

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Sviluppo di un biosensore enzimatico stampato 3D per la determinazione del glucosio**



### **Relatori**

Dr. Alessandro Chiadò  
Dr. Francesca Frascella  
Dr. Ignazio Roppolo

### **Candidata**

Debora Ferrari

Ottobre 2022



# Indice

Introduzione .....	1
1 Additive Manufacturing.....	3
1.1 Vat Photopolymerization.....	4
1.1.1 Meccanismo della fotopolimerizzazione.....	6
1.1.2 Resine.....	7
2 Enzimi.....	9
2.1 Gli enzimi come catalizzatori biologici.....	9
2.2 Attività enzimatica.....	11
2.3 Cinetica enzimatica.....	11
2.3.1 Legge di Michaelis Menten.....	11
2.4 Glucosio Ossidasi (GOx).....	12
2.5 Perossidasi di Rafano (HRP).....	14
2.6 Metodi di immobilizzazione di enzimi.....	17
3 Biosensori .....	21
3.1 Biosensori enzimatici .....	23
3.2 Biosensori e stampa 3D .....	25
4 Scopo del lavoro .....	27
5 Materiali e metodi.....	29
5.1 Materiali, metodi e strumentazione relativi alla stampa 3D.....	29
5.1.1 Resine.....	29
5.1.2 ASIGA MAX X27 UV385.....	31
5.1.2.1 Parametri e protocollo di stampa per i campioni .....	32
5.1.2.2 Parametri e protocollo di stampa per la realizzazione del dispositivo.....	33
5.1.3 Strumenti di caratterizzazione.....	33
5.1.3.1 Spettrofotometro FTIR.....	33
5.1.3.2 Angolo di contatto.....	33
5.2 Materiali, strumentazione e protocolli per l'immobilizzazione dell'elemento sensibile e lo sviluppo del biosensore.....	33
5.2.1 Materiali: enzimi e substrati.....	34
5.2.2 Strumentazione per la caratterizzazione.....	34
5.2.2.1 Lettore di piastra .....	34
5.2.3 Protocolli cinetiche enzimatiche in soluzione.....	35
5.2.3.1 Protocollo A: valutazione dell'attività enzimatica dell'HRP tramite TMB	36
5.2.3.2 Protocollo B: valutazione dei parametri cinetici dell'HRP per l'ABTS.....	36
5.2.3.3 Protocollo C1: valutazione dei parametri cinetici dell'HRP per il TMB (standard)	36

5.2.3.4	Protocollo C2: valutazione dei parametri cinetici dell'HRP per il TMB (stoppata con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	36
5.2.3.5	Protocollo D1: valutazione dei parametri cinetici della GOx per il glucosio tramite TMB (standard).....	36
5.2.3.6	Protocollo D2: valutazione dei parametri cinetici della GOx per il glucosio tramite TMB (stoppata con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	37
5.2.4	Struttura delle cinetiche stoppate con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in soluzione .....	37
5.2.5	Metodo di linearizzazione di Lineweaver-Burk.....	38
5.2.6	Funzionalizzazione superficiale e sviluppo.....	39
5.2.6.1	Protocollo 1 .....	39
5.2.6.2	Protocollo 2.....	40
5.2.6.3	Protocollo 3 .....	40
5.2.6.4	Protocollo 4: immobilizzazione nel dispositivo.....	40
5.2.7	Struttura cinetica stoppata con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> su provino con enzima .....	41
5.2.8	Metodologia di calcolo di LOD e LOQ del biosensore .....	41
6	Risultati e discussione.....	43
6.1	Caratterizzazione dei materiali del dispositivo stampato .....	43
6.1.1	Spettrofotometro FTIR.....	43
6.1.2	Angolo di contatto.....	47
6.2	Influenza della geometria di stampa sull'efficienza di immobilizzazione di HRP ...	48
6.3	Scelta del materiale per la realizzazione del dispositivo .....	49
6.3.1	Prove di immobilizzazione di HRP .....	49
6.4	Studio dell'attività enzimatica in soluzione.....	51
6.4.1	Valutazione dei parametri cinetici dell'HRP in soluzione .....	51
6.4.1.1	Cinetica con ABTS .....	51
6.4.1.2	Cinetiche con TMB standard e stoppate .....	53
6.4.1.2.1	Cinetiche HRP con TMB standard .....	53
6.4.1.2.2	Cinetiche HRP con TMB stoppate con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	55
6.4.1.2.3	Confronto dei parametri cinetici di HRP ottenuti per le prove con TMB standard e stoppata con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	56
6.4.2	Caratterizzazione GOx in soluzione.....	56
6.4.2.1	Cinetiche GOx/HRP standard .....	57
6.4.2.2	Cinetiche GOx stoppate con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	60
6.4.2.3	Confronto dei parametri cinetici della GOx ottenuti per le prove standard e stoppate con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	64
6.5	Immobilizzazione di GOx e co-immobilizzazione con HRP su campione stampato	67
6.5.1	Valutazione del rapporto di incubazione ottimale di GOx/HRP.....	67
6.5.2	Prove di immobilizzazione di GOx per la definizione della concentrazione di incubazione .....	69

6.5.3	Protocollo di co-immobilizzazione per GOx e HRP .....	70
6.6	Valutazione dei parametri cinetici degli enzimi su campione stampato .....	72
6.6.1	Cinetica dell'HRP immobilizzata su HDDA 10%AA .....	72
6.6.2	Cinetica GOx/HRP co-immobilizzate su HDDA 10%AA.....	74
6.7	Stampa del dispositivo.....	76
6.8	Co-immobilizzazione GOx/HRP nel dispositivo .....	81
6.9	Curva di calibrazione del dispositivo e calcolo di LOD e LOQ.....	83
7	Conclusioni e prospettive future .....	87
8	Bibliografia .....	88
	Ringraziamenti .....	98

## **Introduzione**

La necessità di sviluppare sensori che permettano di svolgere analisi in modo rapido e con scarso impiego di reagenti è emersa in maniera sempre più netta negli ultimi decenni [1], [2]. La ricerca si sta focalizzando sull'implementazione di dispositivi in grado di integrare e automatizzare al loro interno sistemi di analisi complessi che allo stato tecnologico attuale sono svolti in laboratorio; dispositivi di questo tipo prendono il nome di “Lab-On-A-Chip” (LOC)[2]–[4].

La realizzazione di questi dispositivi presuppone la costruzione di strutture complesse e di piccole dimensioni, con spesso integrate al loro interno delle fluidiche. In questo senso, la tecnologia di stampa 3D risulta molto vantaggiosa in quanto permette la realizzazione di geometrie complesse in un singolo step tecnologico.

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è lo sviluppo di un biosensore enzimatico per il rilevamento di glucosio stampato 3D, mediante la tecnologia Digital Light Processing (DLP). Il segnale in uscita per il rilevamento del glucosio in soluzione è un segnale di tipo colorimetrico. Nel Capitolo 1 verrà approfondita la stampa 3D basata su resine fotoreticolabili. Nel Capitolo 2 verranno illustrati i processi catalitici propri degli enzimi e verranno approfondite le caratteristiche dei due enzimi che saranno utilizzati nel progetto. Nel Capitolo 3 verranno presentati i biosensori in generale e sarà brevemente presentato lo stato dell'arte dei biosensori stampati 3D. Il Capitolo 4 presenterà lo scopo del lavoro. Nel Capitolo 5 saranno presentati materiali e metodi utilizzati durante il lavoro di Tesi. Nel Capitolo 6 saranno presentati e discussi i risultati ottenuti. Il Capitolo 7 sarà dedicato alle conclusioni e alle prospettive future del lavoro svolto.



# 1 Additive Manufacturing

La tecnologia di *Additive Manufacturing* (AM), comunemente definita *Stampa 3D*, indica una tecnologia attraverso cui è possibile costruire un oggetto tridimensionale per aggiunta di materiale (solitamente strato per strato) partendo da un modello digitale tridimensionale (Computer-Aided-design (CAD)) [5], [6]. La tecnologia di Additive Manufacturing nasce nel 1986 con Charles Hull, il quale ha sviluppato la prima stampante a stereolitografia (SLA) che verrà approfondita nel prossimo Paragrafo [7]. L'AM si contrappone come metodologia alla classica Manifattura Sottrattiva (*Subtractive Manufacturing*), in cui l'oggetto viene realizzato per rimozione di materiale da un blocco preesistente. La tecnologia AM consente di minimizzare lo scarto di materiale e diminuisce costi e tempi di rifinitura dell'oggetto [8]. I principali vantaggi della Stampa 3D sono legati alla facile personalizzazione degli oggetti fabbricabili, sfruttando un ampio ventaglio di design realizzabili, nel risparmio di materiale ed energetico e nella possibilità di avere una produzione distribuita e on-demand, superando i classici canoni di fabbricazione della produzione in scala [9]. Il processo di costruzione di un oggetto attraverso Stampa 3D inizia con la realizzazione di un modello digitale che rappresenta la geometria da realizzare (CAD). Questo viene convertito in STL (Standard Tassellation Language) e sezionato in strati da un software dedicato, il cui spessore può essere personalizzato entro un range dimensionale definito dalla tecnologia utilizzata. Ogni strato (*layer*) contiene le informazioni relative a quella sezione trasversale dell'oggetto finale. La realizzazione dell'oggetto tridimensionale avviene per deposizione strato su strato di materiale e il modo di costruzione degli strati varia a seconda della tecnologia utilizzata [8].

Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse tecnologie di Stampa 3D che hanno permesso di ampliare sempre di più la rosa di materiali che possono essere utilizzati, che comprendono ora tutte le classi di materiali: polimeri, metalli, ceramici e compositi [9], [10].

Nello Standard F2792-12a [11] l'ASTM fa rientrare nella dicitura di Additive Manufacturing sette categorie principali di Stampa 3D, ossia:

- Binder jetting: processo in cui un legante liquido viene depositato su un letto di polveri in modo controllato al fine di realizzare l'oggetto desiderato;
- Directed energy deposition: tecnica in cui la somministrazione di energia termica porta a fusione il materiale durante la deposizione [12]. Questa tecnica è usata solo con i metalli [6];
- Material extrusion: processo in cui il materiale è dispensato da un orifizio in maniera controllata al fine di riprodurre la forma desiderata;
- Material jetting: tecnica in cui il materiale è depositato goccia a goccia;
- Powder bed fusion: tecnica che prevede la sinterizzazione o fusione controllata di un letto di polveri a seguito della somministrazione di energia termica;
- Sheet lamination: processo in cui l'oggetto tridimensionale viene ottenuto per unione di lamine di materiale;
- Vat photopolymerization: tecnica in cui una resina viene irraggiata selettivamente con una sorgente UV/Vis e fatta reticolare in modo controllato al fine di riprodurre la geometria desiderata;

La tecnica maggiormente utilizzata nel caso di polimeri termoplastici è la Fused Deposition Modelling (FDM). Questa tecnica si basa sull'estrusione da un orifizio di filamenti di polimero semifuso secondo le specifiche definite dal CAD [13]. I materiali tipicamente utilizzati sono acrilonitrile-butadiene-stirene (ABS) e acido polilattico (PLA). L'adesione tra i layer è data dal raffreddamento e dalla conseguente solidificazione del materiale. La risoluzione dipende dalla dimensione dell'orifizio e dalla viscosità del polimero. Il principale svantaggio di questa tecnica

sta nella bassa risoluzione e nelle basse proprietà meccaniche raggiunte dall'oggetto una volta stampato [14].

Nel seguente Paragrafo verrà analizzata la famiglia delle *Vat Photopolymerization* con particolare attenzione alla tecnologia di Digital Light Processing (DLP), tecnica di stampa 3D utilizzata in questo lavoro di Tesi.

## 1.1 Vat Photopolymerization

Nella categoria *Vat Photopolymerization* sono comprese le tecniche basate sulla reticolazione di resine contenute in una vaschetta in seguito all'irraggiamento controllato e localizzato con una radiazione luminosa. Le principali tecniche di *Vat Photopolymerization* sono la Stereolitografia (SLA) e la tecnologia *Digital Light Processing* (DLP) [15], [16]. La SLA è stata la prima tecnologia sviluppata e presenta quattro elementi principali: una vaschetta contenente la resina, una piattaforma su cui viene fatto crescere l'oggetto, un laser e un sistema di specchi che permette di modificare la direzione di incidenza del laser e controllare lo spazio coinvolto nel processo di solidificazione. Il laser viene puntato nelle zone in cui si vuole che avvenga la reticolazione della resina e una volta scansionata l'intera area, la macchina passa al *layer* successivo muovendo in verticale la piattaforma di crescita di una distanza pari allo spessore del *layer*. Esistono due possibili configurazioni di lavoro per le stampanti SLA: top-down e bottom-up [17], [18]. Esse differiscono per la posizione della sorgente laser rispetto alla vaschetta e di conseguenza per la direzione in cui la piattaforma di crescita deve muoversi per ripristinare lo strato di resina liquida da irraggiare nello step successivo di costruzione. Nella configurazione top-down la sorgente laser è sopra la vaschetta e la piattaforma (che si trova immersa nella resina fin dall'inizio del processo di stampa) deve muoversi verso il basso immergendosi ulteriormente nella resina di uno spessore pari a quello del *layer* per consentire la crescita del *layer* successivo. Questo comporta la necessità di avere a disposizione un grande quantitativo di resina per ogni ciclo di stampa. Nella configurazione bottom-up, invece, il laser è posto sotto la vaschetta e pertanto la piattaforma si sposta verso l'alto con un passo pari allo spessore del layer da costruire. In quest'ultima configurazione l'oggetto viene cresciuto capovolto e il fondo della vaschetta deve essere trasparente alla radiazione in modo tale da consentirne il passaggio [18]. Un vantaggio di questa configurazione sta nella possibilità di utilizzare un minor quantitativo di resina per portare a compimento il ciclo di stampa rispetto a quella necessaria in configurazione top-down. Lo schema delle due configurazioni di lavoro delle stampanti SLA è riportato in Figura 1.1.

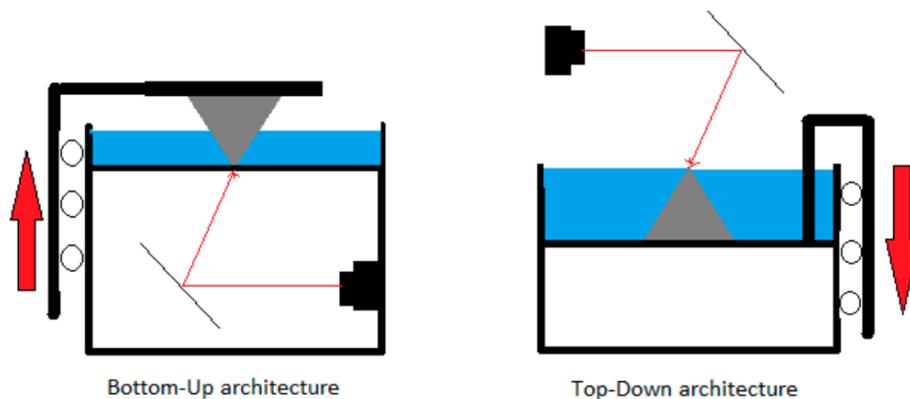


Figura 1.1: Schema della configurazione bottom-up (sinistra) e top-down (destra) delle stampanti SLA [17].

La configurazione bottom-up è la stessa utilizzata nelle stampanti DLP. Nella tecnologia Digital Light Processing la sorgente luminosa, solitamente costituita da un LED, può emettere sia nel visibile che nell'UV [6]. La luce viene riflessa da un dispositivo chiamato Digital Mirror Device (DMD) che è costituito da una matrice composta da milioni di specchi che possono essere posti in modalità "on/off" in modo indipendente l'uno dall'altro. Gli specchi sono posizionati in modo da proiettare (modalità on) o meno (modalità off) il fascio luminoso sul fondo della vaschetta, illuminando quindi i pixel necessari nel disegno del *layer* in costruzione. In questo modo è possibile polimerizzare tutti i punti del *layer* contemporaneamente senza doverli scansionare singolarmente, come invece avviene nella SLA. Questo aumenta la velocità di stampa, poiché il tempo dell'operazione dipende esclusivamente dai tempi di esposizione necessari per polimerizzare la resina e non dall'estensione delle zone da irraggiare nel singolo strato [19]. In Figura 1.2 viene mostrato lo schema di una stampante DLP. È da sottolineare che in questa tecnica, una porzione importante del tempo impiegato per costruire uno strato è presa dalla fase di formazione di un nuovo *layer* di resina liquida sul fondo della vaschetta dopo la fase di irraggiamento dello strato precedente (fase di riempimento) in quanto la piattaforma deve alzarsi di un passo maggiore di quello corrispondente allo spessore del *layer*, per permettere alla resina di fluire e riempire l'area ad essa sottostante [20].

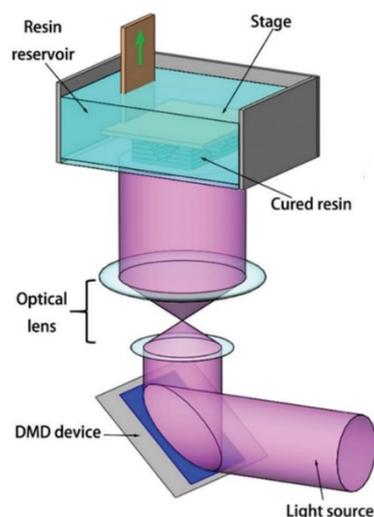


Figura 1.2: Schema di una stampante DLP [21].

Un vantaggio della configurazione bottom-up della DLP rispetto alla top-down della SLA sta nel fatto che nella prima si limita l'inibizione da ossigeno della polimerizzazione (processo che verrà approfondito nel Paragrafo successivo) in quanto il *layer* polimerizzato è sempre a contatto con il fondo della vaschetta e mai a diretto contatto con l'aria [6].

Nella DLP la risoluzione dipende dalla dimensione dei pixel/specchi da cui è costituito il DMD e dal sistema di ottiche che permette di proiettare la radiazione sul fondo della vaschetta, mentre nella SLA dalla dimensione dello spot luminoso del laser [16]. Quindi, la risoluzione laterale della DLP varia tra i 10 e i 50  $\mu\text{m}$  e può essere peggiore rispetto a quella raggiunta nella tecnologia SLA (pochi  $\mu\text{m}$  in caso di strumenti  $\mu\text{-SLA}$ ) [6]. In Figura 1.3 è possibile visualizzare un confronto tra le risoluzioni delle due configurazioni di stampa.

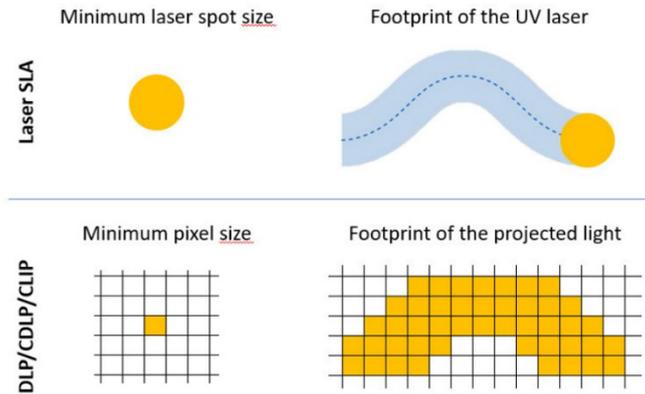


Figura 1.3: Rappresentazione della risoluzione ottenibile nelle tecniche SLA (sopra) e DLP (sotto) foto modificata da [16].

La risoluzione verticale, ossia il minimo spessore realizzabile, da un punto di vista meccanico può essere anche di 1  $\mu\text{m}$ , ma in generale dipende principalmente dalla penetrazione della radiazione nella resina e può essere modulato attraverso l’inserimento di pigmenti e altri additivi nella formulazione [6].

In ultimo si menziona brevemente un’evoluzione della tecnologia DLP, ossia la *Continuous Liquid Interface Production* (CLIP) che permette di velocizzare il processo di stampa modificando la fase di riempimento. Il setup della stampante è lo stesso della DLP, però, il fondo della vaschetta in cui è contenuta la resina risulta essere permeabile all’ossigeno oltre che trasparente alla sorgente luminosa. Questo permette la formazione di uno strato di resina spesso tra i 20 e i 30  $\mu\text{m}$  (*dead zone*) in cui il processo di reticolazione è completamente inibito dall’ossigeno permettendo alla resina di restare liquida [6], [20]. Questo consente di poter alzare la piattaforma di crescita in modo continuo e non di un’altezza maggiore per ogni step di lavoro, abbattendo i tempi di riempimento. Si ha dunque che la velocità di crescita dipende solo dal tempo di reticolazione e dalla viscosità della resina [22].

### 1.1.1 Meccanismo della fotopolimerizzazione

Le tecnologie *Vat Photopolymerization* si basano sul meccanismo della fotopolimerizzazione, ossia un processo chimico che permette di ottenere un polimero termoindurente in seguito all’esposizione di una resina liquida ad una radiazione luminosa (UV o visibile) [18], [23]. Elemento fondamentale perché la reazione di reticolazione possa avvenire è il fotoiniziatore, ossia una molecola in grado di assorbire l’energia della sorgente luminosa generando una specie reattiva capace di reagire con i monomeri e gli oligomeri presenti nella formulazione liquida e avviare così il processo di polimerizzazione [24].

Esistono due classi principali di fotoiniziatori, i radicalici e i cationici, che generano le corrispondenti specie attive (radicali e cationi). Queste, interagendo con alcune funzionalità, permettono l’avvio di meccanismi di fotopolimerizzazione [25]. I fotoiniziatori radicalici sono i più utilizzati nelle tecnologie *Vat Photopolymerization* in quanto i monomeri che reticolano per via radicalica danno vita ad un processo più rapido rispetto ai cationici [26].

Il meccanismo di fotopolimerizzazione radicalica si sviluppa in tre fasi principali: inizio (I), propagazione (II) e terminazione (III) [26]. Durante la fase di inizio (I) il fotoiniziatore radicalico (*PI*) assorbe l’energia della radiazione luminosa ( $h\nu$ ) passando ad uno stato eccitato ( $PI^*$ ). Il rilassamento dello stato eccitato porta alla generazione di un radicale libero ( $R \bullet$ ). Il meccanismo attraverso cui vengono generate le specie radicaliche nel fotoiniziatore permette

di classificare i fotoiniziatori radicalici in due categorie: fotoiniziatori radicalici di Tipo I e di Tipo II. I primi generano specie radicaliche per rottura di un legame covalente presente nella molecola a seguito dell'assorbimento della radiazione luminosa. I fotoiniziatori di Tipo II, invece, prevedono un processo a due molecole: il fotoiniziatore assorbe la radiazione e passa ad uno stato eccitato, che è in grado di strappare un atomo di idrogeno al co-iniziatore, che a questo punto genera un radicale in grado di iniziare la polimerizzazione [25].

A questo punto il radicale ( $R \bullet$ ) fotogenerato reagisce con un monomero ( $M$ ) presente nella formulazione portando solitamente alla rottura di un legame  $C=C$  insaturo e comportando così la generazione di un radicale ( $M \bullet$ ): quest'ultimo rappresenta la specie che permette la propagazione della reazione di reticolazione. La reazione, infatti, prosegue comportando l'accrescimento della catena per addizione radicalica e la creazione del network polimerico (fase di propagazione (II)). Il processo termina quando due macroradicali si incontrano (fase di terminazione (III)) [26]. In questa fase si può assistere alla combinazione delle due catene polimeriche con creazione di una catena polimerica il cui peso molecolare è dato dalla somma di quelle dei due macroradicali reagenti, oppure ad una reazione di disproporzionamento in cui un atomo di idrogeno viene estratto da una delle due catene radicaliche e si ottengono due catene (una con una terminazione insatura) con pesi molecolari pari a quelli dei rispettivi macroradicali di partenza [27]. Di seguito viene riportato uno schema delle fasi del processo di fotopolimerizzazione radicalica (Figura 1.4).

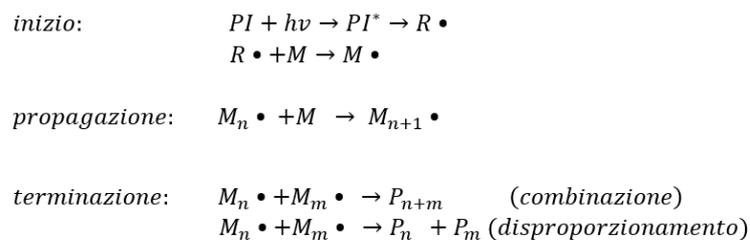


Figura 1.4: Schema generale del processo di fotopolimerizzazione radicalica

I fotoiniziatori di tipo cationico sono meno utilizzati in quanto il processo di propagazione risulta essere più lento. Questi sono utilizzati principalmente per resine epossidiche che sono in grado di reticolare solo grazie ad un processo cationico[23].

Durante il processo di stampa, tipicamente la dose luminosa (tempo d'irraggiamento per energia d'irraggiamento) viene regolata fino a raggiungere il punto di gelo, ossia un valore di conversione tale per cui la resina da liquida si è trasformata in un polimero insolubile nella stessa resina [28]. Tipicamente, si lavora intorno alla dose luminosa necessaria ad arrivare al punto di gelo sia per minimizzare l'esposizione (e quindi velocizzare il processo) sia per evitare polimerizzazioni incontrollate e/o fuori dalla zona irraggiata. Una volta terminato il processo di stampa, tipicamente il pezzo viene pulito dalla resina in eccesso e post reticolato in un forno UV per raggiungere la reticolazione completa, che stabilizza e migliora le proprietà meccaniche e fisico-chimiche [19].

