review. *Biosensors* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/bios13020285> (2023).
38. Taylor, R. L., Machacek, D. & Singh, R. J. *Validation of a High-Throughput Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Urinary Cortisol and Cortisone*. <https://academic.oup.com/clinchem/article/48/9/1511/5642342> (2002).
39. Turpeinen, U., Markkanen, H., Vä Limä Ki, M. & Stenman, U.-H. *Determination of Urinary Free Cortisol by HPLC*. <https://academic.oup.com/clinchem/article/43/8/1386/5640937>.
40. De Palo, E. F., Antonelli, G., Benetazzo, A., Prearo, M. & Gatti, R. Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clinica Chimica Acta* 405, 60–65 (2009).
41. De Palo, E. F., Antonelli, G., Benetazzo, A., Prearo, M. & Gatti, R. Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clinica Chimica Acta* 405, 60–65 (2009).
42. Kataoka, H., Matsuura, E. & Mitani, K. Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 44, 160–165 (2007).
43. Casals, G. *et al.* LC-HRMS and GC-MS Profiling of Urine Free Cortisol, Cortisone, 6B-, and 18-Hydroxycortisol for the Evaluation of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Disorders. *Biomolecules* 14, (2024).
44. Smutok, O. , & K. E. In memory of Leland Charles Clark – “Father” of Biosensors. *Bioelectrochemistry & Biosensors* 1, (2025).
45. Ojeda, I. *et al.* Electrochemical immunosensor for rapid and sensitive determination of estradiol. *Anal Chim Acta* 743, 117–124 (2012).
46. Baluta, S. *et al.* A Novel Strategy for Selective Thyroid Hormone Determination Based on an Electrochemical Biosensor with Graphene Nanocomposite. *Sensors* 23, (2023).
47. Ohno, R. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. *Biosens Bioelectron* 40, 422–426 (2013).
48. Chinnadayyala, S. R., Park, J., Abbasi, M. A. & Cho, S. Label-free electrochemical impedimetric immunosensor for sensitive detection of IgM rheumatoid factor in human serum. *Biosens Bioelectron* 143, (2019).
49. Resende, L. O., de Castro, A. C. H., Andrade, A. O., Madurro, J. M. & Brito-Madurro, A. G. Immunosensor for electro detection of the C-reactive protein in serum. *Journal of Solid State Electrochemistry* 22, 1365–1372 (2018).

50. Cancelliere, R. *et al.* Label-free electrochemical immunosensor as a reliable point-of-care device for the detection of Interleukin-6 in serum samples from patients with psoriasis. *Front Chem* 11, (2023).
51. Nanda, A., Kalyani, T., Kotal, H. & Jana, S. K. Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor for Ultra-Low-Level Detection of Interleukin-10 using A Cost-Effective Gold Nanoparticle-Modified Electrode. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* 16, 60–78 (2024).
52. Zamani, M., Klapperich, C. M. & Furst, A. L. Recent advances in gold electrode fabrication for low-resource setting biosensing. *Lab on a Chip* vol. 23 1410–1419 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d2lc00552b> (2023).
53. Paimard, G., Ghasali, E. & Baeza, M. Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113> (2023).
54. Guajardo Yévenes, C. F., Wongkaew, N., Ngamchana, S. & Surareungchai, W. Exploring Interdigitated Electrode Arrays Screen-Printed on Paper Substrates for Steady-State Electrochemical Measurements. *J Electrochem Soc* 169, 103502 (2022).
55. Lan, L. *et al.* Inkjet printing for electroluminescent devices: emissive materials, film formation, and display prototypes. *Frontiers of Optoelectronics* vol. 10 329–352 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12200-017-0765-x> (2017).
56. Demuru, S. *et al.* Antibody-Coated Wearable Organic Electrochemical Transistors for Cortisol Detection in Human Sweat. *ACS Sens* 7, 2721–2731 (2022).
57. Skoog West - Fundamentals of Analytical Chemistry.
58. Verrinder, E., Leung, K. K., Erdal, M. K., Sepunaru, L. & Plaxco, K. W. Comparison of voltammetric methods used in the interrogation of electrochemical aptamer-based sensors. *Sensors and Diagnostics* 3, 95–103 (2023).
59. Suliborska, K., Baranowska, M., Bartoszek, A., Chrzanowski, W. & Namieśnik, J. Determination of Antioxidant Activity of Vitamin C by Voltammetric Methods. in 23 (MDPI AG, 2019). doi:10.3390/proceedings2019011023.
60. Kumar, S. & Vicente-Beckett, V. Glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes for the determination of ascorbic acid by square-wave voltammetry. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 3, 388–396 (2012).
61. Lazanas, A. C. & Prodromidis, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. *ACS Measurement Science Au* vol. 3 162–193 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00070> (2023).

62. J. Bard, A. & R. Faulkner, L. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*.
63. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
64. Woods, R., J. Bard, A. & Dekker M. Electroanalytical Chemistry. in vol. 9 1–161 (New York, 1976).