### 1.1.2 Resine

Le formulazioni liquide, dette anche resine, utilizzate nelle tecnologie *Vat photopolymerization* presentano due elementi fondamentali: il fotoiniziatore e le specie monomeriche o oligomeriche del materiale che si vuole reticolare. Tuttavia, sono solitamente presenti anche altri elementi che rientrano nella categoria di additivi [26]. Di seguito vengono presi in esame i diversi componenti delle formulazioni.

Fotoinziatore: a prescindere dalla classificazione in cui il fotoinziatore ricade (Paragrafo 1.1.1), l'efficienza di un processo di fotopolimerizzazione dipende dall'efficienza di assorbimento del fotoinziatore per la frequenza della radiazione utilizzata [29], [30]. Inoltre, dipende anche dalla resa quantica del fotoinziatore, ovvero il numero di specie generate per fotone assorbito [31].

La cinetica iniziale del processo di fotopolimerizzazione può riassumersi nella formula riportata in Eq.(1).

$$R_i = \phi_i I_{abs} \quad (1)$$

Dove  $\phi_i$  indica la resa quantica del fotoinziatore e  $I_{abs}$  indica l'intensità di luce assorbita per una determinata lunghezza d'onda [32].

È comune utilizzare fotoiniziatori sensibili a radiazioni UV ( $\lambda < 400$  nm), tuttavia è sempre più incentivata la ricerca nell'utilizzo di fotoiniziatori in grado di assorbire efficacemente la radiazione visibile ( $400 \text{ nm} < \lambda < 780$  nm) per ragioni di sicurezza degli operatori [23].

Resine: sono diverse le tipologie di resine che possono essere utilizzate in questa tecnologia. Le principali sono le epossidiche (reticolate per fotopolimerizzazione cationica), le acriliche e le metacriliche [26]. Le resine acriliche e metacriliche sono le più utilizzate poiché presentano una velocità di reticolazione molto elevata [26]. Oltre alla funzionalità, è necessario selezionare anche monomeri con il backbone polimerico più utile all'applicazione finale. Infatti, in base alla struttura molecolare del monomero si hanno proprietà diverse: monomeri con gruppi aromatici presentano una maggiore rigidità ed un processo di reticolazione più lento con conseguente minore restringimento del pezzo a seguito del *curing* [23]. Le resine acriliche presentano inoltre altre problematiche: l'elevato ritiro volumetrico durante la fase di reticolazione e il rallentamento del processo di polimerizzazione a causa dell'inibizione da ossigeno [33]. Quest'ultima problematica sussiste nel momento in cui il processo di reticolazione è condotto in atmosfera contenente ossigeno ed è causato dalla natura bi-radicalica dell'ossigeno molecolare. L'ossigeno entra in competizione con le specie radicaliche attive nel processo di reticolazione (radicali liberi e catene polimeriche in crescita) e ne comporta la soppressione causando il rallentamento della cinetica di polimerizzazione e il raggiungimento di un minor grado di reticolazione [23], [34].

Additivi: spesso è necessario inserire altri elementi nella formulazione per rendere più efficiente il processo; tra questi è utile menzionare i coloranti che, assorbendo la luce in maniera competitiva con il fotoinziatore, hanno il ruolo principale di confinare la radiazione in un'area precisa evitando un irraggiamento eccessivo sia sul piano che in profondità e aumentare così la risoluzione del processo di stampa [35].

## 2 Enzimi

In questo Capitolo verrà presentato un quadro teorico relativo agli enzimi con approfondimenti su Glucosio Ossidasi da *Aspergillus niger* (GOx) e Perossidasi di Rafano da *Armoracia rusticana* (HRP), gli enzimi utilizzati nel progetto.

### 2.1 Gli enzimi come catalizzatori biologici

Gli enzimi sono macromolecole biologiche che agiscono da catalizzatori di reazioni chimiche [36]. Secondo la teoria delle collisioni, per avviare una reazione chimica è necessario che le molecole dei reagenti urtino tra loro con il giusto orientamento ed energia. Il valore minimo di energia che le molecole devono possedere per poter avviare la reazione è l'energia di attivazione [37]. Nel passaggio da reagenti a prodotti si ha la formazione di una struttura altamente instabile ed energetica che viene definita *complesso attivato* (o stato di transizione) in cui alcuni legami non sono completamente rotti e altri non sono totalmente formati. Come è possibile osservare in Figura 2.1, la differenza tra l'energia del *complesso attivato* (rappresentato dal massimo assoluto delle curve) e quella dei reagenti coincide con l'energia di attivazione della reazione.

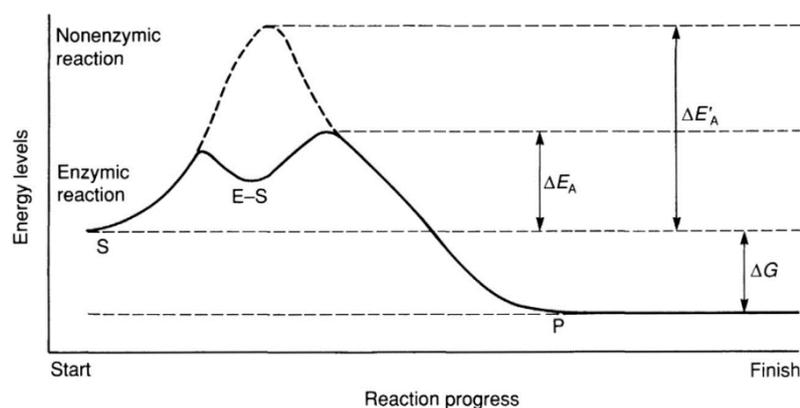


Figura 2.1: Schema della variazione standard dell'energia libera di Gibbs ( $\Delta G$ ) di una reazione chimica esoergonica. L'energia di attivazione è indicata da  $\Delta E'_A$  per la reazione non catalizzata (linea tratteggiata) e da  $\Delta E_A$  per quella catalizzata da un enzima (linea continua) [38].

La funzione di un catalizzatore è quella di abbassare l'energia di attivazione di una reazione il che corrisponde ad un aumento della velocità di reazione in quanto aumenta la probabilità di urti efficaci [37]. Gli enzimi sono catalizzatori altamente specifici in grado di catalizzare una reazione chimica su composti definiti substrati. Il substrato (S) entra in contatto con l'enzima legandosi ad esso con interazioni non covalenti (legami a idrogeno, interazioni ioniche, interazioni di Van der Waals). La regione della struttura enzimatica coinvolta nell'interazione con il substrato è definita "*sito attivo*" e grazie alla sua conformazione spaziale ed elettronica fissa il substrato e permette la catalisi della reazione. Il sito attivo dell'enzima può suddividersi in due parti: una parte dedicata solo a legare il substrato (sito di legame) e un'altra esclusivamente coinvolta nell'azione catalitica (sito catalitico). Entrambe le parti sono fondamentali per l'attività enzimatica e molto spesso coincidono [38], [39]. Dal legame del substrato si forma dunque un complesso enzima-substrato (ES) in cui il substrato, a causa dell'interazione con gli aminoacidi del sito attivo, subisce cambiamenti nelle energie di legame e nella distribuzione della densità elettronica che possono essere accompagnate anche da deformazioni di tipo fisico della struttura molecolare. Questa situazione porta alla formazione di una struttura termodinamicamente instabile da cui poi la reazione può procedere verso la formazione dei prodotti [38]. La formazione del complesso ES comporta la creazione di uno

stato di transizione più stabile e dunque a minore energia rispetto a quello previsto dalla reazione non catalizzata e questo è il meccanismo con cui l'enzima abbassa l'energia di attivazione della reazione [37]. In Figura 2.2 è riportato lo schema di una reazione enzimatica.

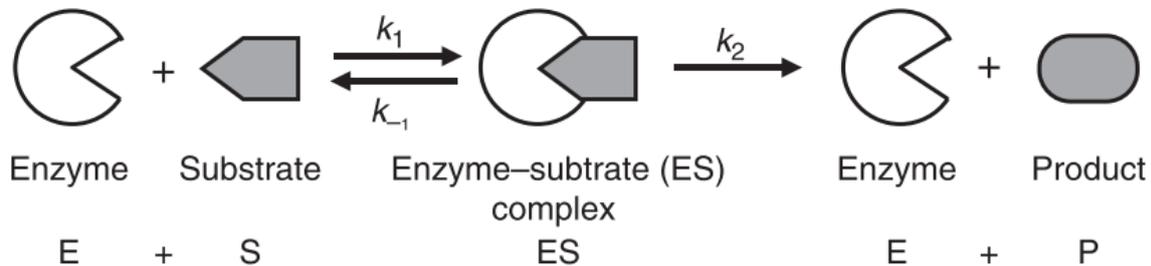


Figura 2.2: Schema di una reazione enzimatica [40].

La maggior parte degli enzimi, per poter svolgere un'attività catalitica, prevede la presenza di un cofattore, ossia di una molecola non proteica che rende attiva la struttura dell'enzima. Se il cofattore viene rimosso dalla struttura dell'enzima completo (oloenzima), la sola struttura proteica (apoenzima) perde la sua attività catalitica [41]. Se il cofattore è legato fortemente alla struttura proteica e la sua rimozione sancisce la denaturazione dell'enzima, prende il nome di gruppo prostetico. Un cofattore meno saldamente legato prende il nome di coenzima. Il coenzima prende parte alla reazione catalizzata dalla biomolecola e viene modificato durante la catalisi.

La maggior parte degli enzimi presenta diverse isoforme. Si possono definire isoforme o isoenzimi le diverse forme dello stesso enzima che presentano una sequenza amminoacidica leggermente diversa e pertanto diverse proprietà fisiche, chimiche e cinetiche [42], [43]. La differente sequenza amminoacidica può portare a differenze nelle velocità e nel tipo di reazione che l'enzima è in grado di compiere.

Solitamente gli enzimi vengono suddivisi in categorie sulla base del tipo di reazione che catalizzano. Si possono pertanto riconoscere sei classi principali [38]:

- Ossidoreduttasi: enzimi che catalizzano reazioni di ossido-riduzione tramite il trasferimento di elettroni da una molecola donatore ad un accettore in reazioni che prevedono lo scambio di elettroni, l'estrazione di protoni o idrogeno. Solitamente le reazioni catalizzate dalle ossidoreduttasi prevedono due semireazioni, una ossidativa e una riduttiva che coinvolgono la trasformazione di due substrati. Le principali classi di ossidoreduttasi sono: ossidasi, deidrogenasi, idrossilasi, ossigenasi, perossidasi e reduttasi [44];
- Transferasi: enzimi che catalizzano il trasferimento di vari gruppi chimici (diversi dall'idrogeno) da un composto all'altro [45];
- Idrolasi: enzimi che catalizzano la scissione di legami C–O, C–N, C–S e O–P per aggiunta di acqua [39];
- Liasi: enzimi che catalizzano la scissione dei legami C–C, C–S e C–N (esclusi i legami peptidici) in un substrato mediante un processo diverso dall'idrolisi. Alcuni rimuovono i gruppi dal substrato e formano doppi legami o cicli, mentre altri aggiungono gruppi a doppi legami [39];
- Isomerasi: enzimi che catalizzano reazioni che comportano un riarrangiamento strutturale della molecola [46];

- Ligasi: enzimi che catalizzano l'unione di due molecole, ricavando l'energia necessaria dalla scissione di un legame fosfato ricco di energia in molti casi derivato dalla conversione simultanea dell'adenosina trifosfato (ATP) in adenosina difosfato (ADP) [47].

## 2.2 Attività enzimatica

Si definisce attività enzimatica la velocità iniziale con cui l'enzima consuma il substrato o rilascia il prodotto. Si esprime in  $\mu\text{M}/\text{min}$  e dipende direttamente dalla quantità di enzima presente in soluzione. Si definisce invece Unità Internazionale (UI) “la quantità di enzima che catalizza la conversione di una  $\mu\text{mol}$  di substrato al minuto in condizioni definite di pH, temperatura e pressione) [38].

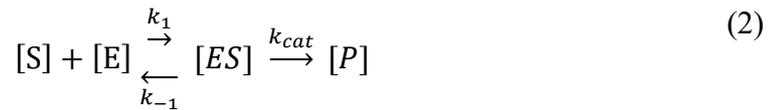
Diversi fattori influenzano l'attività enzimatica:

- La concentrazione di enzima: aumentando la concentrazione di enzima a parità di temperatura, pH e concentrazione di substrato, si ha un aumento dell'attività enzimatica direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima. Tuttavia, questa relazione è valida fino ad un certo valore di concentrazione superato il quale l'attività non cresce più linearmente con la concentrazione di enzima poiché questa non è più il fattore limitante e viene raggiunto un plateau [48].
- La concentrazione di substrato: a parità di concentrazione di enzima e di tutte le altre condizioni, per basse concentrazioni di substrato si ha una relazione attività/concentrazione di substrato di tipo lineare (reazione di ordine uno). All'aumentare della concentrazione di substrato, l'attività non cresce più linearmente con essa, ma tende a raggiungere un plateau e la velocità massima  $V_{\text{max}}$  (reazione di ordine zero). Il modello matematico utilizzato per approssimare l'andamento della cinetica enzimatica è quello di Michaelis Menten che verrà trattato nel Paragrafo 2.3.1.
- La temperatura: a parità di tutte le altre condizioni, l'aumento della temperatura comporta un aumento dell'attività enzimatica entro un certo valore, superato il quale si ha la denaturazione dell'enzima stesso ed un rapido declino dell'attività [49]. Si ha pertanto un andamento a campana dell'attività enzimatica rispetto alla temperatura.
- Il pH: esiste un valore di pH ottimale a cui l'enzima mostra la massima attività, questo è dovuto al fatto che il cambiamento della carica sui gruppi funzionali in particolare del sito attivo influenza le proprietà catalitiche della biomolecola [48]. Ogni enzima mostra un pH ottimale di lavoro specifico poiché la struttura terziaria differisce da un enzima all'altro. La maggior parte degli enzimi presenta pH ottimale intorno alla neutralità, ma esistono molte eccezioni[49]. Ad esempio, la Pepsina (proteasi) presenta pH ottimale intorno a 2.0, mentre a pH neutri risulta essere denaturata perdendo la sua attività catalitica [50].

## 2.3 Cinetica enzimatica

### 2.3.1 Legge di Michaelis Menten

Normalmente l'equazione cinetica utilizzata per descrivere l'andamento della velocità di reazione rispetto alla concentrazione di substrato è quella di Michaelis-Menten [51]. Questo modello nasce per descrivere delle reazioni enzimatiche a singolo substrato, ma viene utilizzato anche per descrivere meccanismi più complessi. Si basa sull'assunto per cui la formazione del complesso enzima substrato raggiunge l'equilibrio poiché la cinetica limitante è quella che porta alla formazione del prodotto (P) Eq.(2) [40].



L'espressione che definisce la legge di Michaelis-Menten è riportata di seguito Eq.(3):

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

Dove  $v$  è la velocità iniziale di reazione con concentrazione di substrato pari a  $[S]$ ,  $V_{max}$  è la velocità massima di reazione e  $K_m$  è la costante di Michaelis-Menten.

I parametri cinetici che si possono ricavare da questa espressione della velocità di reazione sono tre:

- $V_{max}$ : rappresenta la velocità massima raggiungibile per la concentrazione di enzima utilizzata e solitamente è espressa in  $[M s^{-1}]$ . Tuttavia, in questo lavoro di Tesi verrà espressa in  $[\mu M min^{-1}]$ .
- $k_{cat}$ : è solitamente espressa in  $[s^{-1}]$  ed indica la velocità di produzione del prodotto per unità di enzima in condizioni di saturazione di substrato [51]. Si ha pertanto quanto riportato nell'Eq. (4):

$$V_{max} = k_{cat}[E_{tot}] \quad (4)$$

- $K_m$ : è un parametro che indica l'affinità dell'enzima nei confronti del substrato; maggiore è la  $K_m$ , minore è l'affinità con il substrato.  $K_m$  ha le dimensioni di una concentrazione molare ed è costante in condizioni non variabili di pH e temperatura. Il valore di  $K_m$  corrisponde alla concentrazione di substrato a cui "la velocità iniziale di reazione raggiunge la metà del valore di velocità massima" [39].

La linearizzazione dell'equazione di Michaelis-Menten permette di estrapolare i valori dei parametri  $K_m$  e  $V_{max}$ . Il metodo di linearizzazione più utilizzato e sfruttato in letteratura che è stato adottato anche in questo lavoro di Tesi è quello di Lineweaver-Burk, che riporta sull'asse delle ascisse il reciproco della concentrazione di substrato e su quello delle ordinate il reciproco della velocità iniziale [52]. La modalità di estrapolazione dei parametri cinetici è definita nel paragrafo 5.2.5.

## 2.4 Glucosio Ossidasi (GOx)

La Glucosio Ossidasi (GOx) è una ossidoreduttasi che catalizza l'ossidazione di  $\beta$ -D-glucosio a D-glucono- $\delta$ -lattone e  $H_2O_2$  usando una molecola di ossigeno come accettore elettronico [53], [54]. Essa è costituita da due subunità ovvero da due catene peptidiche uguali che sono unite da ponti disolfuro [55] e presenta molecole di Flavina Adenina Dinucleotide (FAD) come coenzima, come mostrato in Figura 2.3.

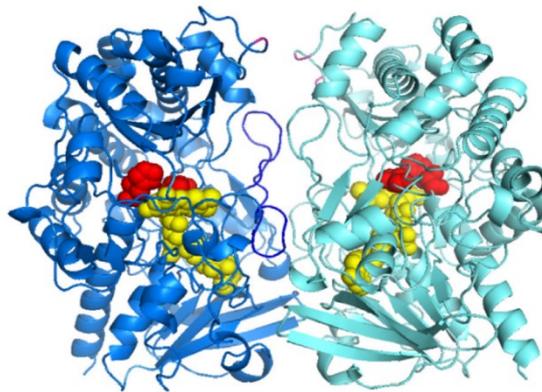


Figura 2.3: Struttura del dimero della GOx. I due monomeri sono mostrati in blu e azzurro, il cofattore FAD in giallo, i siti attivi in rosso [56].

La GOx è una glicoproteina, ossia una molecola proteica con catene oligosaccaridiche legate covalentemente alle catene di aminoacidi, e contiene tra il 10% e il 17% in peso di carboidrati [54], [55]

La reazione catalizzata avviene in due step, il primo riduttivo e il secondo ossidativo. Durante la prima fase si ha l'ossidazione del  $\beta$ -D-glucosio a D-glucono- $\delta$ -lattone e conseguente riduzione del cofattore FAD a FADH<sub>2</sub>. Il D-glucono- $\delta$ -lattone subisce una successiva idrolisi (non catalizzata) con formazione di acido gluconico. La seconda metà di reazione vede il trasferimento dei due elettroni e due protoni alla molecola di ossigeno che viene ridotta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con conseguente rigenerazione della forma ossidata del cofattore FAD e la rigenerazione della forma funzionale dell'enzima [53], [57]. Lo schema di reazione è mostrato in Figura 2.4.

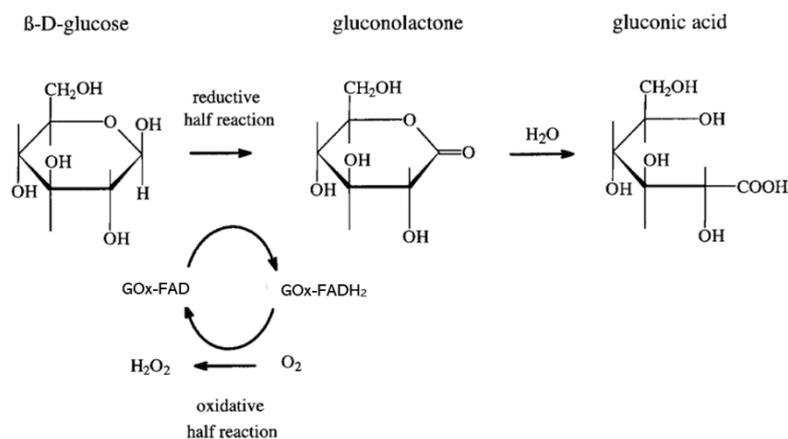


Figura 2.4: Schema della reazione catalizzata da GOx. Immagine modificata da [57].

Il FAD agisce come trasportatore di elettroni nel processo catalitico [58].

La GOx è un enzima altamente specifico nei confronti dell'anomero  $\beta$  del glucosio, infatti, l'anomero  $\alpha$  non risulta essere un substrato riconosciuto dal sito attivo [53], [54].

Per quanto concerne il range di pH al quale può avvenire la reazione si ha che questo varia in base all'organismo di derivazione dell'enzima. Nel caso della GOx estratta da *A. niger* è pari a 3.5-6.5 [53]. Tuttavia il pH ottimale si ha intorno a pH 5.0-5.5 [55], [59].

La GOx trova impiego in diversi settori. Ad esempio nel settore alimentare nella produzione del vino o di acido gluconico [58], oppure nella rimozione del glucosio nel processo di essiccazione delle uova o nella rimozione di ossigeno durante la produzione di succhi di frutta [60], nel settore della sensoristica per il rilevamento di glucosio in campioni quali sangue, urina e alimenti [56].

## 2.5 Perossidasi di Rafano (HRP)

La Perossidasi di Rafano (HRP) è una ossidoreduttasi che rientra nella Classe III delle Perossidasi [61]. Le perossidasi sono enzimi che catalizzano diverse reazioni ossidative in cui vi è l'ossidazione di un substrato e gli elettroni sono trasferiti a una specie perossido (solitamente  $H_2O_2$ ) [62]. La classe delle perossidasi risulta essere una delle classi di enzimi meno specifiche in quanto sono in grado di catalizzare l'ossidazione di un elevato numero di substrati (fenoli e ammine aromatiche) in presenza di perossido di idrogeno o di altre specie perossido [63].

L'enzima HRP commercialmente disponibile è estratto dalle radici della *A Armoracia rusticana* [64]. Esistono diversi isoenzimi dell'HRP che possono essere ampiamente suddivisi in tipi acidi (A), leggermente basici o neutri (B,C) e fortemente basici (D,E) [61], [65]. L'isoenzima C (HRP-C) è il più abbondantemente espresso e il più studiato ed è una glicoproteina costituita da 308 aminoacidi con una percentuale in peso di carboidrati che si aggira intorno al 18% [61], [66]. L'isoenzima HRP-C è una molecola globulare a singola catena con due centri metallici: il gruppo eme e due ioni calcio [61], [62]. La struttura secondaria prevalente è l' $\alpha$ -elica, tuttavia, è presente una piccola regione a foglietto- $\beta$  [67]. In Figura 2.5 è riportata la struttura dell'HRP-C.

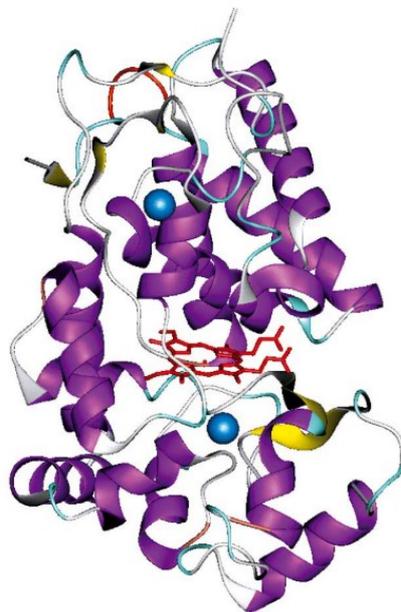


Figura 2.5: Struttura dell'HRP-C. Le regioni  $\alpha$ -elica sono mostrate in viola. La parte a foglietto- $\beta$  in giallo. In blu sono indicati gli ioni calcio e in rosso il gruppo eme [67].

L'HRP viene divisa in una regione distale e una prossimale al gruppo eme, il quale è legato alla glicoproteina tramite coordinazione con un residuo di istidina (His) [62], [68]. Il gruppo eme è un cofattore per l'enzima e risulta avere struttura planare con un atomo di ferro al centro di un

anello porfirinico, il quale è composto da quattro molecole di pirrolo. In Figura 2.6 è riportata la struttura del gruppo eme.

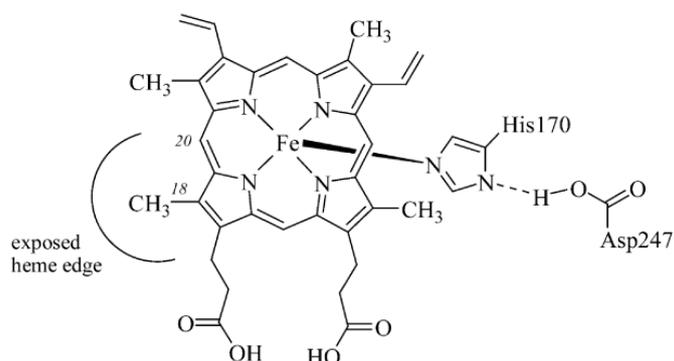
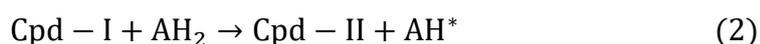
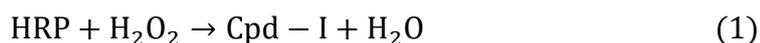


Figura 2.6: Struttura del gruppo eme presente come cofattore nell'HRP [63].

Il meccanismo di reazione dell'HRP prevede tre fasi come riportato di seguito.



Dove HRP indica la forma base dell'enzima, Cpd - I e Cpd - II gli stati intermedi,  $\text{AH}_2$  la forma non ossidata del substrato donatore elettronico e  $\text{AH}^*$  quella ossidata.

Durante lo step (1) si ha ossidazione a due elettroni del gruppo eme dell'enzima da parte del perossido di idrogeno con conseguente liberazione di una molecola d'acqua e formazione dell'intermedio Cpd - I. La forma Cpd - I è caratterizzata dal ferro presente nel *gruppo eme* ossidato a  $\text{Fe}^{4+}$ , mentre nello stato nativo dell'enzima si trova come  $\text{Fe}^{3+}$  (forma ferritica).

Inizia dunque la fase di ossidazione del substrato e riduzione dell'enzima. L'intermedio Cpd - I va incontro ad un primo step di riduzione a singolo elettrone che porta alla formazione della forma Cpd - II con contemporanea ossidazione di una molecola di substrato (2). A questo punto, la forma Cpd - II subisce una riduzione acquisendo un elettrone da una seconda molecola di substrato che viene così ossidata comportando il ripristino della forma nativa dell'enzima e la liberazione di una molecola d'acqua (3) [42], [62].

In Figura 2.7 si riporta lo schema di reazione appena descritto.

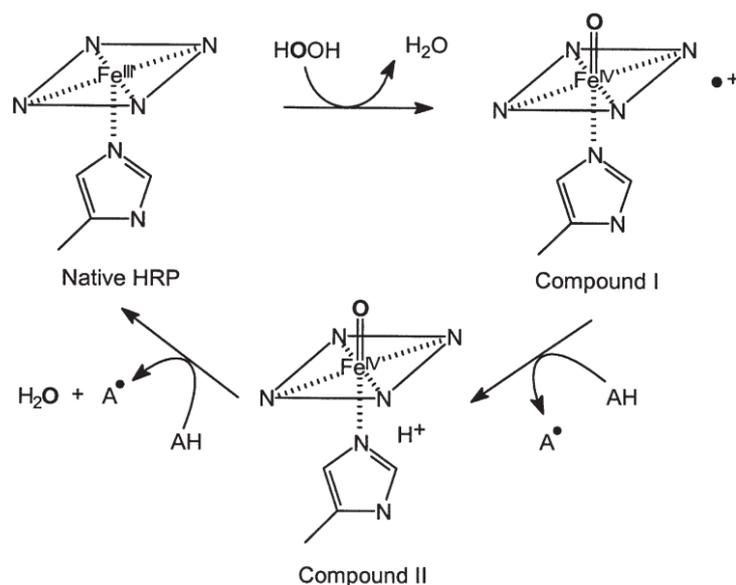


Figura 2.7: Ciclo redox dell'HRP [42].

Come già accennato la Perossidasi di Rafano presenta numerosi substrati, questi sono elettrondonatori e principalmente fenoli e ammine aromatiche [42]. La maggior parte dei substrati di HRP sono cromogeni, ossia, composti che a seguito dell'ossidazione formano un prodotto colorato e ciò permette di visualizzare l'attività di HRP per via colorimetrica. I principali substrati cromogeni sono: acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS), 4,4'-diammino-bifenile (Benzidina), 3,3'-5,5' Tetrametilbenzidina (TMB), 3,3'-diamminobenzidina (DAB), 2-Metossifenolo (guaicolo), Acido-5-aminosalicilico (5-AS), o-fenilendiammina (OPD), 1,2,3-triidrossibenzene (pirogallolo), 3-ammino-9-etilcarbazolo (AEC), 3-Metil-2-Benzotiazolinone idrazone (MBTH). I metodi classicamente utilizzati e riportati in letteratura per visualizzare l'attività di HRP per via colorimetrica prevedono l'uso di guaicolo [69], ABTS [52] o benzidina [70]. Tuttavia, diversi studi hanno rilevato che la maggiore amplificazione del segnale in seguito all'ossidazione da parte dell'HRP è data dalla molecola di TMB, pertanto, il segnale colorimetrico generato da quest'ultimo risulta essere molto più elevato rispetto agli altri elencati e questa molecola è risultata la più indicata, ad esempio, per lo svolgimento di saggi di immunoassorbimento enzimatico (Enzyme Immunosorbent Assay, o ELISA) in quanto se ne aumenta notevolmente la sensibilità [71]. In particolare, si ha la seguente gerarchia di sensibilità: TMB > OPD > ABTS > 5-AS > MBTH > AEC [72].

La molecola di TMB è un'ammina aromatica che può andare incontro ad un doppio step di ossidazione ad un elettrone. In Figura 2.8 si riportano le strutture della TMB.

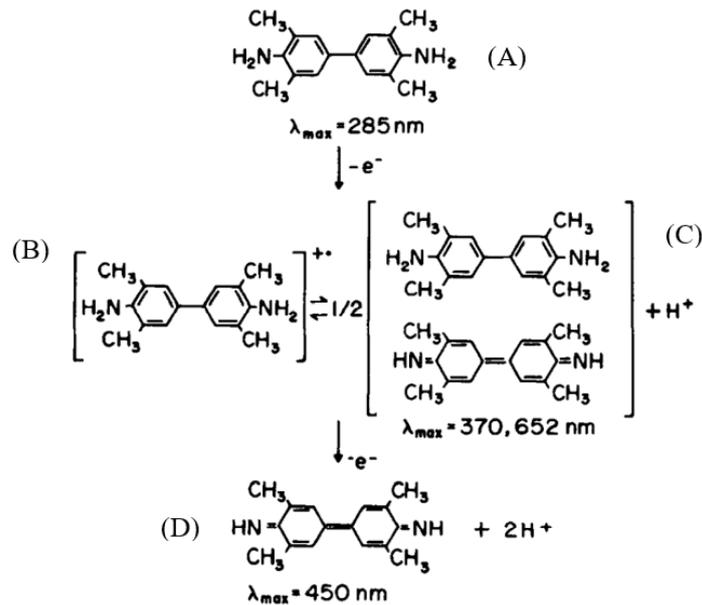


Figura 2.8: Struttura della TMB e le sue forme ossidate. Immagine modificata da [73].

La forma non ossidata della TMB è quella di una diammina elettrondonatore (A), mentre quella totalmente ossidata è una diimmina accettore di elettroni (D). Il primo step ossidativo comporta la generazione di due intermedi di reazione: un radicale cationico (B) e un complesso a trasferimento di carica (CTC) a due molecole di TMB dal colore blu-verde (C). Il complesso a due molecole è costituito da una diammina e una diimmina e sono in equilibrio con la forma cationica incolore. Il secondo step di ossidazione porta alla formazione della specie totalmente ossidata (diimmina) dal colore giallo. Ogni specie ha uno spettro di assorbimento specifico: la forma non ossidata (incolore) ha un picco di assorbimento a 285 nm, il complesso a trasferimento di carica ha picco di assorbimento a 370 nm e 652 nm, mentre la forma diimmina ha picco a 450 nm [73].

L'acidificazione della soluzione induce il passaggio da CTC a forma di diimmina totalmente ossidata, portando il colore blu-verde a giallo con picco di assorbimento a 450 nm.

## 2.6 Metodi di immobilizzazione di enzimi

Con il termine enzima immobilizzato si intende una biomolecola che è fisicamente attaccata ad un supporto preservando allo stesso tempo la sua attività catalitica. In questo modo, l'attività dell'enzima può essere sfruttata continuamente ed esso è riutilizzabile in quanto facilmente separabile dalla soluzione contenente il suo substrato [74]. Le variabili in gioco in questa fase sono molteplici. Le proprietà chimiche e fisiche della superficie su cui la proteina viene immobilizzata sono di grande rilievo. Le principali caratteristiche che il materiale di supporto dovrebbe presentare sono: stabilità termica e chimica, biocompatibilità, alta affinità per gli enzimi, presenza di gruppi funzionali reattivi, disponibilità e prezzi contenuti [75]. I principali materiali utilizzati si possono suddividere in supporti inorganici e organici i quali a loro volta possono dividersi in supporti organici naturali e sintetici [75]. In Tabella 2.1 si riportano alcuni esempi di materiali impiegati nell'immobilizzazione enzimatica.

Tabella 2.1: Esempi di materiali di supporto utilizzati nell'immobilizzazione enzimatica [75]–[78].

Inorganici	Organici	
	Naturali	Sintetici
Allumina	Cellulosa	Resine acriliche
Materiali a base carbonio	Agarosio	Polimeri polichetonici
Zeoliti	Chitosano	Polipropilene
Silice mesoporosa	Collagene	Polivinil-alcol
Oro		

Esistono diversi metodi con cui è possibile immobilizzare le biomolecole e sono brevemente trattati di seguito.

*Adsorbimento:* il metodo di immobilizzazione per adsorbimento è ampiamente utilizzato e si basa sulla creazione di interazioni deboli aspecifiche di tipo Van-der-Waals, idrofobiche ed elettrostatiche e ponti idrogeno tra enzima e superficie [79]. È una tecnica economica che prevede un basso consumo di tempo e reagenti [74]. Si basa sulla solubilizzazione dell'enzima in un buffer e il successivo contatto della soluzione contenente l'enzima con la superficie per un determinato periodo di tempo. Dopo l'incubazione l'enzima non adsorbito viene lavato via. Lo svantaggio di questa tecnica di immobilizzazione sta nella debolezza del legame con la superficie ed è possibile che l'attività enzimatica cali a causa dell'eccessivo impacchettamento delle biomolecole poiché non vi è un controllo della densità di molecole immobilizzate [76].

*Legame covalente:* il metodo di immobilizzazione per legame covalente consiste nella creazione di un legame covalente tra due gruppi funzionali: uno caratteristico della superficie e l'altro dell'enzima. Perché l'immobilizzazione sia efficiente è necessario che il gruppo funzionale appartenente all'enzima e coinvolto nel legame non sia essenziale per l'attività enzimatica [80]. Il vantaggio di questo metodo di immobilizzazione è la solidità del legame, mentre lo svantaggio sta nella facile distorsione della struttura funzionale dell'enzima che può causare la sua inattivazione. Nel caso in cui la superficie non presentasse gruppi funzionali utili per la creazione del legame covalente con la biomolecola, vengono condotti trattamenti superficiali per rendere reattiva la superficie come ad esempio trattamenti al plasma [81].

Il processo di immobilizzazione per legame covalente solitamente prevede due step, l'attivazione della superficie seguita dalla formazione del legame biomolecola-superficie. I gruppi funzionali degli enzimi che sono più frequentemente coinvolti nell'immobilizzazione covalente sono  $-NH_2$ ,  $-COOH$  ed  $-SH$ . Come già anticipato, spesso è necessario uno step di attivazione dei gruppi funzionali presenti sulla superficie del supporto. Ne sono un esempio gli ossidrilici caratterizzanti i supporti poliossidrilici (es. vetro poroso). I gruppi ossidrilici superficiali sono attivati e resi maggiormente reattivi con bromuro di cianogeno (CNBr) come mostrato in Figura 2.9 [82].

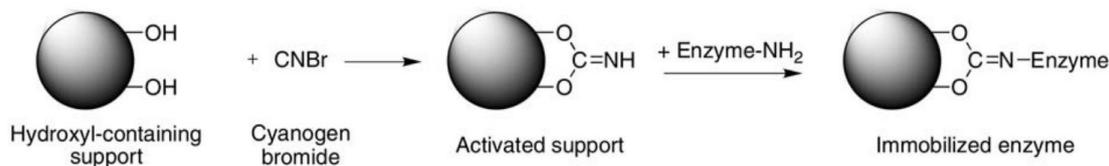


Figura 2.9: Immobilizzazione enzimatica su supporti contenenti idrossili tramite attivazione con CNBr[82].

Il CNBr rappresenta una molecola *linker* ossia una molecola corta multifunzionale in grado di legarsi sia all'enzima che alla superficie, facendo così da ponte tra i due [74].

Per attivare i gruppi carbossilici della superficie e permetterne il legame diretto con i gruppi amminici dell'enzima vengono sfruttate le carbodiimmidi. Un esempio è l'impiego di 1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDC) e Sulfo-N-idrossisuccinimmide (s-NHS): quest'ultimo rende più efficiente la fase di attivazione a cui seguirà l'immobilizzazione della biomolecola come verrà meglio approfondito nella sezione 5.2.6.1 [83].

*Intrappolamento*: è un metodo che viene applicato principalmente a matrici di tipo polimerico. In questo tipo di immobilizzazione l'enzima non è legato alla superficie, ma risulta "intrappolato" all'interno delle maglie del network polimerico in cui è inserito. La biomolecola ha possibilità di svolgere la sua funzione poiché il substrato e il prodotto sono in grado di diffondere attraverso il network polimerico, mentre l'enzima risulta bloccato all'interno [84]. Il vantaggio di questa tecnica è che l'enzima non risulta essere distorto nella sua configurazione tridimensionale in quanto non interagisce con la matrice polimerica in cui è inserito, risultando quindi stabile. Tuttavia, il substrato ha maggiori difficoltà a raggiungere il sito attivo dell'enzima rispetto a quella riscontrata con gli altri metodi di immobilizzazione [74], [85].

*Cross-linking*: questo metodo di immobilizzazione prevede la creazione di legami covalenti tra molecole di enzima grazie alla presenza di una molecola che funge da *linker* come per esempio la glutaraldeide. In questo modo è possibile formare degli aggregati di enzimi che risultano chimicamente più stabili, ma meccanicamente fragili (Cross-Linked Enzymes Crystals (CLECs) e Cross-Linked Enzymes Aggregates (CLEAs) [74]. È possibile legare queste strutture ad una superficie, secondo uno dei tre meccanismi trattati sopra, ma l'attività della macrostruttura enzimatica tende a calare [86].



### 3 Biosensori

Un biosensore si definisce come un dispositivo compatto all'interno del quale sono integrati un elemento di riconoscimento di natura biologica ed un trasduttore di segnale [87]. L'elemento di riconoscimento può essere costituito da enzimi, acidi nucleici, anticorpi, organelli cellulari, tessuti o cellule ed è l'elemento sensibile alla presenza dell'analita di interesse [87]. L'interazione specifica tra l'elemento di riconoscimento e l'analita comporta la modifica di una o più proprietà fisico-chimiche dell'ambiente circostante (pH, temperatura, proprietà ottiche, proprietà elettriche). Se necessario, ciò viene processato dal trasduttore e convertito in un segnale fisico misurabile che consente di acquisire informazioni quantitative o semiquantitative sull'analita preso in esame [88].

Le principali caratteristiche che un biosensore deve possedere sono [89]:

- specificità: indica la capacità del biosensore di essere sensibile solo nei confronti dell'analita bersaglio;
- riproducibilità: indica la ripetibilità della misura a parità di condizioni ambientali;
- linearità: ossia la presenza di un range di concentrazioni di analita in cui si ha proporzionalità diretta con il segnale in uscita dal biosensore. Questa caratteristica può essere associata alla risoluzione del biosensore ossia al minimo cambiamento nella concentrazione di analita che può essere riconosciuto dal biosensore;
- stabilità: indica la tendenza del funzionamento del biosensore ad essere influenzato da cambiamenti nelle condizioni ambientali.
- sensibilità: parametri importanti nella definizione della sensibilità di un biosensore sono il *limit of detection* (LOD) ossia la minima quantità di analita che può essere rilevata dal sensore ma non necessariamente quantificata e il *limit of quantification* (LOQ) ossia la minima quantità di analita che può essere quantificata con precisione dal sensore [90].

In base al tipo di interazione che si stabilisce tra il recettore e la molecola target è possibile effettuare una prima categorizzazione dei biosensori in catalitici e di affinità [3], [88].

- biosensori catalitici: in questa classe di biosensori l'elemento di riconoscimento catalizza una reazione che coinvolge l'analita. Si ha dunque la generazione di un prodotto la cui concentrazione è correlabile alla concentrazione di analita;
- biosensori di affinità: il principio su cui si basa questa classe di biosensori è la formazione di un legame specifico e duraturo dell'elemento di riconoscimento con l'analita di interesse. In questo tipo di biosensori non si ha la modifica della molecola target, ma dato il legame di questa con l'elemento di riconoscimento si può correlare un cambiamento nelle proprietà dell'elemento di riconoscimento proporzionale alla concentrazione dell'analita stesso che è possibile misurare grazie all'azione del trasduttore [91].

La caratteristica degli elementi di riconoscimento biologici di instaurare interazioni altamente specifiche con una molecola target li porta ad essere ulteriormente sotto classificati in base alla natura dell'elemento di riconoscimento. Si possono evidenziare:

- Biosensori enzimatici: biosensori in cui l'elemento di riconoscimento è un enzima, identificabile come un catalizzatore biologico altamente specifico verso un composto definito substrato.
- Immunosensori: dispositivi che sfruttano anticorpi come elementi di riconoscimento per rilevare l'antigene specifico, ovvero la molecola che sono in grado di legare ad elevata

affinità. L'interazione anticorpo-antigene è altamente specifica, pertanto questo permette di rilevare l'antigene anche in presenza di altre sostanze interferenti [88].

- Biosensori basati su acidi nucleici: l'elemento di riconoscimento è costituito da catene di acidi nucleici e sfruttano l'affinità specifica tra catene complementari. Un esempio sono gli aptasensori che presentano come elemento sensibile un aptamero (singola catena oligonucleotidica di RNA o DNA artificiale) che viene sfruttato per rilevare composti target altamente specifici quali proteine, virus, batteri [92].
- Biosensori basati su cellule: gli elementi sensibili sono cellule o organelli cellulari che permettono di identificare specifiche molecole. Le cellule vitali utilizzano le funzioni metaboliche nell'interazione con la molecola di interesse. Uno svantaggio di questa classe di elementi di riconoscimento è legato alla minore specificità dovuta alla presenza di enzimi che possono rendere il segnale in uscita di più difficile interpretazione [93].

Un altro sistema di classificazione riguarda il sistema di trasduzione del segnale dato dall'interazione tra l'analita e l'elemento di riconoscimento. Le principali categorie sono [92]:

- Biosensore ottico: si ha la registrazione di una variazione delle proprietà ottiche del sistema conseguentemente all'interazione elemento di riconoscimento-analita. Solitamente sono basati su fluorescenza, diffrazione ottica o su di un segnale colorimetrico [94].
- Biosensore elettrochimico: viene registrato un cambiamento nelle proprietà elettriche del sistema in seguito all'interazione dell'elemento di riconoscimento con l'analita. Di conseguenza, la reazione catalizzata dall'elemento sensibile comporta la produzione o il consumo di elettroni o ioni, così da indurre un cambiamento nelle proprietà elettriche della soluzione. Si distinguono biosensori amperometrici, potenziometrici e di impedenza a seconda della caratteristica elettrica monitorata.
- Biosensore calorimetrico: presenta un sensore di temperatura che permette di misurare il calore della reazione correlata all'interazione elemento di riconoscimento-analita.
- Biosensore piezoelettrico: sfrutta la variazione della frequenza di risonanza di un cristallo piezoelettrico che varia proporzionalmente alla massa di analita legato (sensore di massa).

In Figura 3.1 si mostra la struttura e il principio di funzionamento di un biosensore.

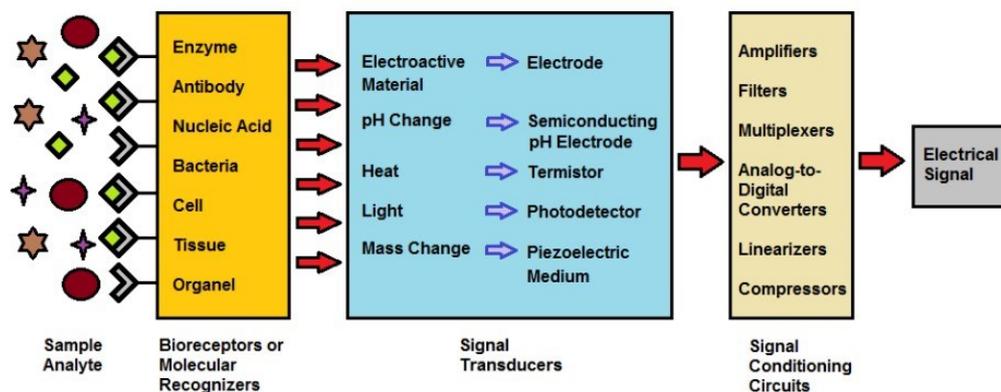


Figura 3.1: Schema di funzionamento di un biosensore [95].

Come si può dedurre dalle diverse classificazioni sopra trattate, il mondo dei biosensori risulta variegato e complesso e unisce diverse branche della scienza, dalla biologia, alla chimica, alla fisica e all'ingegneria. Quello dei biosensori è infatti un settore di ricerca in costante sviluppo.

Il primo biosensore realizzato fu un biosensore amperometrico enzimatico per il rilevamento di glucosio in ambito medico. Furono L.C. Clark e C. Lyons che nel 1962 svilupparono un dispositivo costituito da un elettrodo rivestito con una membrana per dialisi imbevuta con della GOx. Il segnale amperometrico era fornito dal decremento della concentrazione di ossigeno causato dall'azione catalitica della GOx sul glucosio presente [96]. A seguire, nel 1967 Updike e Hicks svilupparono un altro modello di “*enzyme electrode*” immobilizzando della GOx in un gel di poliacrilammide su una superficie di un elettrodo per la determinazione del glucosio in soluzione e da tessuti in vitro [97]. I primi biosensori sviluppati sono stati, pertanto, biosensori enzimatici amperometrici e nei decenni successivi sono stati realizzati nuovi accoppiamenti tra sistemi di trasduzione del segnale e altri elementi di riconoscimento [98].

Negli ultimi anni gli sforzi compiuti sono stati rivolti alla realizzazione di biosensori dalla struttura miniaturizzata e compatta tale per cui il dispositivo permetta un'analisi del campione automatizzata con necessità di bassi volumi di reagenti e di soluzione da analizzare. Dispositivi di questo tipo rientrano sotto il termine “*Lab-On-A-Chip*”, in cui viene riprodotto all'interno del dispositivo un processo da laboratorio in scala ridotta con conseguente minor consumo di energia, reagenti e tempo, garantendo allo stesso tempo la portabilità dell'analisi, non possibile utilizzando la classica strumentazione da laboratorio [3].

L'aspetto fondamentale è la creazione di fluidiche che consentano la manipolazione di un basso volume di soluzione da analizzare. Questo rappresenta un grosso vantaggio per un biosensore, in quanto aumenta la rapidità nella risposta, diminuendo la distanza tra analita ed elemento di riconoscimento, inibendo l'influenza del trasferimento di massa rispetto a dispositivi in cui il volume di soluzione da analizzare è maggiore [99], [100].

La realizzazione di sistemi integrati miniaturizzati in cui sono presenti fluidiche e sistemi di pompaggio rappresenta un *hot-spot* su cui numerosi gruppi di ricerca si stanno concentrando. Questi sistemi definibili come *Point-Of-Care* (POC) danno la possibilità di concentrare nel dispositivo il trattamento di campioni a matrice complessa poiché azioni quali separazione, diluizioni, *mixing* con altri reagenti, analisi del campione e lettura del segnale sono automatizzate nel dispositivo e possono svolgersi direttamente sul campo [1].

### 3.1 Biosensori enzimatici

Come già accennato, i biosensori enzimatici sono stati i primi ad essere sviluppati questo anche grazie alla disponibilità e alla facilità di isolamento e purificazione degli enzimi da diverse fonti [101].

Dal punto di vista storico i primi biosensori enzimatici sviluppati sono quelli amperometrici. Questa classe di biosensori ha subito un'evoluzione nel corso degli anni: si possono, infatti, riconoscere tre generazioni di biosensori amperometrici. La prima generazione si basa sul modello del biosensore di glucosio sviluppato da Clark nel 1962 e prevede la diffusione di specie quali O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verso la superficie dell'elettrodo. Infatti, l'elemento di riconoscimento non è legato direttamente alla superficie del trasduttore, ma si trova intrappolato in una membrana semipermeabile. La seconda generazione, sviluppata negli anni 80, prevede la presenza di un mediatore di reazione, il quale diffonde verso la superficie dell'elettrodo. Nella terza, si ha l'immobilizzazione diretta dell'elemento di riconoscimento sulla superficie

dell'elettrodo e un passaggio diretto degli elettroni coinvolti nella reazione di ossidoriduzione dal sito attivo dell'enzima all'elettrodo [102]. Uno schema delle tre generazioni di biosensori enzimatici amperometrici è mostrato in Figura 3.2.

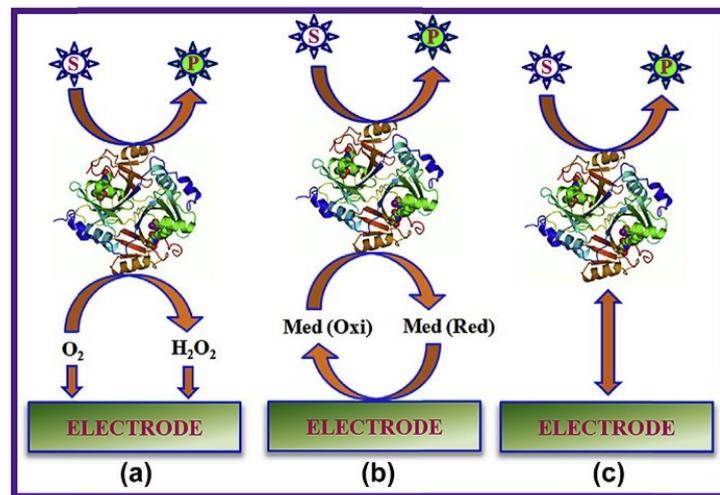


Figura 3.2: Prima (a), seconda (b) e terza (c) generazione dei biosensori enzimatici amperometrici [103].

L'evoluzione dei biosensori enzimatici ha visto l'integrazione di sistemi di trasduzione basati su principi fisici diversi: di rilievo sono i biosensori ottici [104].

Guardando nuovamente alla storia, il primo prototipo di biosensore enzimatico ottico è stato sviluppato nel 1957 ed è rappresentato da un *pad* di carta con all'interno co-immobilizzate GOx e HRP. Il segnale in uscita, di tipo colorimetrico, era dato dall'ossidazione della o-tiolidina e permetteva un'analisi semiquantitativa della concentrazione di glucosio in soluzione. Da questa prima soluzione sono stati implementati diversi sistemi di trasduzione del segnale ottico basati su principi fisici quali: assorbanza, chemiluminescenza, fluorescenza e la formazione di plasmoni di risonanza superficiali (SPR) [105].

Gli ambiti in cui trovano applicazione i biosensori enzimatici sono molteplici: ambientale [106], controllo qualità e processi nell'industria alimentare [107], diagnosi e monitoraggio in ambito medico [101]. L'analita maggiormente preso in considerazione in questi ultimi due settori è rappresentato dal glucosio. Il glucosio rappresenta un analita di cruciale interesse per il monitoraggio del diabete in ambito medico e pertanto in letteratura si trovano molti studi per lo sviluppo di biosensori enzimatici volti all'analisi di questa molecola in diversi fluidi corporei dal sangue [102], alla saliva [108], all'urina [109], alle lacrime [110].

Nel settore alimentare la determinazione del glucosio è importante per quanto concerne ad esempio la fermentazione nella produzione dei vini [111] o il livello di zucchero in bevande quali succo d'arancia [107].

## 3.2 Biosensori e stampa 3D

I materiali tradizionalmente utilizzati per la realizzazione di dispositivi microfluidici sono silicio, vetro e polimeri quale il polidimetilsilossano (PDMS) [2], [100], [112], [113]. La maggiore problematica nella realizzazione di dispositivi di questo tipo sta nel numero di passaggi che porta alla realizzazione della struttura finale e nell'utilizzo di materiali e reagenti tossici [113]. Alcune delle tecniche di lavorazione tradizionalmente utilizzate sono: litografia [4], *hot embossing*, *soft lithography* e *casting*. Le tecnologie di *soft lithography* e *casting*, solitamente utilizzate per la realizzazione di dispositivi in PDMS, sono tecniche di stampa che prevedono la presenza di un calco del negativo della geometria che si vuole realizzare. Questo comporta una maggiore lentezza nella realizzazione di prototipi a livello laboratoriale in quanto per modificare il design dell'oggetto stampato deve essere prima costruito un nuovo stampo. Inoltre, la riproducibilità del dispositivo è bassa e dispendiosa dal punto di vista economico e del tempo impiegato per realizzarla [113]. Allo stesso tempo non è sempre possibile realizzare tutte le geometrie necessarie per lo sviluppo di un LOC. In tal senso, la stampa 3D si sta affermando come strumento di grande rilievo poiché permette di realizzare strutture complesse in poco tempo e con alta precisione e riproducibilità [114]. La stampa 3D consente di realizzare in un singolo step di lavoro una struttura complessa senza necessità di assemblaggio o di lunghi processi di rifinitura e permette un rapido sviluppo di prototipi grazie alla possibilità di modificare la forma dell'oggetto finale agendo solo a livello digitale (modifica del CAD). Questo fa sì che l'implementazione di nuove strutture sia rapida e consenta di minimizzare i tempi che passano dallo sviluppo dell'idea del design alla sua reale attuazione fisica poiché non sono necessari passaggi intermedi quali la realizzazione di stampi (*casting*), maschere (litografia) o altri strumenti che permettano poi di realizzare il dispositivo finale abbattendo quindi tempi e costi nello sviluppo iterativo di prototipi [114]. Questo concetto, valido in generale, risulta decisamente vantaggioso nella realizzazione di dispositivi che rientrano nella (bio)sensoristica. In particolare, l'unione dell'alta selettività, specificità e rapidità nella risposta dei biosensori unita alla flessibilità nella realizzazione della struttura del dispositivo ad oggi pone la tecnologia di stampa 3D in primo piano e pertanto sono numerosi gli studi che negli ultimi anni sono stati portati avanti per la realizzazione di biosensori stampati 3D [115]. In Figura 3.3 si riporta un grafico che mostra quanto siano cresciute negli ultimi anni le ricerche nell'ambito dei (bio)sensori stampati 3D.

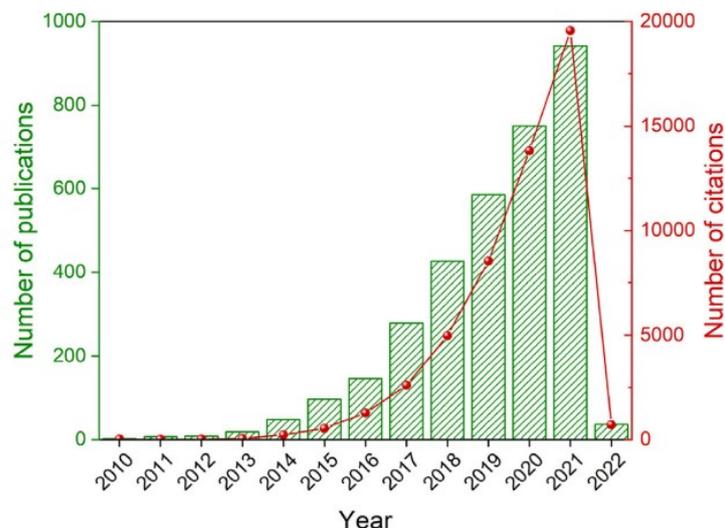


Figura 3.3: Numero di pubblicazioni scientifiche (istogramma verde) e citazioni (curva rossa) all'anno relative a sensori stampati 3D nel periodo 2010-2022 (aggiornate a gennaio 2022) [115].

L'AM risulta una tecnologia innovativa oltre che per il *rapid prototyping* anche per quanto concerne lo sviluppo di strutture funzionali, quali i dispositivi di bioriconoscimento. Attraverso l'additive manufacturing è possibile ridurre non solo il tempo necessario per la realizzazione di strutture complesse, ma anche le fasi di modifica superficiale necessarie per legare le biomolecole (in particolare se comparate con il PDMS) [13], [116].

La sfida principale è quella di unire la complessità delle geometrie realizzate ad una funzionalità intrinseca dell'oggetto e consentire lo sviluppo di dispositivi reattivi e spendibili in svariati settori, dalla sensoristica allo sviluppo di reattori [13]. La tecnologia di stampa 3D che maggiormente risulta flessibile per la realizzazione di dispositivi di questo tipo è la stereolitografia SLA/DLP [116]. Il primo approccio per la realizzazione di biosensori stampati 3D vede l'immobilizzazione dell'elemento di bioriconoscimento come fase successiva alla stampa dell'oggetto e a seguito di eventuali trattamenti superficiali dell'oggetto stampato [117]. Ulteriore sviluppo della stampa 3D con applicazioni all'ambito bioanalitico è quello di immobilizzare l'elemento di bioriconoscimento nella matrice polimerica durante la fase di stampa. Ne è un esempio la realizzazione di idrogeli di PEGDA con all'interno intrappolate GOx e HRP per ottenere l'elemento di riconoscimento del biosensore realizzata da Mandon et al. (2017)[118]. In questo caso la tecnologia DLP risulta vincente per ottenere rapidamente l'oggetto finale in quanto le formulazioni utilizzate e le basse temperature coinvolte nel processo permettono di mantenere attive le biomolecole a seguito del processo di stampa [116].

Approccio sinergico ai due sopra elencati è rappresentato da quello che fa da sfondo a questo lavoro di Tesi, ossia un'ingegnerizzazione della formulazione con cui verrà realizzato l'oggetto al fine di ottenere una superficie intrinsecamente funzionalizzata e che ben si presta all'immobilizzazione delle biomolecole grazie all'esposizione di un numero controllato di gruppi funzionali -COOH [119], [120].

## 4 Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è la realizzazione di un biosensore enzimatico stampato 3D per il rilevamento di glucosio in soluzione con misura del segnale di tipo colorimetrico.

Gli enzimi utilizzati sono la GOx da *Aspergillus niger* e l'HRP da *Armoracia rusticana* e la generazione del segnale ottico è data dall'ossidazione di TMB, substrato dell'enzima HRP.

Il principio di funzionamento del biosensore, oggetto di questo lavoro di Tesi, è l'instaurarsi di una reazione a cascata catalizzata da GOx e HRP, co-immobilizzati all'interno della struttura fluidica del dispositivo stampato 3D. La prima fase prevede la trasformazione del  $\beta$ -D-glucosio da parte della GOx con conseguente liberazione di una mole di  $H_2O_2$  per ogni mole di glucosio reagito. Il perossido di idrogeno ossida la molecola di TMB con un rapporto 1:2 grazie all'azione catalitica della HRP. Infine, dal segnale colorimetrico misurato è possibile risalire alla concentrazione di glucosio in soluzione.

Innanzitutto, è stato condotto uno studio dell'attività dei due enzimi GOx e HRP in soluzione, al fine di ottenere i loro parametri cinetici e poi confrontarli con quelli mostrati dagli enzimi immobilizzati su campione stampato.

Il dispositivo è stato realizzato grazie alla tecnologia della DLP. In primo luogo, è stato scelto il materiale polimerico migliore per la realizzazione del biosensore. I criteri di selezione sono riassumibili nel comportamento della resina in fase di stampa e nell'efficienza che questa presenta con gli enzimi in fase di immobilizzazione.

Una volta individuato il materiale polimerico di elezione, il lavoro è proseguito su due fronti:

- l'ottimizzazione dei parametri di immobilizzazione degli enzimi al fine di ottenere un buon segnale colorimetrico. L'obiettivo perseguito è stato quello di co-immobilizzare gli enzimi sulla superficie polimerica per permettere l'instaurarsi di un processo di reazione a cascata.
- la progettazione e la realizzazione di un dispositivo microfluidico stampato 3D per ottimizzare il processo di sviluppo e facilitare la lettura del segnale dell'analita.



## 5 Materiali e metodi

In questo capitolo verranno presentati i materiali e i metodi impiegati durante questo lavoro di Tesi per ottenere il dispositivo finale ed effettuarne le caratterizzazioni. Nel Paragrafo 5.1 saranno presentati i materiali e la strumentazione sfruttata per la creazione della struttura del dispositivo e dei campioni adoperati negli studi preliminari di immobilizzazione enzimatica superficiale. Nel Paragrafo 5.2 verranno presi in esame i materiali sfruttati per realizzare l'elemento sensibile del biosensore, le relative tecniche di caratterizzazione ed i protocolli ottimizzati.

### 5.1 Materiali, metodi e strumentazione relativi alla stampa 3D

Questa sezione sarà dedicata a descrivere le resine fotoreticcolabili su cui sono stati effettuati gli studi preliminari che hanno permesso di selezionare il materiale più adatto alla costruzione del dispositivo finale e all'identificazione del protocollo ottimale per la co-immobilizzazione enzimatica in dispositivo. Come già anticipato, i criteri di scelta seguiti riguardano sia il comportamento della formulazione in fase di stampa, che l'efficienza di immobilizzazione degli enzimi che essa garantisce. Inoltre, saranno presentati gli strumenti utilizzati per l'ottenimento e la caratterizzazione dei campioni.

#### 5.1.1 Resine

I materiali selezionati per la costruzione del dispositivo finale, sono stati definiti sulla base di studi precedenti [120]; le resine esaminate sono tutte diacrilate e sono elencate di seguito:

- Bisfenolo A Etossilato Diacrilato Mn ~ 512 EO/phenol 2 (BEDA) (Figura 5.1). Questo monomero presenta una struttura caratterizzata da due anelli aromatici che contribuiscono a rendere la resina piuttosto viscosa (800-1200 cps a 25 °C [121]);
- 1,6 Esandiolo Diacrilato (HDDA) (Figura 5.2). Questo monomero presenta una struttura centrale alifatica costituita da sei atomi di carbonio che rende la resina poco viscosa ed è ottenuto per esterificazione di 1,6 Esandiolo con Acido Acrilico [122];
- Polietilenglicole Diacrilato Mn ~ 575 (PEGDA) (Figura 5.3). Questo monomero presenta una struttura centrale data dalla ripetizione di gruppi etilenossido che conferisce alla resina una viscosità circa di 40-70 cps a 25 °C [123].

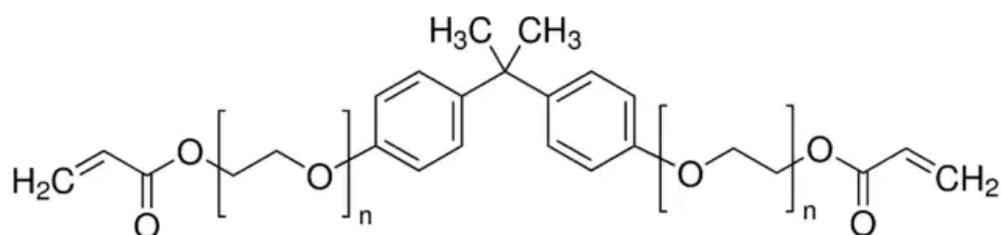


Figura 5.1: Struttura molecolare di BEDA Mn ~ 512 [121].

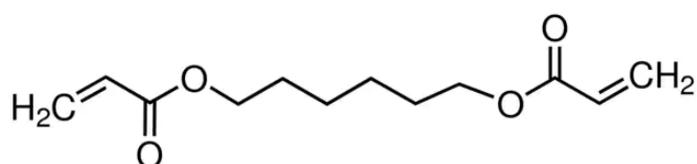


Figura 5.2: Struttura molecolare dell'HDDA [124].

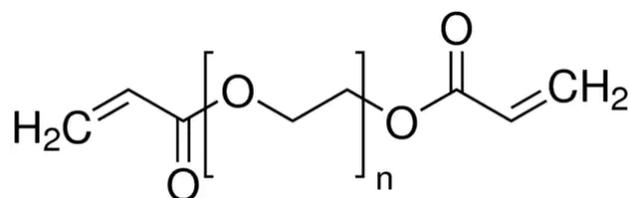


Figura 5.3: Struttura molecolare del PEGDA Mn ~575 [123].

Per tutte le formulazioni realizzate, il fotoiniziatore impiegato è il Fenilbis (2,4,6-trimetilbenzoi) Ossido di Fosfina (BAPO) (Figura 5.4). Il BAPO è un fotoiniziatore radicalico UV di tipo I [125].

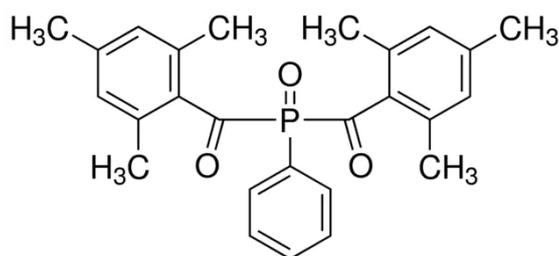


Figura 5.4: Struttura molecolare BAPO [126].

Al fine di aggiungere funzionalità carbossiliche al materiale di base, è stato aggiunto acido acrilico alla resina, la cui struttura molecolare è riportata in Figura 5.5. L'acido acrilico è il più semplice acido carbossilico insaturo che presenta un doppio legame C=C. La sua aggiunta alla formulazione comporta un cambiamento delle proprietà reologiche e della stampabilità della formulazione, oltre ad una modifica delle funzionalità esposte sulla superficie del dispositivo una volta stampato. Questo ultimo aspetto impatterà sia sulla fase di immobilizzazione degli enzimi, che sulla definizione del grado di idrofobicità della superficie.

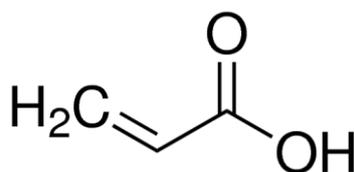


Figura 5.5: Struttura molecolare dell'acido acrilico [127].

Le formulazioni principali prese in esame in questo lavoro di Tesi sono riportate in Tabella 5.1. Il nome con cui verranno richiamate nei prossimi Capitoli è quello riportato nella prima colonna della Tabella 5.1.

Tabella 5.1: Composizione delle principali formulazioni utilizzate. Le formulazioni a base BEDA prevedono l'aggiunta di 100  $\mu$ l di acetone per grammo di formulazione al fine di facilitare la solubilizzazione del fotoiniziatore. <sup>1</sup> Con il termine phr (per hundred resin) si indica la quantità di additivo (nel caso specifico rappresentato dal fotoiniziatore BAPO) da inserire a 100 parti della formulazione di base.

Formulazione	Resina [wt%]	Acido Acrilico [wt%]	Volume di acetone su grammo di formulazione [ $\mu$ l]	BAPO [phr] <sup>1</sup>
BEDA	100	-	100	2
BEDA 10%AA	90	10		
HDDA	100	-	-	
HDDA 10%AA	90	10		
PEGDA	100	-		
PEDA 10%AA	90	10		

### 5.1.2 ASIGA MAX X27 UV385

La stampante 3D utilizzata per ottenere i campioni è la Asiga MAX X27 UV385 (Figura 5.6). Questa è una stampante DLP con sorgente luminosa a LED centrata a 385 nm e con risoluzione dei pixel sul piano x-y di 27  $\mu$ m. La piattaforma di crescita ha una superficie utile di 51.8  $\times$  29.2 mm<sup>2</sup> e l'altezza massima che può essere raggiunta dagli oggetti stampati è di 75 mm [128]. Il setup di lavoro è di tipo bottom-up, pertanto, l'oggetto viene cresciuto capovolto e a muoversi è la piattaforma di crescita.

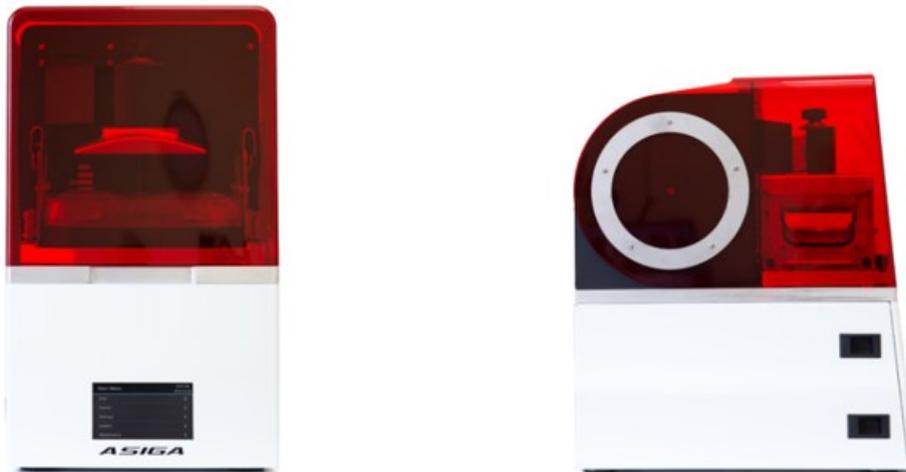


Figura 5.6: ASIGA MAX X27. Immagine modificata da [128].

Tutti i CAD elaborati in questo lavoro di Tesi sono stati realizzati con il software SOLIDWORKS e convertiti in formato STL per essere poi inviati alla stampante per mezzo del software Asiga Composer [128]. Questo software permette di modificare i parametri di stampa e di disporre i modelli da stampare sulla piattaforma di crescita. I parametri di stampa principali su cui si è intervenuti per ottenere una buona *print fidelity* sono stati: spessore del layer, tempo di irraggiamento, intensità di illuminazione. È possibile suddividere il CAD in diversi range di stampa e diversificare i parametri tra un range e l'altro. I primi *layer* stampati sono definiti "*layer di Burn-in*" e sono caratterizzati da una dose di irraggiamento maggiore rispetto ai successivi per far sì che venga raggiunto un grado di reticolazione maggiore e dunque venga garantita un'adesione alla piattaforma di crescita sufficiente a sorreggere l'oggetto. Dopo la stampa del modello, tipicamente si esegue un lavaggio in solvente per rimuovere la resina in eccesso, seguito da un irraggiamento in un fornetto UV (*post curing*), per aumentarne il grado di reticolazione.

#### 5.1.2.1 Parametri e protocollo di stampa per i campioni

I principali parametri di stampa (spessore dello strato ed intensità di illuminazione) sono comuni a tutte le formulazioni utilizzate, sia negli studi preliminari di immobilizzazione enzimatica (esperimenti descritti nei Paragrafi 6.1, 6.2, 6.3 e 6.5) che nelle cinetiche enzimatiche su provino con enzima immobilizzato (Paragrafo 6.6) e sono riportati in Tabella 5.2. L'unico parametro modificato a seconda della resina stampata è il tempo di esposizione. I tempi di esposizione per le diverse formulazioni della Tabella 5.1 sono riportati in Tabella 5.3.

Tabella 5.2: Parametri di stampa comuni alle formulazioni riportate in Tabella 5.1 utilizzate per la realizzazione dei campioni impiegati negli studi di immobilizzazione.

Parametro	Burn-in	Range 1	Unità di misura
Print range da	0	0.3	mm
Print range a	0.3	0.9	mm
Spessore dello strato	0.15	0.15	mm
Intensità luminosa	25	25	mW/cm <sup>2</sup>

Tabella 5.3: Tempi di esposizione per le diverse formulazioni riportate in Tabella 5.1 utilizzate per la realizzazione dei campioni impiegati negli studi di immobilizzazione.

Formulazione	Tempo di esposizione Burn-in [s]	Tempo di esposizione Range 1 [s]
BEDA	2.5	1.2
BEDA 10%AA	2.5	1.2
HDDA	3	1.5
HDDA 10%AA	3	1.5
PEGDA	2	0.8
PEDA 10%AA	2	0.8

Per rimuovere la resina in eccesso si è eseguito un lavaggio immergendo il campione in etanolo per 2 minuti seguito da un *post curing* in un fornello UV di 5 minuti in doppio (per lato del provino).

### 5.1.2.2 Parametri e protocollo di stampa per la realizzazione del dispositivo

I parametri di stampa utilizzati per la realizzazione di entrambe le versioni del dispositivo (descritte nel Paragrafo 6.7) sono riportati in Tabella 5.4.

Tabella 5.4: Principali parametri di stampa utilizzati per la realizzazione del dispositivo.

Parametro	Burn-in	Range 1	Unità di misura
Print range da	0	0.3	mm
Print range a	0.3	4.5	mm
Spessore dello strato	0.1	0.1	mm
Intensità luminosa	25	25	mW/cm <sup>2</sup>
Tempo di esposizione	4	0.8	s

Per rimuovere la resina in eccesso si esegue un lavaggio in etanolo di 2 minuti seguito da un *post curing* in un fornello UV della durata complessiva di 4 minuti suddivisi in 2 minuti per lato del dispositivo.

### 5.1.3 Strumenti di caratterizzazione

Le resine stampate sono state caratterizzate mediante analisi allo spettrofotometro FTIR e definizione dell'angolo di contatto.

#### 5.1.3.1 Spettrofotometro FTIR

Lo spettrofotometro IR utilizzato è uno spettrofotometro a trasformata di Fourier (FTIR Nicolet5700, Thermo Fisher Scientific). Con questo strumento è stato possibile acquisire lo spettro di assorbimento nella regione IR dei campioni stampati. Gli spettri ottenuti riportano i picchi di assorbimento nel range di lunghezze d'onda che va da 2500 nm a 25000 nm (ossia, in frequenze, da 4000 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>). In particolare, è stato analizzato il picco di assorbimento del legame C=O a 1700 cm<sup>-1</sup> e le sue modificazioni provocate dall'aggiunta di acido acrilico alla formulazione di partenza.

#### 5.1.3.2 Angolo di contatto

Lo strumento utilizzato per monitorare l'angolo di contatto un OCA 200 (DataPhysic Instruments, Gmb). Le misure di angolo di contatto sono state effettuate con acqua distillata ed un volume della goccia pari a 1.5 µl. Il software SCA20 ha permesso di processare le immagini ottenute e valutare il valore di angolo di contatto attraverso l'applicazione di un modello ellissoidale.

## 5.2 Materiali, strumentazione e protocolli per l'immobilizzazione dell'elemento sensibile e lo sviluppo del biosensore

Di seguito verranno presentati i materiali, i protocolli e gli strumenti sfruttati per portare a compimento le analisi relative al sistema di rilevamento dell'analita del biosensore.

### 5.2.1 Materiali: enzimi e substrati

- GOx: la GOx utilizzata è estratta da *Aspergillus niger* con peso molecolare pari a 160 kDa (codice G7141, Sigma Aldrich);
- HRP: la glicoproteina utilizzata è la Type VI della Sigma Aldrich, essa ha peso molecolare pari a 44 kDa (codice P6782-10MG, Sigma Aldrich);
- Glucosio: il glucosio utilizzato è D-(+)-Glucose (codice 49139, Sigma Aldrich). Esso rappresenta il substrato per la GOx e pertanto è stato utilizzato nelle cinetiche enzimatiche di GOx in soluzione e negli sviluppi in presenza di GOx e HRP immobilizzati sia su campione che in dispositivo;
- TMB: durante questo lavoro di Tesi si è usato il TMB come substrato per HRP e precisamente in due forme: TMB - Liquid Substrate System for ELISA della Sigma Aldrich, che verrà definito “TMB commerciale” nei prossimi Capitoli, e TMB dicloridrato idrato della Sigma Aldrich. La prima è una formulazione liquida da conservarsi a 2-8 °C che, presentando al suo interno il perossido di idrogeno, è utilizzata come miscela di reazione già pronta per gli sviluppi con HRP. Il TMB dicloridrato idrato è stato sciolto in dimetilsolfossido (DMSO) e Buffer Fosfato Citrato (BFC) 50 mM pH 5.0 per realizzare il substrato liquido con cui compiere caratterizzazioni quali cinetiche enzimatiche sia in liquido che con enzima immobilizzato e sviluppi in presenza di GOx e HRP immobilizzati sia su campione che in dispositivo. La miscela di reazione finale è quindi composta da tampone BFC e DMSO 10%.
- ABTS: l’ABTS è stato utilizzato come substrato alternativo per l’HRP. Presenta una solubilità in acqua pari a 10 mg/ml [129].

### 5.2.2 Strumentazione per la caratterizzazione

#### 5.2.2.1 *Lettores di piastra*

Per le misure colorimetriche è stato usato un lettore di micropiastre MULTISKAN GO della Thermo Fisher. Questo strumento supporta micropiastre da 96 pozzetti e da 384 pozzetti, presenta una lampada allo xenon e permette di leggere l’intensità di assorbimento in un range di lunghezze d’onda che va da 200 nm a 1000 nm. La lunghezza d’onda desiderata è selezionata tramite un monocromatore. Il campione sulla micropiastra viene misurato verticalmente (dal basso in alto) [130]. La Figura 5.7 riporta lo strumento.



Figura 5.7: MULTISKAN GO con carrello portapietra estratto [130].

La legge che viene sfruttata per la rielaborazione del segnale ottico in uscita dal lettore di piastre è quella di Lambert Beer riportata nell' Eq. (5).

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

Dove  $I_0$  è l'intensità del fascio monocromatico incidente,  $I$  è quella del fascio rilevato dopo che ha attraversato la soluzione campione,  $A$  è l'assorbanza della soluzione (in questo lavoro di Tesi equiparata con il termine *densità ottica* (OD)),  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione molare della specie chimica che assorbe alla lunghezza d'onda esaminata,  $l$  è il cammino ottico percorso dalla radiazione attraverso il campione e  $c$  la concentrazione della soluzione.

### 5.2.3 Protocolli cinetiche enzimatiche in soluzione

Di seguito sono riportati i protocolli seguiti per le diverse tipologie di prove di calcolo di attività e valutazione dei parametri cinetici per HRP e GOx in soluzione.

Per questo progetto di Tesi si è reso necessario l'utilizzo di un substrato di HRP che permettesse di bloccare la reazione con  $H_2SO_4$ , così da poter condurre prove di cinetiche enzimatiche con l'enzima immobilizzato sulla superficie dei materiali stampati (vedi struttura della prova nel Paragrafo 5.2.7). Per questo motivo la scelta è ricaduta sulla molecola di TMB, nonostante non vi siano dirette fonti in letteratura con cui confrontare i parametri cinetici ottenuti nelle condizioni di buffer e pH utilizzate. La TMB oltre a possedere questa qualità, grazie alle due forme ossidate (il complesso a trasferimento di carica in equilibrio con il radicale cationico e la forma diimina), risulta essere il substrato di HRP con il più alto grado di amplificazione del segnale [72]. Le prove atte a valutare i parametri cinetici dell'HRP e della GOx che prevedono l'uso di TMB (protocolli C e D), pertanto, saranno divise in monitorate in continuo al lettore di piastre (denominate "standard") e stoppate con  $H_2SO_4$  (denominate "stoppate con  $H_2SO_4$ ") questo darà la possibilità di confrontare tra loro i parametri cinetici ottenuti nelle due modalità di analisi in soluzione (Paragrafi 6.4.1.2 e 6.4.2) e confrontare poi i parametri cinetici ottenuti con le stoppate con  $H_2SO_4$  in soluzione con quelli che verranno ricavati dalle prove di cinetica con enzimi immobilizzati su solido (Paragrafo 6.6).

#### **5.2.3.1 Protocollo A: valutazione dell'attività enzimatica dell'HRP tramite TMB**

L'attività della HRP è stata valutata con concentrazione di enzima pari a 1 ng/ml a 25 °C, con concentrazione di TMB pari a 1 mM e perossido di idrogeno pari a 4.90 mM in BFC. La lettura è stata eseguita in continuo mediante il lettore di piastre multipozzetto a lunghezza d'onda pari a 655 nm. L'attività è stata espressa in  $\mu\text{M}/\text{min}$  ed è stata valutata dalla pendenza del tratto lineare iniziale della curva OD vs tempo fornita in output dallo strumento di lettura. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato è  $3.90 \cdot 10^4 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$  [73].

#### **5.2.3.2 Protocollo B: valutazione dei parametri cinetici dell'HRP per l'ABTS**

L'attività della HRP per il calcolo dei parametri cinetici per ABTS è stata valutata con concentrazione di enzima pari a 50 ng/ml a 25 °C, concentrazione di ABTS variabile nel range 0.06 – 1 mM e perossido di idrogeno pari a 1 mM in BFC. La lettura è stata eseguita in continuo al lettore di piastre a 405 nm [131]. L'attività è stata espressa in  $\mu\text{M}/\text{min}$  ed è stata valutata dalla pendenza del tratto lineare iniziale della curva OD vs tempo, fornita in output dallo strumento di lettura. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato è  $3.68 \cdot 10^4 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$  [131].

#### **5.2.3.3 Protocollo C1: valutazione dei parametri cinetici dell'HRP per il TMB (standard)**

Le cinetiche in soluzione sono state condotte con TMB in BFC e sono state volte ad ottenere i parametri cinetici per questo substrato. Hanno previsto l'utilizzo di  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentrazione costante, pari a 4.90 mM, in modo da poter considerare questo substrato in eccesso. La concentrazione di TMB è stata fatta variare nell'intervallo 0.08-0.64 mM. La lettura in continuo è stata eseguita al lettore di piastre multipozzetto a 655 nm a 25 °C. La velocità iniziale è stata espressa in  $\mu\text{M}/\text{min}$  ed è stata valutata dalla pendenza del tratto lineare iniziale della curva OD vs tempo fornita in output dallo strumento di lettura. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato è  $3.90 \cdot 10^4 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$  [73].

#### **5.2.3.4 Protocollo C2: valutazione dei parametri cinetici dell'HRP per il TMB (stoppata con $\text{H}_2\text{SO}_4$ )**

Le cinetiche in soluzione stoppate con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  presentano gli stessi parametri delle cinetiche standard (5.2.3.3), ma la lettura viene eseguita sulla piastra da 96 pozzetti a seguito dell'interruzione della reazione a tempi definiti con uguale volume di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. Le lunghezze d'onda a cui si esegue la lettura sono 450 nm e 630 nm. L'attività è stata espressa in  $\mu\text{M}/\text{min}$  ed è stata valutata dalla pendenza del tratto lineare iniziale della curva OD vs tempo, fornita in output dallo strumento di lettura. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato è  $5.90 \cdot 10^4 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$  [73].

#### **5.2.3.5 Protocollo D1: valutazione dei parametri cinetici della GOx per il glucosio tramite TMB (standard)**

Le cinetiche in soluzione per ottenere i parametri cinetici per il glucosio di GOx sono state svolte seguendo gli studi effettuati da Zhang et al. (2016) [132] in cui l'attività di GOx viene misurata per via ottica a seguito dell'ossidazione di ABTS per opera di HRP, con  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberato grazie all'azione di GOx sul glucosio. Il protocollo seguito in questo lavoro di Tesi differisce nel substrato di HRP, che è stato TMB invece che ABTS e nella soluzione tampone in cui vengono condotti gli esperimenti che è BFC e non Buffer Fosfato Salino, pH 7.4 (PBS). La concentrazione di GOx utilizzata è 1 nM e viene letto il segnale ottico dato dall'ossidazione di TMB. La lettura è stata eseguita al lettore di piastra multipozzetto a 655 nm a 25 °C. L'attività è stata espressa in  $\mu\text{M}/\text{min}$  ed è stata valutata dalla pendenza del tratto lineare iniziale della

curva OD vs tempo, fornita in output dallo strumento di lettura. Il range di glucosio indagato arriva a 25 mM. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato è  $3.90 \cdot 10^4 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$  [73].

#### 5.2.3.6 Protocollo D2: valutazione dei parametri cinetici della GOx per il glucosio tramite TMB (stoppata con $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Le cinetiche in soluzione stoppate con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  presentano gli stessi parametri delle cinetiche standard (5.2.3.5) ad eccezione del range di glucosio indagato che va da 1.56 mM a 12.50 mM. La lettura, però, viene eseguita a seguito dell'interruzione della reazione a tempi definiti con uguale volume di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M a 450 nm e 630 nm. L'attività è stata espressa in  $\mu\text{M}/\text{min}$  ed è stata valutata dalla pendenza del tratto lineare iniziale della curva OD vs tempo, fornita in output dallo strumento di lettura. Il coefficiente di estinzione molare utilizzato è  $5.90 \cdot 10^4 \text{ l}/(\text{M} \cdot \text{cm})$  [73].

#### 5.2.4 Struttura delle cinetiche stoppate con $\text{H}_2\text{SO}_4$ in soluzione

La prova di cinetica stoppata prevede il riempimento di una piastra da 96 pozzetti con 4 concentrazioni diverse di substrato (ogni concentrazione occupa 3 colonne). L'attivazione della reazione avviene contemporaneamente per tutti i pozzetti di una riga, a seguito dell'introduzione della soluzione contenente l'enzima. La reazione su ogni riga della piastra viene stoppata con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M a tempi definiti. Al termine della reazione viene eseguita la lettura al lettore di piastra multipozzetto a 450 nm e 630 nm. Scorrendo la piastra lungo le colonne si hanno tempi di reazione crescenti, scorrendo lungo le righe si ha la concentrazione di substrato diversa ogni 3 pozzetti. Uno schema tipo della piastra da 96 pozzetti è riportato in Figura 5.8.

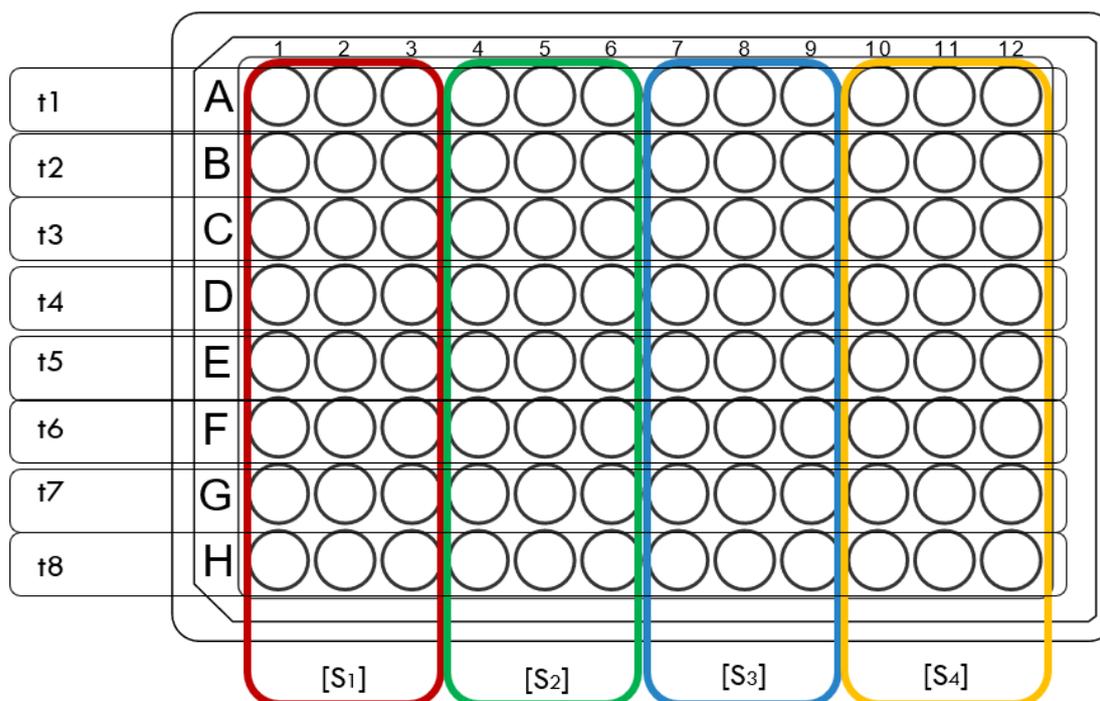


Figura 5.8: Schema di una piastra da 96 pozzetti per le prove di cinetica enzimatica stoppata con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### 5.2.5 Metodo di linearizzazione di Lineweaver-Burk

Come già anticipato, il metodo di linearizzazione delle cinetiche enzimatiche sfruttato per ottenere i parametri cinetici è stato quello di Lineweaver-Burk. In questo modello vengono riportati i reciproci delle variabili sui due assi. Nel dettaglio, sull'asse delle ascisse si ha il reciproco della concentrazione di substrato, mentre su quella delle ordinate il reciproco della velocità iniziale di reazione. In Figura 5.9 si riporta una rappresentazione grafica della linearizzazione.

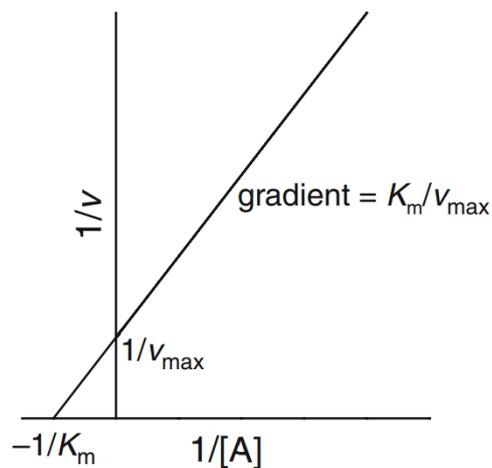


Figura 5.9: Modello di linearizzazione di Lineweaver-Burk per ottenere i parametri cinetici  $K_m$  e  $V_{max}$ . Con  $[A]$  si indica la concentrazione di substrato e  $v$  è la velocità iniziale. Immagine modificata da [51].

Data l'equazione generica della retta di interpolazione Eq.(6), i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$  si ottengono rispettivamente come riportato nella Eq.(7) e nella Eq.(8).

$$\frac{1}{v} = m \cdot \frac{1}{[A]} + q \quad (6)$$

$$K_m = \frac{m}{q} \quad (7)$$

$$V_{max} = \frac{1}{q} \quad (8)$$

## 5.2.6 Funzionalizzazione superficiale e sviluppo

### 5.2.6.1 Protocollo 1

La fase cruciale per la realizzazione di un biosensore enzimatico è l'immobilizzazione degli enzimi sulla superficie di interesse, che in questo lavoro di Tesi è rappresentata da resine fotoreticolate stampate tramite tecnologia DLP. Al fine di ottimizzare questo processo si sono compiuti studi preliminari su campioni di  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$ .

Il protocollo di immobilizzazione delle biomolecole da cui si è partiti prevede un primo step di attivazione dei gruppi carbossilici in cui è necessario l'impiego di 1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDC) e Sulfo-N-idrossisuccinimide (s-NHS) [119], [120]. EDC è un cross-linker a lunghezza zero (non inserisce catene spaziatrici), che viene spesso sfruttato per la creazione di legami ammidici tra due composti di interesse (i gruppi carbossilici esposti dalla superficie del materiale da funzionalizzare e i gruppi amminici presenti nella biomolecola). L'EDC agisce sui gruppi carbossilici formando un intermedio (*o*-acilisourea) che rende più reattivo il gruppo carbossilico nei confronti delle ammine primarie. Tuttavia, l'emivita della configurazione reattiva risulta essere estremamente breve, pertanto, per aumentare l'efficienza del processo all'EDC si accoppia s-NHS che permette la creazione di un estere stabile nel tempo e che rende i gruppi carbossilici reattivi alle ammine per un tempo utile alla creazione del legame [83]. Lo schema del processo, la cui efficienza è massima a pH fisiologici [83], è mostrato in Figura 5.10.

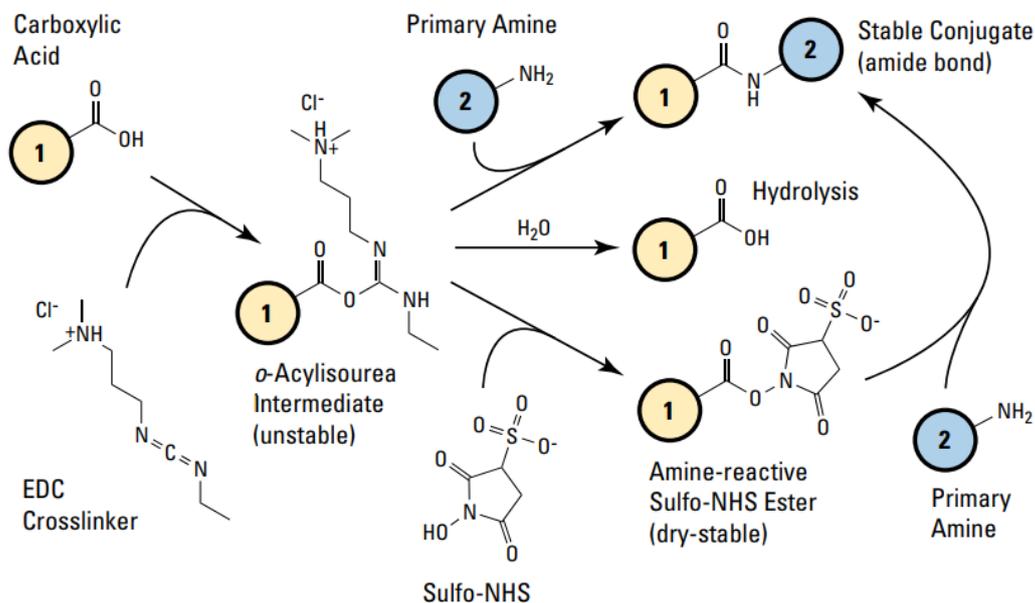


Figura 5.10: Schema del processo di attivazione dei gruppi carbossilici con EDC/s-NHS [83].

Come è possibile notare in Figura 5.10 l'intermedio *o*-acilisourea può seguire tre differenti percorsi:

- può essere allontanato dall'attacco di un'ammina primaria del composto 2 che forma un gruppo ammidico con il composto 1 formando un coniugato stabile;

- può andare incontro ad idrolisi comportando la rigenerazione del gruppo carbossilico;
- può formarsi l'estere stabile per interazione con la molecola s-NHS che, nel momento in cui collide in modo efficace con un'ammina primaria del composto 2, porta alla formazione del gruppo ammidico e ad un coniugato stabile.

Alla fase di attivazione dei gruppi carbossilici superficiali segue la fase di incubazione del campione a 4 °C *over night* (O/N). I passaggi dettagliati del Protocollo 1 sono riportati di seguito:

1. Equilibratura dei campioni nei pozzetti di una piastra da 48 pozzetti in buffer MES (acido 2-(N-morfolino)etansolfonico) 100 mM a pH 4.8 per 15 minuti su basculante con 300 µl di soluzione per campione. L'operazione è svolta due volte sostituendo il buffer. Questo primo step ha lo scopo di adattare il pH della superficie per rendere più efficace la fase di attivazione dei gruppi carbossilici con EDC, che è maggiore a pH più acidi;
2. Attivazione dei gruppi carbossilici con EDC/s-NHS 4 mM/10 mM in MES per 15 minuti su basculante con 300 µl di soluzione per campione;
3. 3 x 5 min lavaggi in PBS su basculante con 300 µl di soluzione a campione. Il buffer viene sostituito dopo ogni lavaggio. Questa fase ha lo scopo di aumentare il pH della soluzione ai valori ottimali, ai quali l'efficienza dell'immobilizzazione che avviene in presenza dell'estere dato da s-NHS è massima.
4. Incubazione O/N con soluzione in PBS contenente enzima a 4 °C, 50 µl a campione;
5. 3 x 5 min lavaggi in PBS-tween 0.05% sostituendo il buffer dopo ogni lavaggio. Questo passaggio consente di allontanare l'enzima non immobilizzato;
6. Sviluppo della reazione e blocco della stessa con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M in volume pari a quello di substrato;
7. Misurazione del segnale ottico al lettore di piastre. Le lunghezze d'onda lette sono 450 nm e 630 nm.

#### 5.2.6.2 **Protocollo 2**

La fase di immobilizzazione è stata ottimizzata su campioni 5x5x0.9 mm<sup>3</sup> al fine di aumentare la resa di immobilizzazione della GOx. Il *Protocollo 1* è stato modificato cambiando il tampone di incubazione da PBS a BFC.

#### 5.2.6.3 **Protocollo 3**

Esso prevede una modifica del *Protocollo 1* e del *Protocollo 2* eliminando la fase di attivazione delle funzionalità carbossiliche (punti 1 e 2 riportati nel Paragrafo 5.2.6.1).

#### 5.2.6.4 **Protocollo 4: immobilizzazione nel dispositivo**

A seguito dei risultati ottenuti dagli studi preliminari eseguiti su 5 x 5 x 0.9 mm<sup>3</sup> si è definito il protocollo di co-immobilizzazione enzimatica da seguire per funzionalizzare la parete interna della fluidica presente nel dispositivo finale. I diversi step del protocollo sono riportati di seguito:

1. Lavaggio dei dispositivi in 100 ml di acqua bidistillata per 1 h: questo passaggio ha lo scopo di eliminare eventuali tracce di etanolo utilizzato per i lavaggi in fase di stampa;
2. Lavaggio in BFC (3x). Per ogni lavaggio vengono fatti fluire 200 µl di BFC ripetutamente (5x) e scaricati per 2 volte dall'outlet. Infine, il terzo ricambio di liquido

di lavaggio viene lasciato all'interno (statico) per 5 minuti per poi essere scaricato e ricambiato per il lavaggio successivo;

3. Asciugatura della fluidica con azoto;
4. Incubazione O/N a 4 °C con 160 µl di soluzione in BFC contenente i due enzimi o solo uno dei due per quanto riguarda i controlli;
5. Lavaggi in BFC-tween 0.05% (3x);
6. Sviluppo della reazione blocco di questa con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M in volume pari a quello di substrato;
7. Lettura di assorbimento a 450 nm e 630 nm.

### 5.2.7 Struttura della cinetica con enzima immobilizzato su provino stoppata con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Al fine di ottenere i parametri cinetici apparenti degli enzimi HRP e GOx immobilizzati sulla superficie di un campione di resina, si è ideata una prova che ricalchi le cinetiche stoppate in soluzione descritte nella sezione 5.2.4.

In questo esperimento si pongono i provini 5 x 5 x 0.9 mm<sup>3</sup> con l'enzima immobilizzato (nel caso della cinetica di sola HRP) o con i due enzimi co-immobilizzati (nel caso della cinetica GOx/HRP), nei pozzetti di una piastra da 48 e si attiva la reazione con soluzione contenente il substrato. Per ogni concentrazione di substrato sono presenti 24 provini disposti sulle 8 righe della piastra da 48. La reazione viene attivata riga per riga e stoppata a tempi precisi. La procedura viene ripetuta per tutte le concentrazioni di substrato utilizzate. Al termine dello sviluppo completo di ogni concentrazione di substrato, vengono prelevati 200 µl di soluzione, trasferiti in una piastra da 96 pozzetti e viene eseguita una lettura a 450 nm e 630 nm. Allo stesso modo delle cinetiche stoppate in soluzione anche in questo caso lungo le righe della piastra si hanno tempi di reazione diversi e ogni tre colonne cambia la concentrazione di substrato utilizzata.

### 5.2.8 Metodologia di calcolo di LOD e LOQ del biosensore

Per definire il LOD e il LOQ del biosensore si è fatto riferimento al metodo riportato in [90]. Per calcolare questi due parametri si interpolano i dati sperimentali ottenuti nel range lineare del biosensore e si ricava la concentrazione virtuale di analita data dal segnale colorimetrico fornito dai bianchi (dispositivi in cui non è stato inserito l'analita target). Il LOD viene calcolato secondo la Eq.(9), mentre il LOQ secondo la Eq.(10).

$$LOD = X_b + 3 \cdot S_b \quad (9)$$

$$LOQ = X_b + 10 \cdot S_b \quad (10)$$

Dove  $X_b$  è la concentrazione media corrispondente al segnale in OD dei campioni incubati senza analita target ed  $S_b$  è la deviazione standard di questi valori.



## 6 Risultati e discussione

In questo capitolo verranno presentati i principali risultati del lavoro svolto. Nella prima parte saranno esposti i risultati delle caratterizzazioni effettuate per selezionare il materiale per la realizzazione del dispositivo con tecnologia DLP (Paragrafo 6.1). Successivamente saranno riportati gli studi preliminari condotti per valutare come la geometria del pezzo stampato influenzi la resa dell'immobilizzazione enzimatica (Paragrafo 6.2) e le prove di immobilizzazione enzimatica che hanno portato alla selezione della formulazione per la realizzazione del biosensore (Paragrafo 6.3). Nel Paragrafo 6.4 saranno esposte le prove cinetiche condotte sugli enzimi HRP e GOx in soluzione, che saranno messe a confronto con i parametri cinetici ottenuti per i due enzimi immobilizzati su provino (Paragrafo 6.6). Nel Paragrafo 6.5 si riporteranno gli esperimenti che hanno permesso di individuare il migliore protocollo da seguire per l'immobilizzazione degli enzimi. Il Paragrafo 6.7 sarà dedicato alla descrizione del dispositivo dal punto di vista della stampa 3D. Infine, si riporteranno gli studi di co-immobilizzazione enzimatica all'interno della fluidica del dispositivo (Paragrafo 6.8) ed il calcolo di LOD e LOQ del biosensore (Paragrafo 6.9).

### 6.1 Caratterizzazione dei materiali del dispositivo stampato

In questa sezione sono riportate e discusse le caratterizzazioni dei materiali presi in esame per la realizzazione del dispositivo finale. I parametri di stampa e il protocollo seguito per la realizzazione dei campioni utilizzati negli esperimenti riportati in questa sezione sono quelli descritti nel Paragrafo 5.1.2.1

#### 6.1.1 Spettrofotometro FTIR

In questa sezione vengono riportati gli spettri FTIR nel range  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  delle formulazioni elencate in Tabella 5.1. Tutti gli spettri sono normalizzati rispetto al picco del segnale dato dallo stretching del carbonile (legame C=O). Nel dettaglio in Figura 6.1 si riporta lo spettro di BEDA e BEDA 10%AA, in Figura 6.3 quello di HDDA e HDDA 10% AA e infine in Figura 6.5 quello di PEGDA e PEGDA 10%AA. Inoltre, viene mostrato e preso in esame un ingrandimento dello spettro nel range di frequenze  $1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  in cui si trova il segnale dello stretching del carbonile C=O collocato intorno ai  $1720 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 6.2 per BEDA e BEDA 10%AA, Figura 6.4 per HDDA e HDDA 10%AA, Figura 6.6 per PEGDA e PEGDA 10%AA). Nel dettaglio per il BEDA il picco dato da C=O risulta centrato a  $1721 \text{ cm}^{-1}$ , per HDDA a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  e per PEGDA a  $1728 \text{ cm}^{-1}$ .

Il picco centrato all'incirca a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  è caratteristico per il carbonile di un gruppo estere, presente in tutti gli acrilati. I gruppi carbossilici (COOH) dovuti all'acido acrilico hanno invece assorbimento a numeri d'onda leggermente inferiori, a  $1698 \text{ cm}^{-1}$  [119]. Pertanto, inserendo questa molecola nella formulazione, e quindi nel network polimerico, si può osservare la formazione di una spalla a più basse frequenze del picco del carbonile (Figura 6.2, Figura 6.4, Figura 6.6).

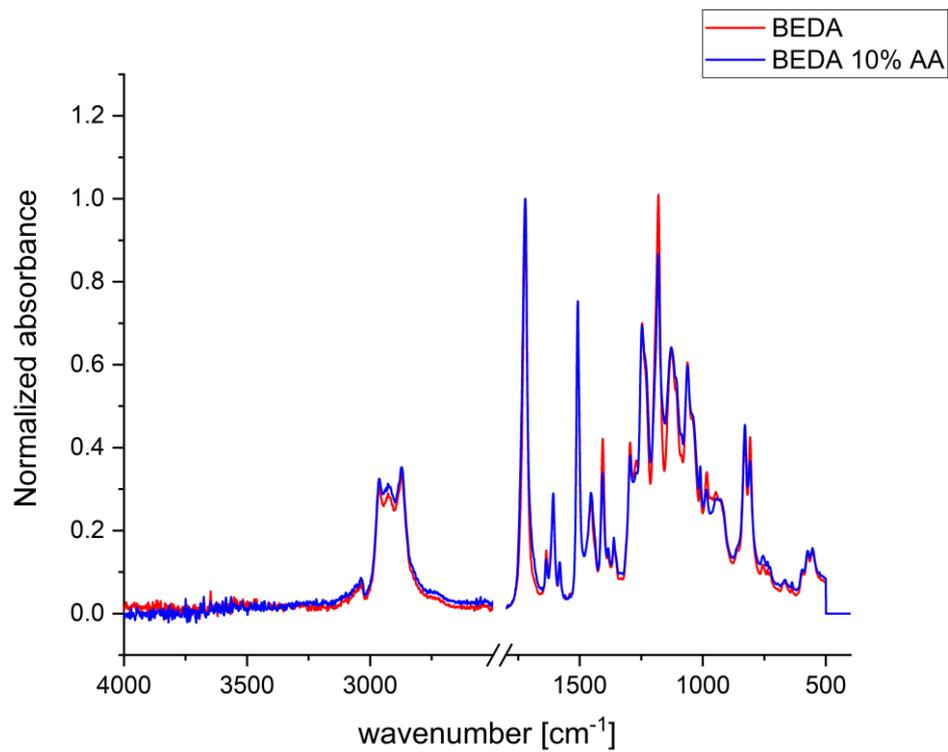


Figura 6.1: Spettro FTIR completo BEDA/BEDA10%AA polimerizzati.

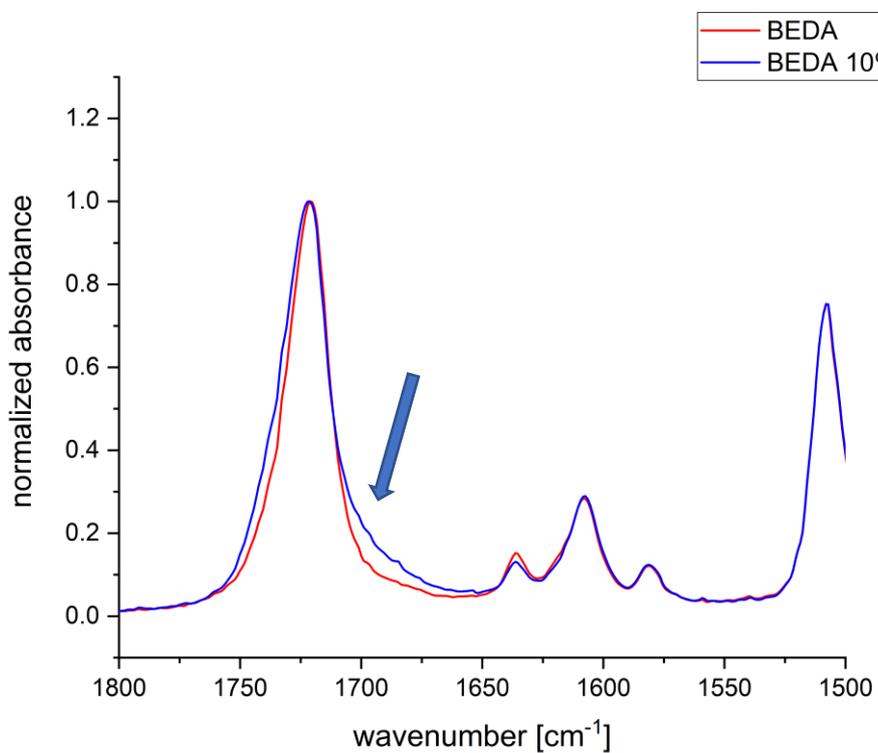


Figura 6.2: Spettro FTIR nel range 1800- 1500  $\text{cm}^{-1}$  per BEDA/BEDA10%AA polimerizzati. Dettaglio del picco a 1721  $\text{cm}^{-1}$ . La spalla è indicata dalla freccia.

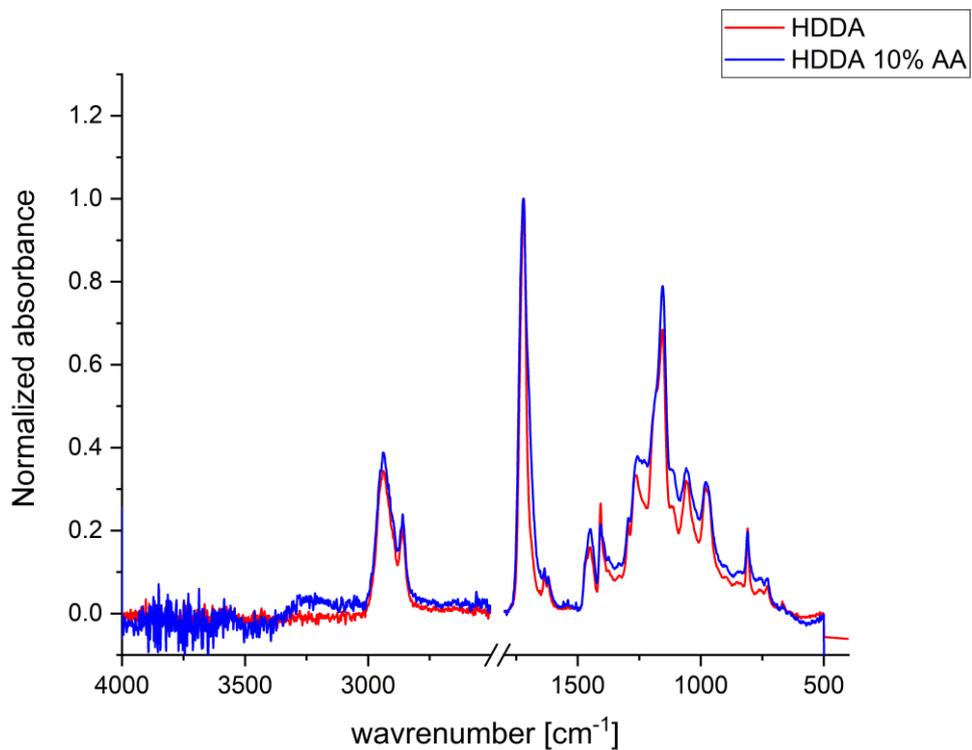


Figura 6.3: Spettro FTIR completo HDDA/HDDA10%AA polimerizzati.

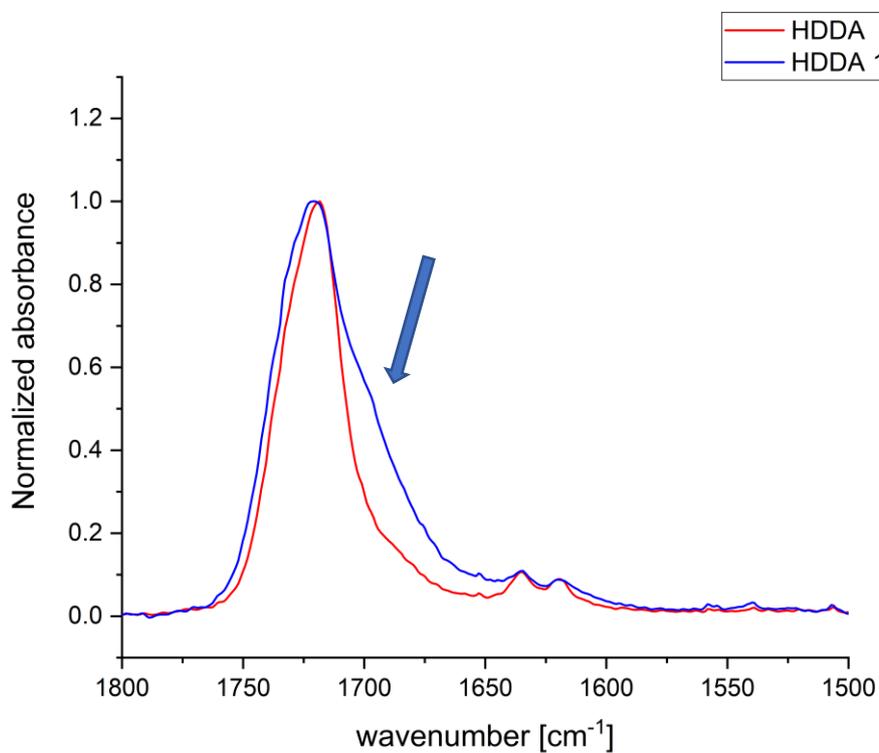


Figura 6.4: Spettro FTIR nel range 1800- 1500  $\text{cm}^{-1}$  per HDDA/HDDA10%AA polimerizzati. Dettaglio del picco a 1720  $\text{cm}^{-1}$ . La spalla è indicata dalla freccia.

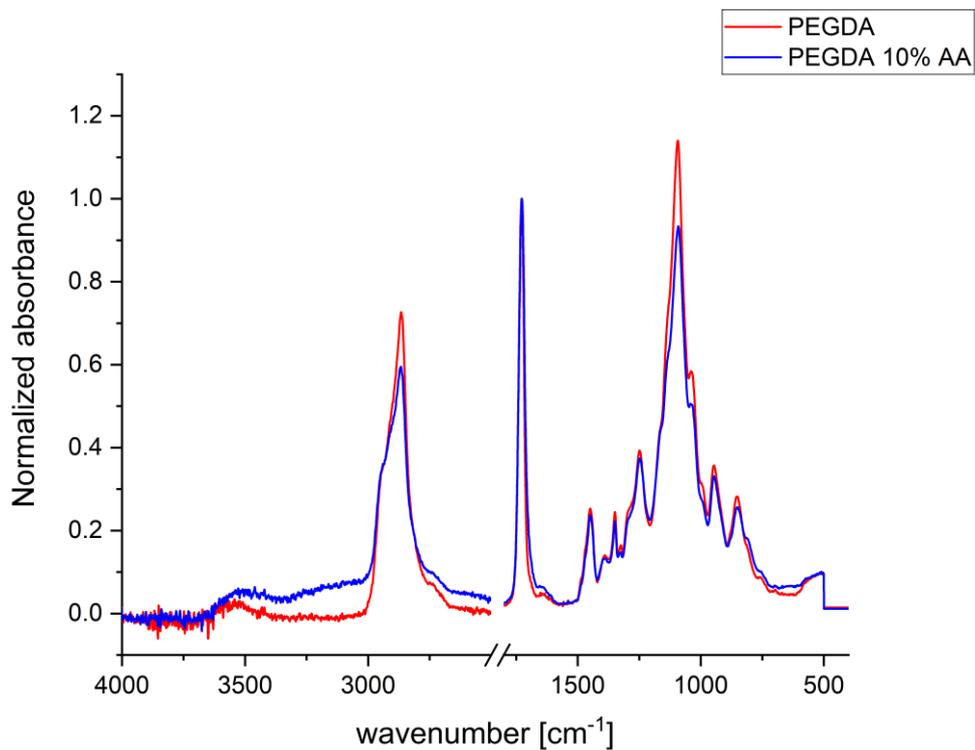


Figura 6.5: Spettro FTIR completo PEGDA/PEGDA10%AA polimerizzati.

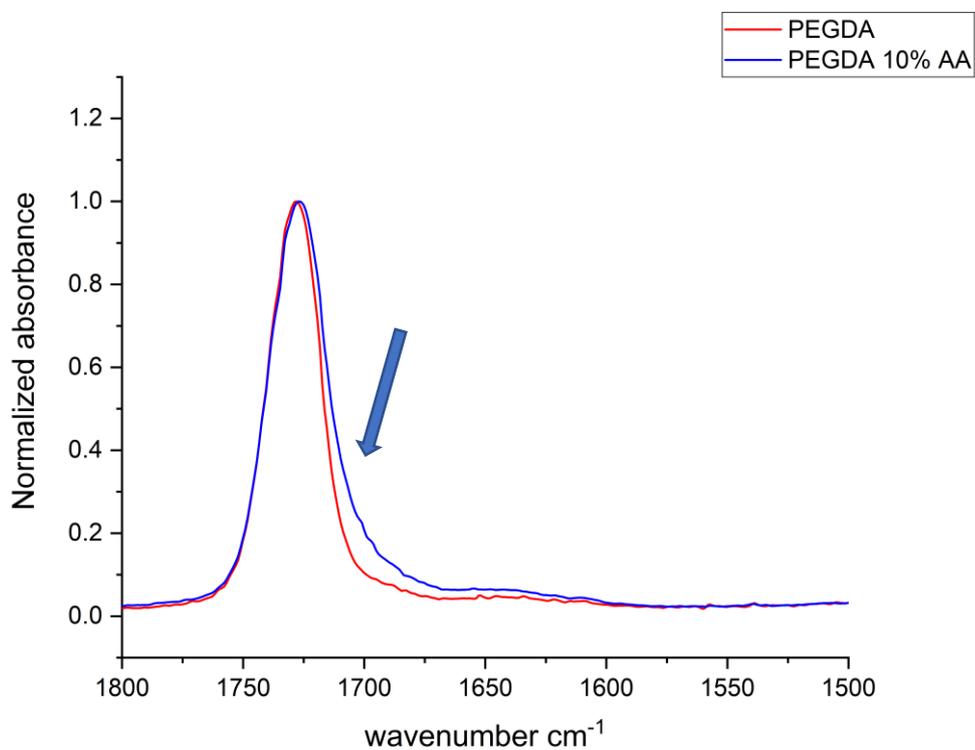


Figura 6.6: Spettro FTIR nel range 1800- 1500  $\text{cm}^{-1}$  per PEGDA/PEGDA10%AA polimerizzati. Dettaglio del picco a 1728  $\text{cm}^{-1}$ . La spalla è indicata dalla freccia.

### 6.1.2 Angolo di contatto

Le misure di angolo di contatto hanno l'obiettivo di caratterizzare le superfici dei materiali dal punto di vista della bagnabilità. In Figura 6.7 si riportano i risultati ottenuti.

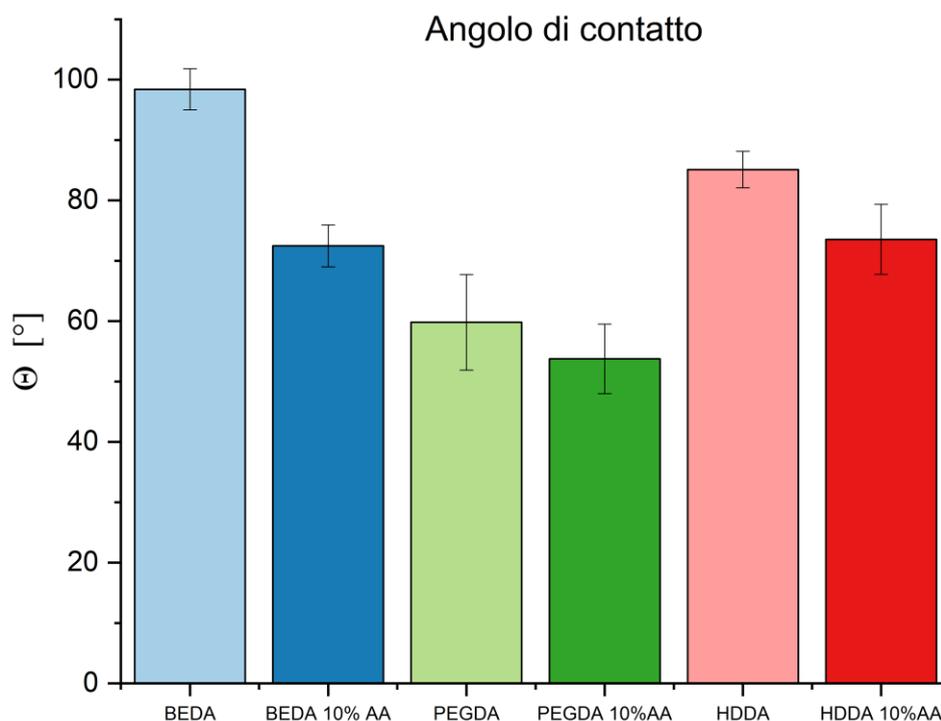


Figura 6.7: Grafico riportante i valori medi di angolo di contatto ottenuti per le formulazioni analizzate, con e senza acido acrilico. Il liquido utilizzato per eseguire le misure è acqua ed il volume della goccia è 1.5  $\mu$ l.

Come si può osservare, il BEDA presenta l'angolo di contatto maggiore, il PEGDA risulta essere il materiale più idrofilo, mentre l'HDDA ha un comportamento intermedio. Questo andamento risulta essere coerente con quanto atteso, poiché il monomero del BEDA contiene due anelli aromatici che oltre ad aumentare la viscosità della resina abbassano la sua bagnabilità. Il monomero del PEGDA presenta un'unità ripetitiva costituita da etilenossidi condensati e pertanto si ha una elevata presenza di atomi di ossigeno, in grado di instaurare interazioni polari con l'acqua. HDDA, invece, risulta essere meno affine all'acqua rispetto al PEGDA a causa della presenza della catena alifatica centrale nella struttura del monomero [133]. Tutte le resine mostrano un abbassamento del valore di angolo di contatto in seguito all'aggiunta dell'acido acrilico. Questo corrisponde all'introduzione di gruppi carbossilici che danno maggiore possibilità alla resina di instaurare interazioni polari con l'acqua: l'abbassamento del valore dell'angolo di contatto è quindi coerente con quanto atteso [119], [120].

Tuttavia, a parità di percentuale di acido acrilico introdotto, l'incidenza sul valore dell'angolo di contatto è diversa per le tre formulazioni. Il BEDA vede una diminuzione dell'angolo di

contatto di circa  $25^\circ$ , mentre HDDA e PEGDA mostrano una diminuzione di questo parametro minore (intorno a  $10^\circ$ ). Il valore di angolo di contatto raggiunto da HDDA 10%AA è assimilabile a quello caratteristico di BEDA 10%AA. Questo andamento è in linea con gli studi precedenti in [119], [120].

## 6.2 Influenza della geometria di stampa sull'efficienza di immobilizzazione di HRP

Per selezionare il materiale ottimale per la realizzazione del dispositivo, è stato eseguito uno studio per valutare l'impatto della geometria dell'oggetto stampato sull'efficienza di immobilizzazione enzimatica. Questo set di prove ha previsto l'immobilizzazione del solo enzima HRP. I test hanno consentito anche di individuare il numero di unità di enzima da incubare per singolo campione, così da ottenere un buon segnale colorimetrico al termine dello sviluppo.

Le prove sono state eseguite su BEDA e BEDA 10%AA, materiali già testati precedentemente ed utilizzati in studi precedenti per lo sviluppo di biosensori [119], [120]. Le geometrie realizzate sono state provini stampati direttamente  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  (Q) e provini di dimensione  $20 \times 25 \times 0.9 \text{ mm}^3$ , da cui sono stati ricavati i  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  tagliati a mano (S). In Figura 6.8 si riporta il grafico con i valori di OD medi ottenuti.

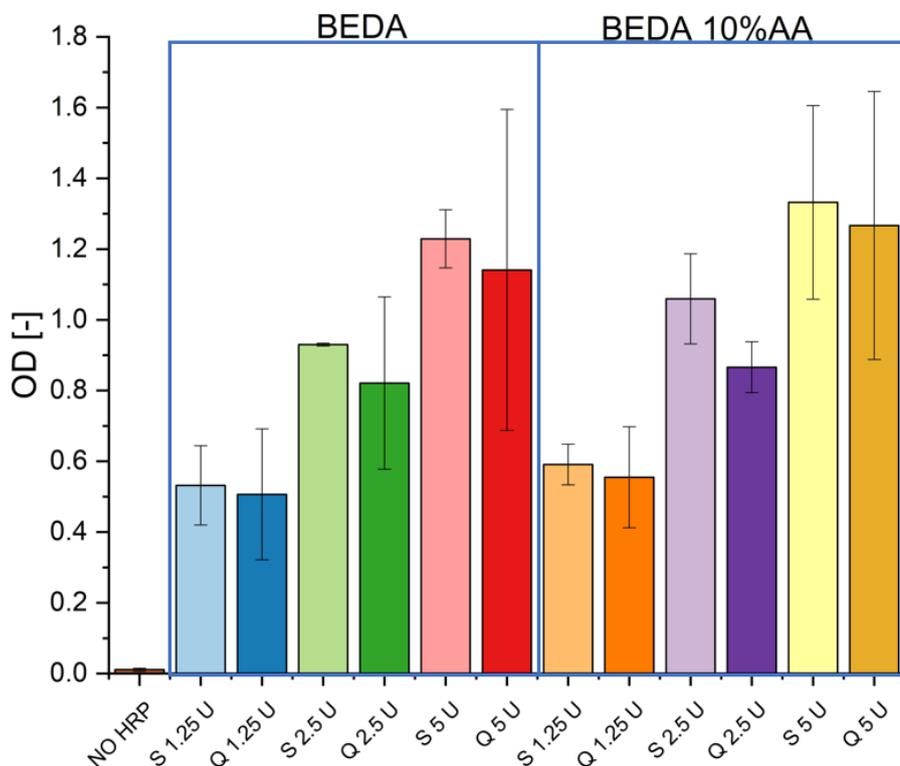


Figura 6.8: Risultati di OD media ottenuta a seguito di immobilizzazione di HRP 1.25 U, 2.5 U, 5 U su campioni  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  di BEDA e BEDA 10%AA di tipo Q o S. Tempo di sviluppo 3.5 minuti con substrato TMB commerciale. Il protocollo di immobilizzazione seguito per queste prove è stato il Protocollo 1 riportato nel Paragrafo 5.2.6.1. Per la valutazione dell'attività di HRP si è seguito il protocollo riportato nel Paragrafo 5.2.3.1. Il valore di OD riportato è dato dalla differenza del valore di assorbanza letto a 450 nm e a 630 nm. Il controllo (no HRP) ha previsto l'incubazione di solo buffer.

Come è possibile osservare dalla Figura 6.8, all'aumentare del numero di unità di HRP incubate, aumenta il segnale osservato e quindi la quantità di enzima attivo effettivamente immobilizzata. Dato questo risultato, nelle prove successive volte a selezionare la formulazione di elezione per il dispositivo finale, si è optato per incubare il valore maggiore di unità di HRP, ossia 5 U a campione. Inoltre, non si osserva una differenza significativa tra i segnali ottenuti dai campioni tagliati a mano (S) e quelli stampati direttamente della dimensione desiderata (Q), pertanto, si è concluso che la geometria del pezzo stampato non ha un impatto apprezzabile sulla resa dell'immobilizzazione. Di conseguenza, data la maggiore riproducibilità e rapidità nella preparativa dei campioni, nelle prove successive i campioni sono stati stampati direttamente delle dimensioni desiderate  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$ . A conferma di quanto appena discusso, si riportano in Figura 6.9 gli spettri FTIR nel range  $1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  del picco del legame C=O ( $1721 \text{ cm}^{-1}$ ) dei campioni S e Q per BEDA e BEDA 10%AA. Come si può notare non vi è differenza nel segnale FTIR tra i campioni Q e S a parità di percentuale di acido acrilico inserito nella formulazione. Pertanto, si può affermare che la distribuzione delle funzionalità carbossiliche non è influenzata dalla geometria con cui l'oggetto è stampato.

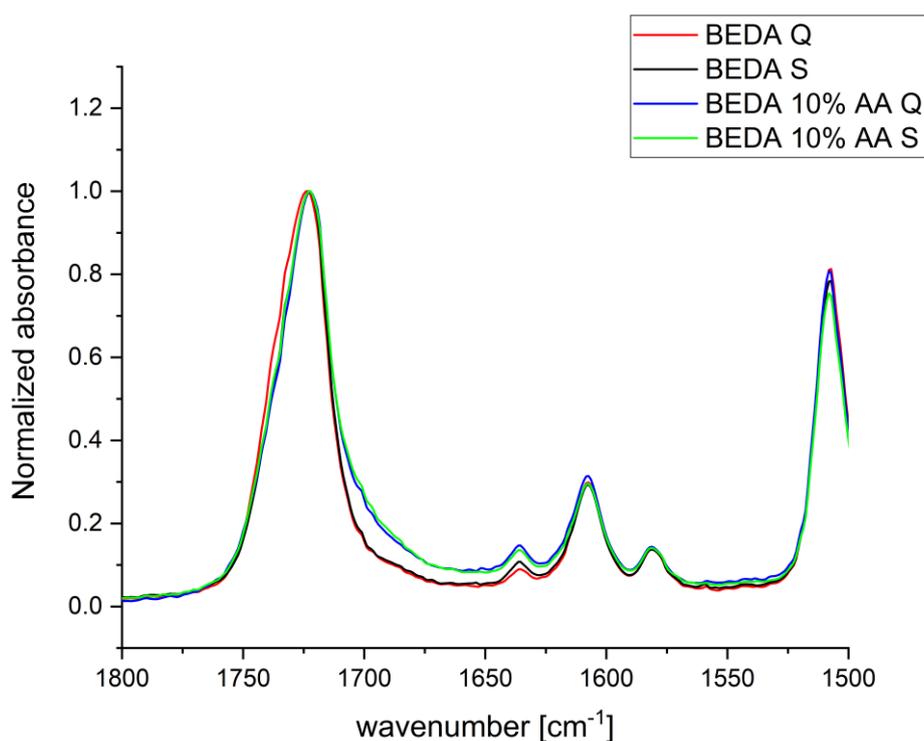


Figura 6.9: Spettro FTIR dei campioni Q e S di BEDA e BEDA 10%AA nel range  $1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ .

### 6.3 Scelta del materiale per la realizzazione del dispositivo

#### 6.3.1 Prove di immobilizzazione di HRP

Al fine di selezionare il materiale migliore per la realizzazione del dispositivo sono state eseguite delle prove di immobilizzazione di 5 U di HRP su campioni di BEDA, BEDA 10 % AA, HDDA, HDDA 10%AA, PEGDA, PEGDA 10%AA  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$ .

Nel grafico in Figura 6.10 si riportano i valori di OD medi registrati.

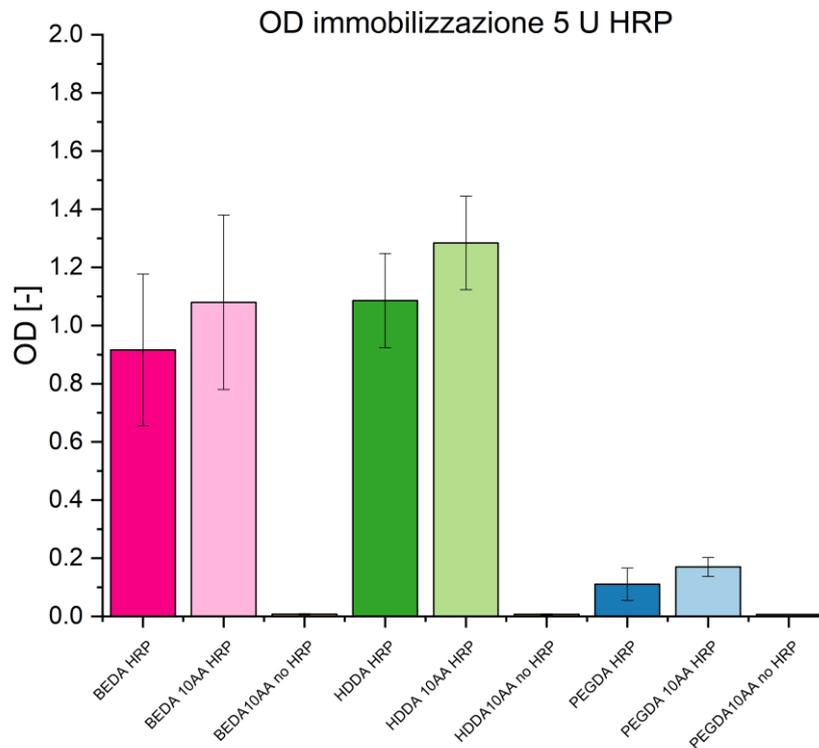


Figura 6.10: Grafico riportante la OD ottenuta dalle prove di immobilizzazione di 5 U di HRP su campioni  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  delle resine analizzate. Tempo di sviluppo 3.5 minuti con substrato TMB commerciale. Il protocollo di immobilizzazione seguito per questa prova è stato il Protocollo 1 riportato nel Paragrafo 5.2.6.1. Per la valutazione dell'attività di HRP si è seguito il protocollo riportato nel Paragrafo 5.2.3.1. Il valore di OD riportato è dato dalla differenza del valore di assorbanza letto a 450 nm e a 630 nm. I negativi sono stati incubati con solo PBS.

Dal grafico in Figura 6.10, si può osservare come tutte le formulazioni presentino un segnale non trascurabile, se confrontato con la rispettiva formulazione al 10%AA. Questo comportamento può essere spiegato come indice di adsorbimento dell'enzima sulla superficie su cui è immobilizzato. Oltre al fenomeno di adsorbimento, la presenza di un segnale non trascurabile dato dalle formulazioni senza acido acrilico potrebbe essere giustificato con la formazione di legami covalenti con altri gruppi presenti diversi rispetto ai gruppi carbossilici introdotti con l'acido acrilico, probabilmente doppi legami residui (addizione aza-michael [134]). Ciò nonostante, l'inserimento dell'acido acrilico nella formulazione comporta un incremento del segnale rispetto alla matrice tal quale per tutte e tre le resine. Come precedentemente detto, questo è indice della formazione di un legame covalente tra gruppi -COOH dell'acido acrilico e la biomolecola, portando ad un incremento della quantità di enzima attivo immobilizzato. Questo andamento è confermato per tutte e tre le matrici diacrilate studiate, tuttavia, l'intensità del segnale è bassa per il PEGDA rispetto a BEDA e HDDA. Questo risultato ha portato ad escludere la matrice PEGDA dalla rosa dei materiali utilizzabili per la realizzazione del dispositivo. Inoltre, il PEGDA è stato scartato anche per l'alto grado di rigonfiamento che ha manifestato già durante i lavaggi in tampone acquoso previsti dal Protocollo 1. L'eccessivo rigonfiamento in un dispositivo in cui è presente una fluidica, come quello sviluppato in questo lavoro di Tesi, comporterebbe difficoltà nella funzionalizzazione della parete interna del canale e nel successivo utilizzo del biosensore. Le formulazioni a base

BEDA forniscono un buon segnale ottico, tuttavia, si nota grande variabilità nei risultati, maggiore rispetto alle altre resine. Sia per BEDA che per BEDA 10%AA si sono ottenuti dei valori di deviazione standard elevati che hanno portato a escludere questa matrice dai candidati per la realizzazione del dispositivo.

Dall'esito di queste prove, infine, è stato possibile constatare che la formulazione più adatta all'immobilizzazione di HRP è l'HDDA 10%AA. Questa formulazione ha fornito il segnale migliore in termini di valore medio di densità ottica raggiunta con un valore di deviazione standard accettabile. Inoltre, la formulazione di HDDA 10%AA è risultata la migliore per la fase di stampa, a causa della bassa viscosità che la caratterizza. Pertanto, HDDA 10% è stata scelta come formulazione con cui realizzare la struttura del biosensore e come materiale su cui ottimizzare il protocollo di co-immobilizzazione di HRP e GOx.

## 6.4 Studio dell'attività enzimatica in soluzione

In questa sezione, verrà riportato lo studio sul comportamento degli enzimi GOx e HRP in soluzione al fine di ottenere i parametri cinetici ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) per i due enzimi.

Nel Paragrafo 6.4.1.1 sarà riportata l'analisi cinetica di HRP in soluzione con ABTS per confrontare l'attività enzimatica di HRP con i dati in letteratura. Nel Paragrafo 6.4.1.2 verranno presentati gli studi cinetici effettuati con l'HRP e TMB come substrato. Le cinetiche in soluzione di HRP con TMB saranno suddivise in misurate in continuo al lettore di piastre multipozzetto (denominate "standard") e stoppate con  $H_2SO_4$ . Verrà quindi effettuato un confronto tra i parametri cinetici ottenuti seguendo le due procedure.

Nel Paragrafo 6.4.2, saranno mostrati i risultati ottenuti a seguito degli studi cinetici effettuati su GOx per il glucosio. Come per HRP, le cinetiche si suddividono in lette in continuo al lettore di piastre multipozzetto (denominate "standard") e stoppate con  $H_2SO_4$ , e i parametri cinetici ottenuti verranno confrontati tra loro.

I parametri ottenuti per le cinetiche stoppate condotte sia con HRP che con GOx saranno sfruttati per eseguire un confronto sull'attività enzimatica mostrata dagli enzimi immobilizzati su HDDA 10%AA (Paragrafo 6.6).

Il modello cinetico di riferimento è quello di Michaelis-Menten ed il metodo di linearizzazione utilizzato per la definizione dei parametri è quello di Lineweaver-Burk descritto nel Paragrafo 5.2.5.

### 6.4.1 Valutazione dei parametri cinetici dell'HRP in soluzione

#### 6.4.1.1 *Cinetica con ABTS*

La cinetica enzimatica dell'HRP con ABTS è stata condotta seguendo il protocollo riportato in 5.2.3.2. In Figura 6.11 si riporta il grafico OD vs tempo e in Figura 6.12 si riporta la linearizzazione ottenuta con il modello di Lineweaver-Burk. I parametri cinetici ottenuti sono riportati in Tabella 6.1.

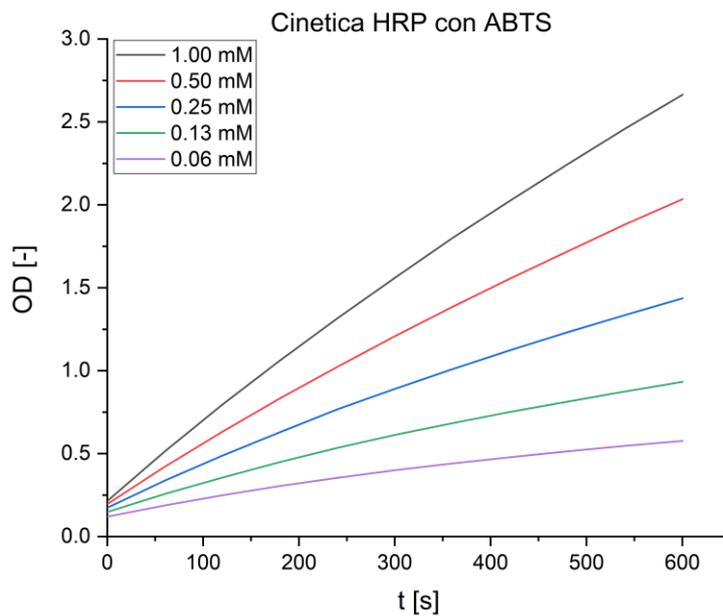


Figura 6.11: Misura dell'OD a 405 nm nel tempo ottenuta con la cinetica dell'HRP a 50 ng/ml condotta con ABTS a concentrazione variabile. Le concentrazioni di ABTS sono riportate nello specchio in alto a sinistra.

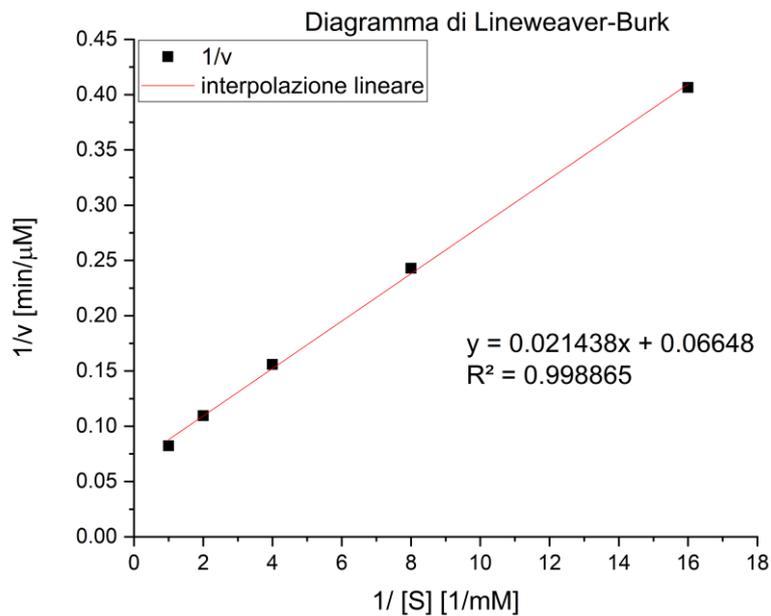


Figura 6.12: Linearizzazione di Lineweaver-Burk della cinetica dell'HRP a 50 ng/ml con ABTS a concentrazione variabile.

Tabella 6.1: Parametri cinetici dell'HRP a 50 ng/ml ottenuti per ABTS.

Equazione della retta modello Lineweaver-Burk: $y = 0.021438x + 0.066486$		
<b>K<sub>m</sub> [mM]</b>	<b>V<sub>max</sub> [μM/min]</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
0.32	15.42	0.99

Il valore di K<sub>m</sub> ottenuto risulta essere in linea rispetto al valore trovato in letteratura ossia 0.27 mM [52], [64], [135]. La lieve differenza potrebbe essere legata ad una differenza di miscelamento effettuato dal lettore di piastre, che potrebbe risultare inferiore rispetto alle condizioni di reazione standard (utilizzo di uno spettrofotometro e misura in cuvetta). Di conseguenza, la reazione potrebbe essere lievemente limitata da problematiche relative al trasferimento di massa del substrato. Inoltre, questa piccola differenza potrebbe essere dovuta a incertezza di misura.

#### 6.4.1.2 **Cinetiche con TMB standard e stoppate**

##### 6.4.1.2.1 *Cinetiche HRP con TMB standard*

Una volta confermati i parametri cinetici nei confronti dell'ABTS si è passati alla valutazione cinetica dell'HRP nei confronti della molecola di TMB, che risulta una scelta obbligata per il successivo studio dell'attività degli enzimi immobilizzati, in quanto la valutazione potrà essere fatta solamente con un substrato che permette di stoppare la reazione.

In Figura 6.13 si riportano i valori di OD ottenuti in funzione del tempo per una cinetica standard dell'HRP nei confronti della TMB. L'estrapolazione delle velocità iniziali per le diverse concentrazioni di TMB ha permesso di calcolare i parametri K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub>. Il diagramma di linearizzazione di Lineweaver-Burk è riportato in Figura 6.14.

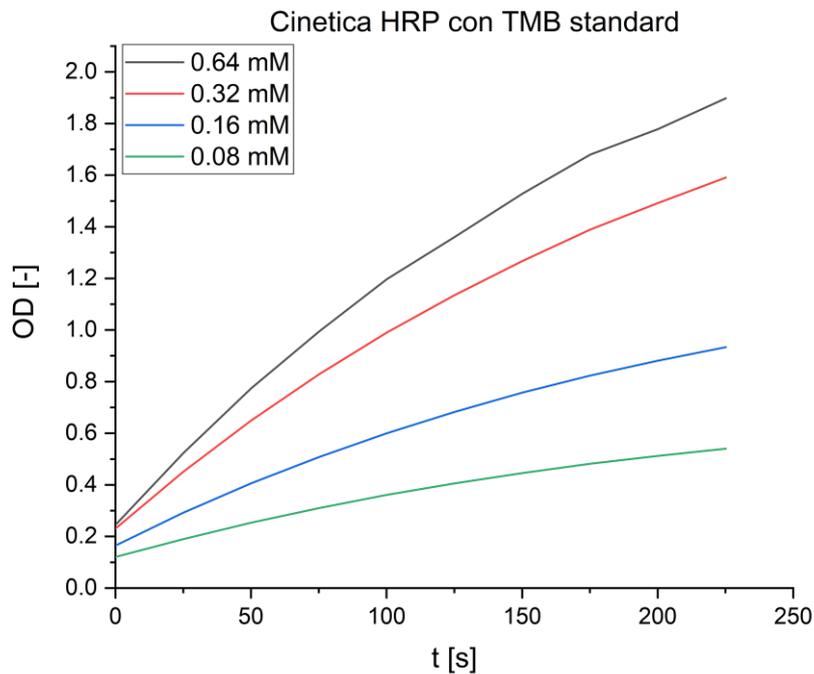


Figura 6.13: Misura dell'OD a 655 nm nel tempo per una cinetica standard dell'HRP a 10 ng/ml condotta con TMB a concentrazione variabile. Le concentrazioni di TMB sono riportate nello specchio in alto a sinistra.

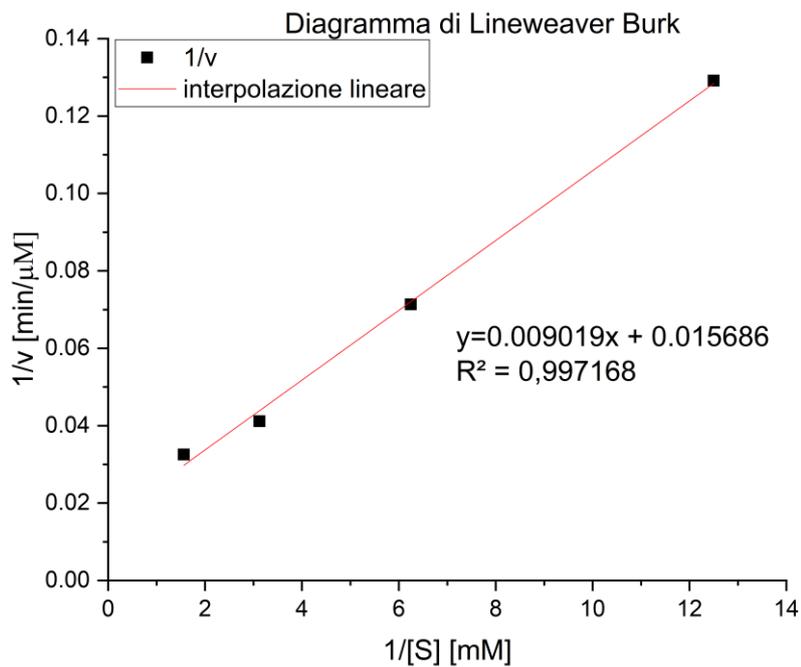


Figura 6.14: Linearizzazione di Lineweaver-Burk per la cinetica dell'HRP a 10 ng/ml standard con TMB a concentrazione variabile.

#### 6.4.1.2.2 Cinetiche HRP con TMB stoppate con $H_2SO_4$

In Figura 6.15 si riportano i risultati ottenuti per la valutazione dei parametri cinetici stoppando con  $H_2SO_4$  la reazione enzimatica. In Figura 6.16 si mostra la linearizzazione di Lineweaver-Burk per estrapolare i parametri cinetici.

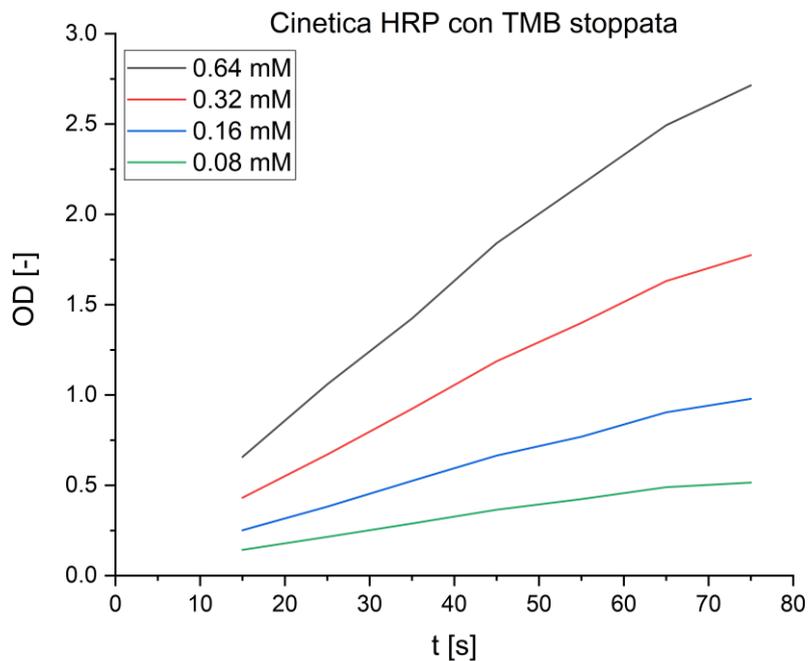


Figura 6.15: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo ottenuti con la cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  utilizzando HRP 10 ng/ml. Le concentrazioni di TMB sono riportate nello specchio in alto a sinistra.

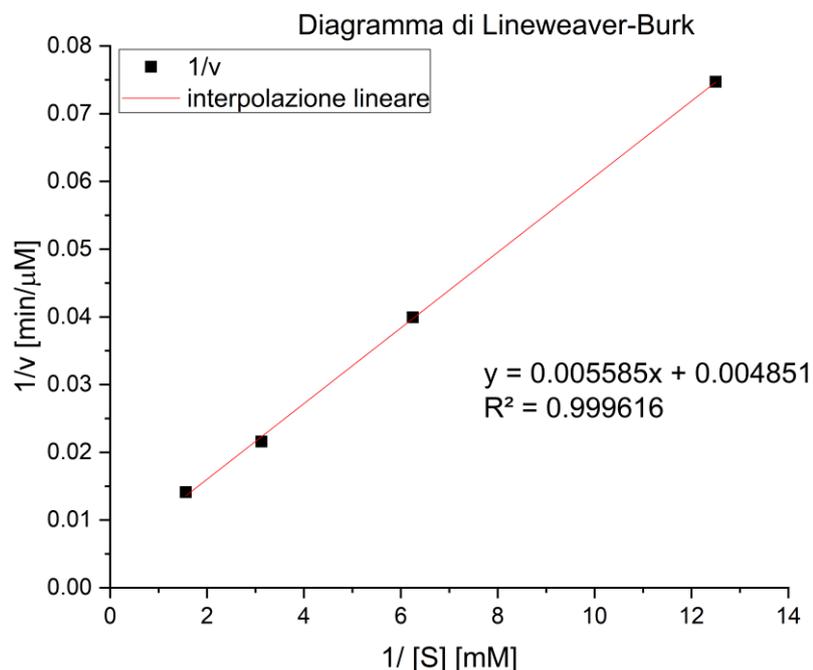


Figura 6.16: Linearizzazione di Lineweaver-Burk per una cinetica dell' HRP stoppata con  $H_2SO_4$ . Concentrazione HRP pari a 10 ng/ml.

#### 6.4.1.2.3 Confronto dei parametri cinetici di HRP ottenuti per le prove con TMB standard e stoppata con $H_2SO_4$

In Tabella 6.2 si riportano i parametri cinetici di HRP ottenuti per la molecola di TMB nella cinetica standard e stoppata con  $H_2SO_4$ .

Tabella 6.2: Confronto parametri cinetici ottenuti per le cinetiche standard e stoppate con  $H_2SO_4$  dell'HRP con TMB.

	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu$ M/min]
Standard	0.58	63.75
Stoppata con $H_2SO_4$	1.15	206.14

Come si può notare in Tabella 6.2 i valori di  $K_m$  ottenuti nella prova con TMB standard e nella prova stoppata sono confrontabili, mentre differiscono tra loro quelli della  $V_{max}$ . Questo potrebbe essere dovuto alle condizioni di misura, che non sono le medesime tra le due prove. In particolare, per implementare la cinetica stoppata non è stato possibile agitare la piastra, quindi, potrebbero essere state introdotte limitazioni date dal trasferimento di massa del substrato. Allo stesso tempo, il valore di OD viene letto a due diverse lunghezze d'onda, e vengono utilizzati due diversi coefficienti di estinzione molare.

#### 6.4.2 Caratterizzazione GOx in soluzione

Una volta caratterizzati i parametri dell'HRP, si è passati alla GOx. Non avendo la possibilità di misurare direttamente l'attività della GOx, si è passati direttamente alla valutazione della reazione combinata dei due enzimi. In questo modo, se la GOx è in condizioni limitanti, il segnale misurato risulta direttamente proporzionale alla sua attività. Per ottenere i parametri

cinetici della GOx con il glucosio sono state quindi condotte delle prove seguendo i protocolli riportati in 5.2.3.5 e 5.2.3.6, lavorando con 3 differenti rapporti GOx/HRP, prendendo spunto dagli studi già riportati in letteratura da Zhang et al. (2016) [132]. Sono stati esaminati i rapporti GOx: HRP 1:1, 1:10 e 1:20. La variazione del rapporto GOx/HRP ha l'obiettivo di verificare se in queste condizioni la reazione enzimatica complessiva dipenda sempre esclusivamente dalla GOx. Se questo non si verificasse, significherebbe che l'enzima limitante risulterebbe l'HRP. Di conseguenza, l'HRP non riuscirebbe a sfruttare totalmente il perossido di idrogeno fornito dalla trasformazione del glucosio catalizzata dalla GOx e non si potrebbe utilizzare il sistema per la valutazione dei parametri cinetici della GOx o per la misura della concentrazione di glucosio.

#### 6.4.2.1 *Cinetiche GOx/HRP standard*

Inizialmente, le prove in presenza di entrambi gli enzimi sono state condotte in liquido senza stoppare la reazione. Questa serie di prove è stata condotta seguendo il protocollo riportato in 5.2.3.5. In Figura 6.17 si riportano i grafici di OD per il rapporto 1:1, in Figura 6.19 per il rapporto 1:10, in Figura 6.21 per il rapporto 1:20 in funzione del tempo, mentre in Figura 6.18, Figura 6.20 e Figura 6.22 si riportano i diagrammi di Lineweaver-Burk rispettivamente per i rapporti GOx/HRP 1:1, 1:10 e 1:20.

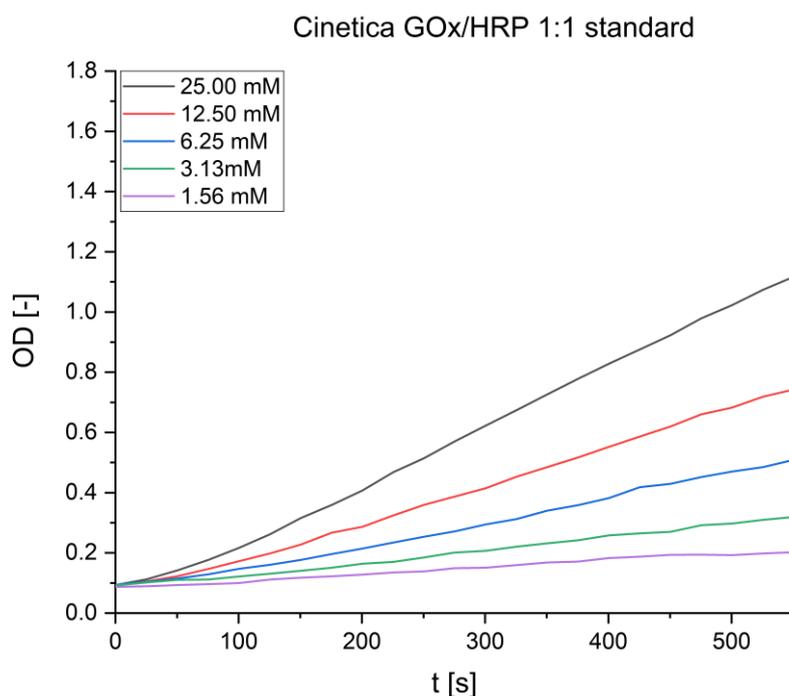


Figura 6.17: Misura dell'OD a 655 nm nel tempo per una cinetica standard GOx/HRP con rapporto 1:1. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 1 nM, TMB 1 mM. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchio in alto a sinistra.

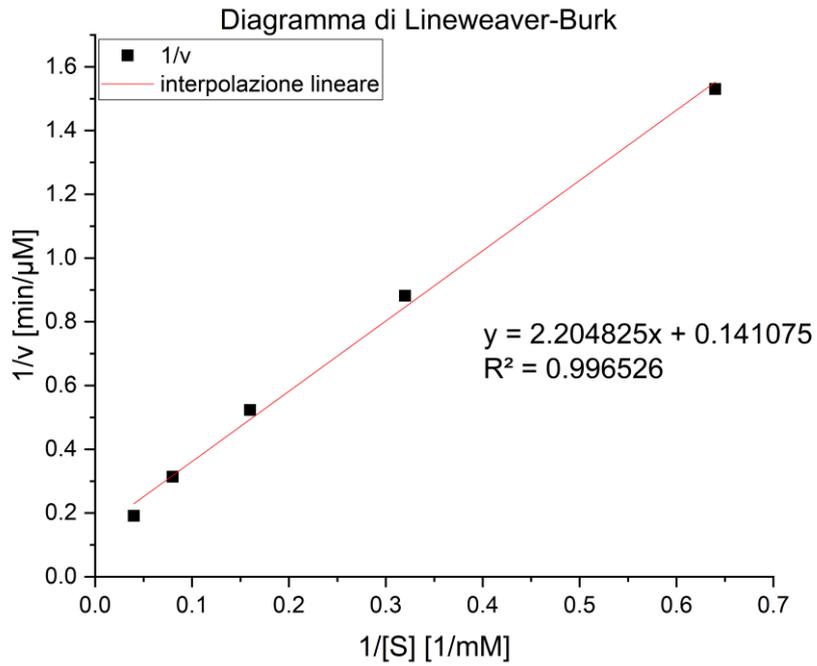


Figura 6.18: Diagramma di Lineweaver-Burk per la cinetica standard GOx/HRP con rapporto 1:1. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 1 nM, TMB 1 mM.

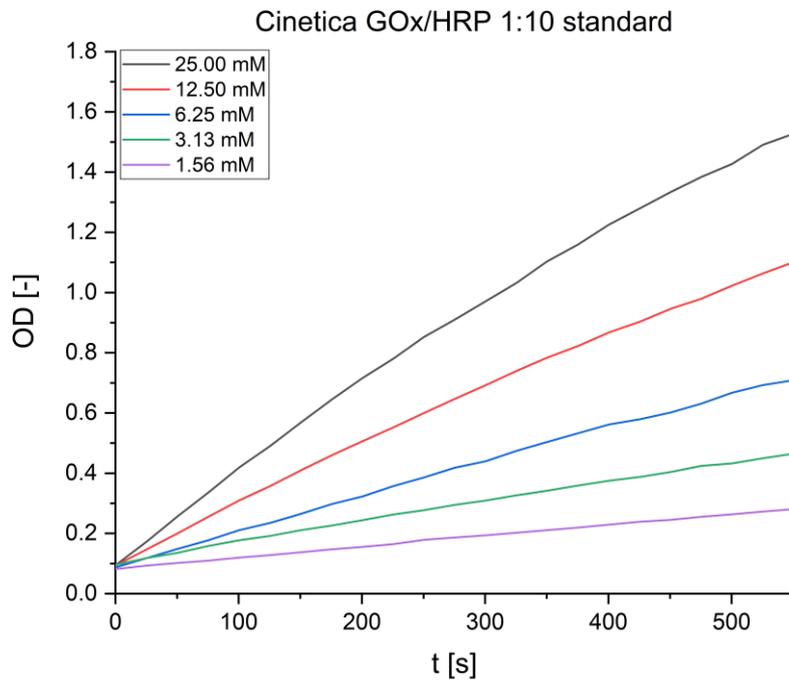


Figura 6.19: Misura dell'OD a 655 nm nel tempo per una cinetica standard GOx/HRP con rapporto 1:10. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 10 nM, TMB 1 mM. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchio in alto a sinistra.

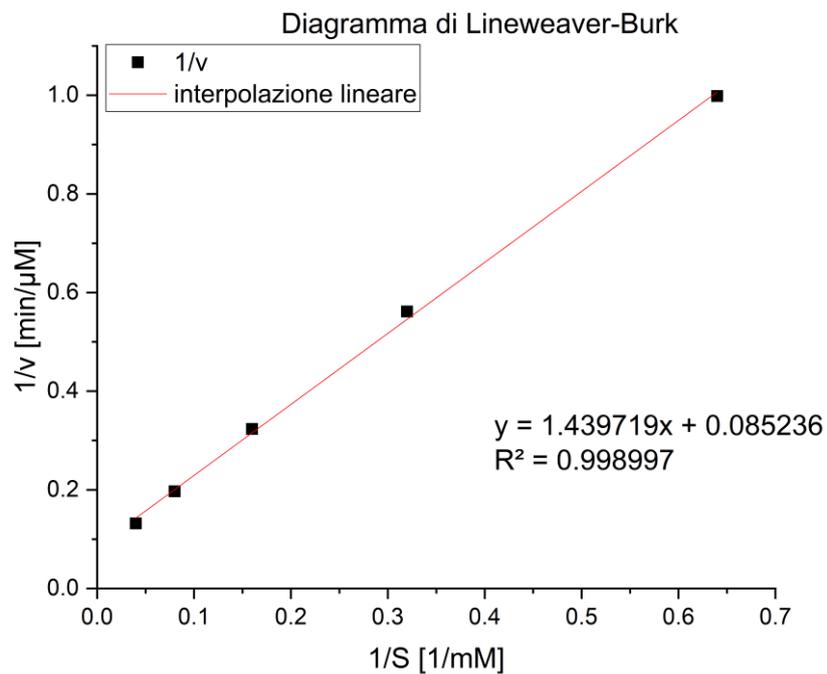


Figura 6.20: Diagramma di Lineweaver-Burk della cinetica standard GOx/HRP con rapporto 1:10. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 10 nM, TMB 1 mM.

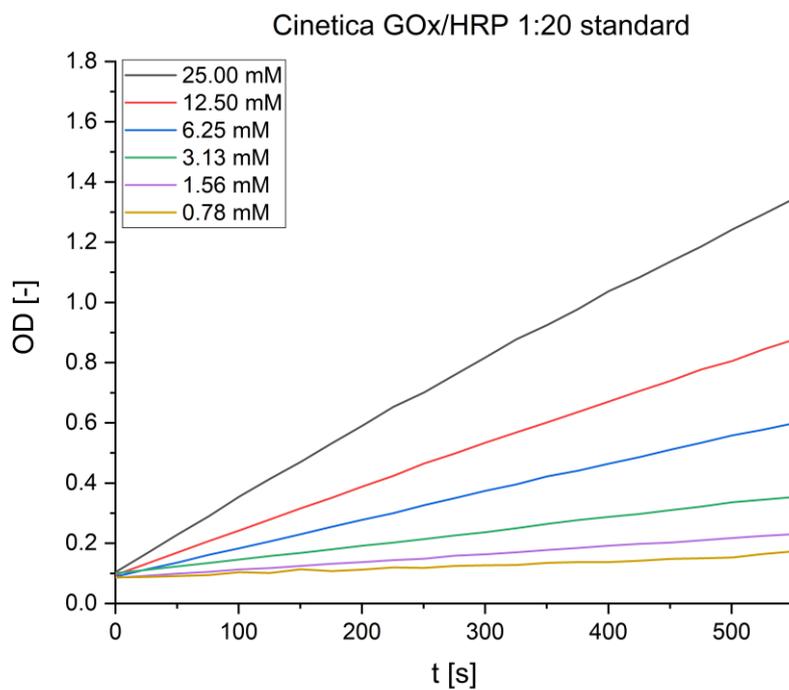


Figura 6.21: Misura dell'OD a 655 nm registrata nel tempo per valutazione di una cinetica standard GOx/HRP con rapporto 1:20. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 20 nM, TMB 1 mM. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchio in alto a sinistra.

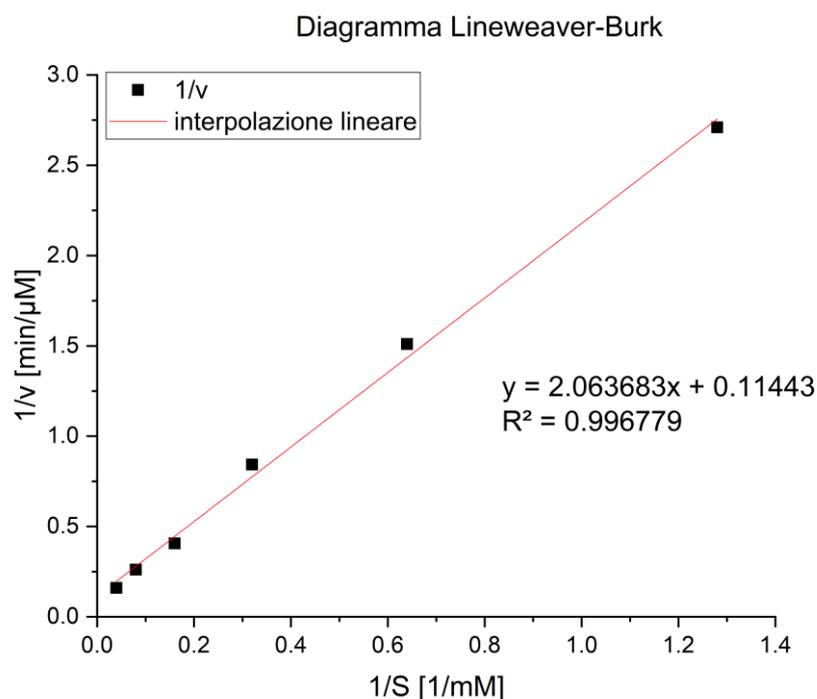


Figura 6.22: Diagramma di Lineweaver-Burk per una cinetica standard GOx/HRP con rapporto 1:20. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 20 nM, TMB 1 mM.

Come si può osservare in Figura 6.17 il tratto iniziale della curva risulta concavo: questo è indice della presenza di un tempo di transizione iniziale in cui HRP non consuma immediatamente il perossido generato da GOx a differenza di quanto avviene per gli altri due rapporti indagati (Figura 6.19 e Figura 6.21) come verrà meglio approfondito nella sezione 6.4.2.3.

#### 6.4.2.2 Cinetiche GOx stoppate con $H_2SO_4$

Così come per l'HRP, anche per la GOx sono state effettuate delle prove cinetiche stoppando la reazione con  $H_2SO_4$  (metodo descritto nel Paragrafo 5.2.3.6), al fine di poter confrontare l'attività dell'enzima in soluzione con quella dell'enzima immobilizzato su supporto solido. In Figura 6.23, Figura 6.25 e Figura 6.27 si riportano i risultati in termini di OD ottenuti per i tre

rapporti esaminati. In Figura 6.24, Figura 6.26 e Figura 6.28 si riportano le linearizzazioni di Lineweaver-Burk rispettivamente per i rapporti GOx/HRP 1:1, 1:10 e 1:20.

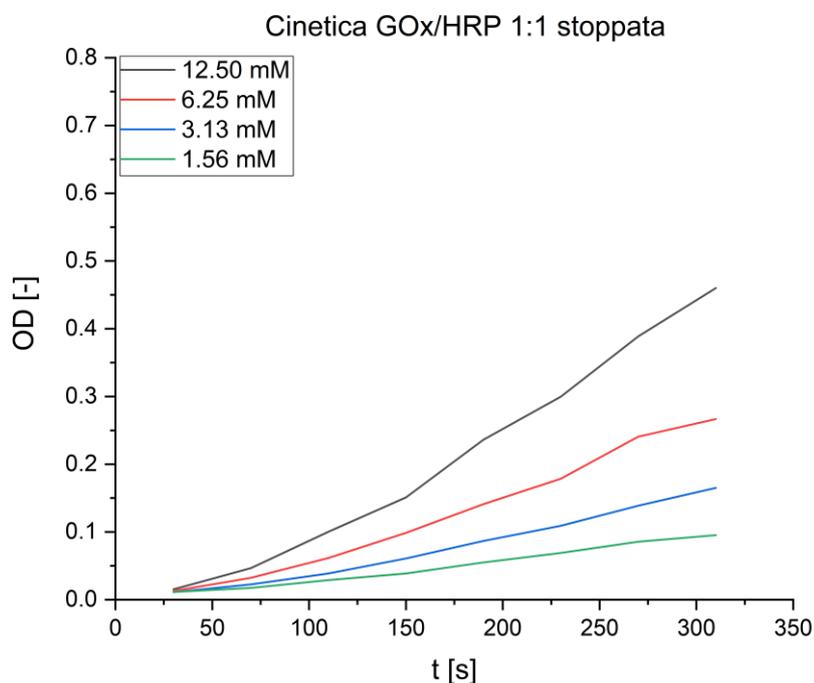


Figura 6.23: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo per la cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  per il rapporto GOx/HRP di 1:1. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 1 nM, TMB 0.16 mM. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchietto in alto a sinistra.

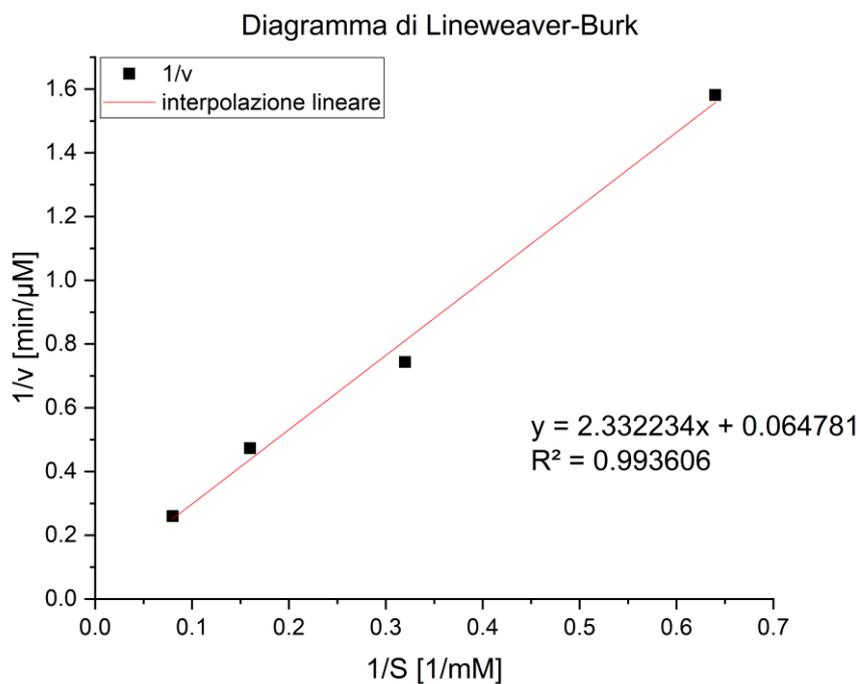


Figura 6.24: Diagramma di Lineweaver-Burk per la cinetica stoppata GOx/HRP in rapporto 1:1. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 1 nM, TMB 0.16 mM.

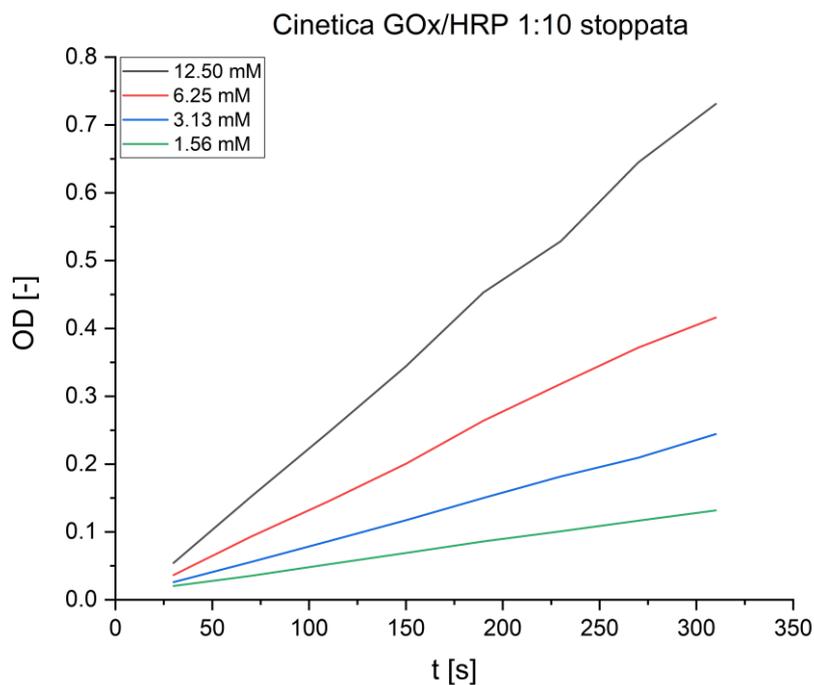


Figura 6.25: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo per la cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  per il rapporto GOx/HRP di 1:10. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 10 nM, TMB 0.16 mM. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchio in alto a sinistra

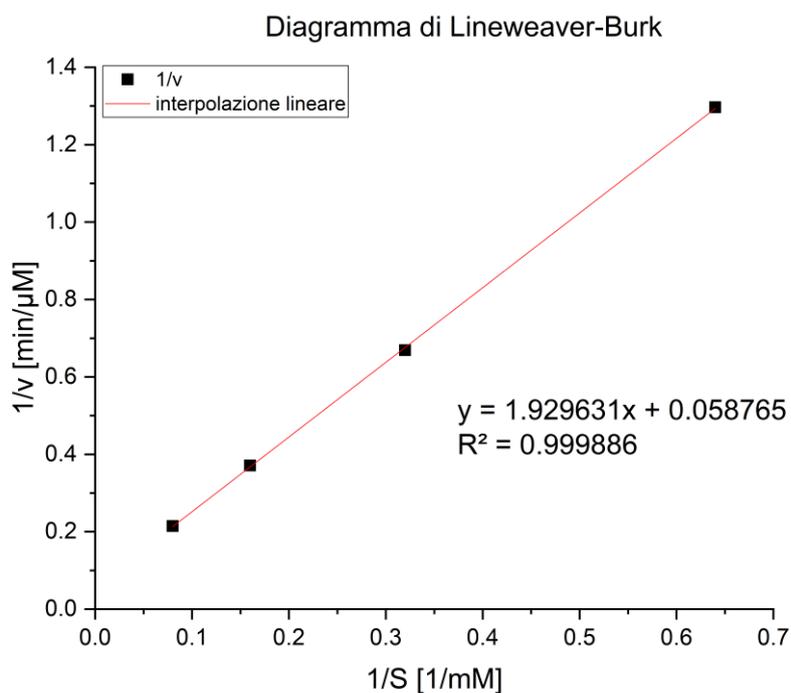


Figura 6.26: Diagramma di Lineweaver-Burk per la cinetica stoppata GOx/HRP in rapporto 1:10. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 10 nM, TMB 0.16 mM.

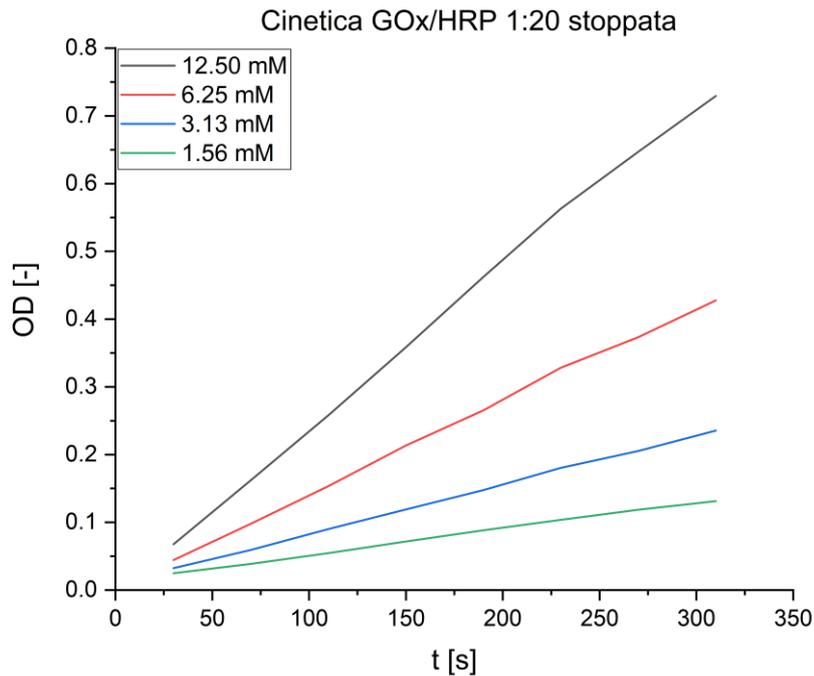


Figura 6.27: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo per la cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  per il rapporto GOx/HRP di 1:20. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 20 nM, TMB 0.16 mM. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchietto in alto a sinistra

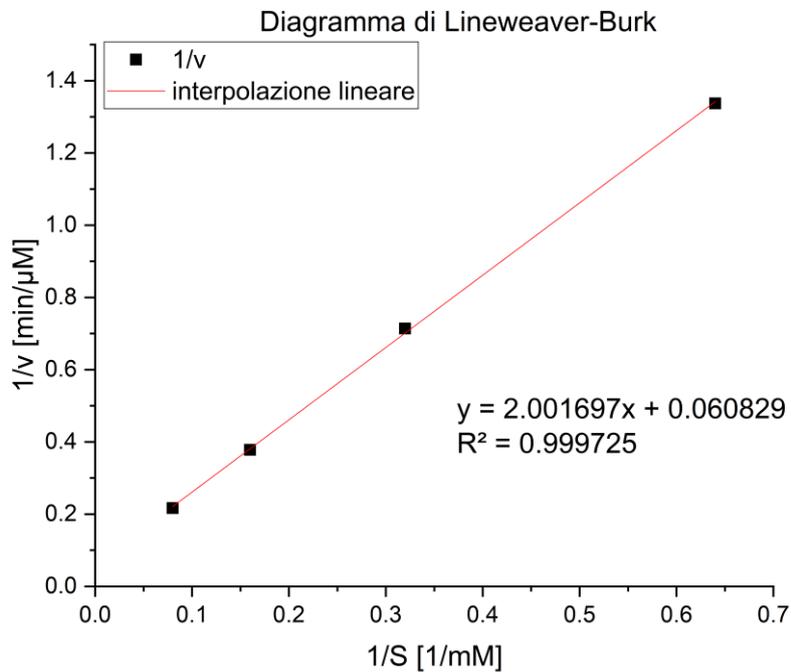


Figura 6.28: Diagramma di Lineweaver-Burk per la cinetica stoppata GOx/HRP in rapporto 1:20. Concentrazione GOx 1 nM, HRP 20 nM, TMB 0.16 mM.

### 6.4.2.3 Confronto dei parametri cinetici della GOx ottenuti per le prove standard e stoppate con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

La Tabella 6.3 riassume i parametri cinetici ottenuti per la GOx nelle prove standard e stoppate con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per i tre rapporti GOx/HRP indagati.

Tabella 6.3: Confronto dei parametri cinetici ottenuti per GOx per il glucosio nelle prove standard e stoppate con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

GOx/HRP [nM]	Standard		Stoppata con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	K <sub>m</sub> [mM]	V <sub>max</sub> [μM/min]	K <sub>m</sub> [mM]	V <sub>max</sub> [μM/min]
1:1	15.63	7.09	36.00	15.44
1:10	16.89	11.73	32.84	17.02
1:20	18.03	8.74	32.91	16.44

Dalla Tabella 6.3, ottenuta prendendo in considerazione il tratto lineare delle curve cinetiche, si può osservare che per la GOx le K<sub>m</sub> misurate nelle prove standard sono inferiori a quelle calcolate nella cinetica stoppata. Come già sottolineato per la cinetica con sola HRP, i valori di V<sub>max</sub> sono anche in questo caso più grandi. Come già indicato per l'HRP, ciò potrebbe essere legato alle condizioni usate per la prova stoppata, che impediscono il corretto rimescolamento della miscela di reazione durante la prova. Invece, confrontando il tipo di prova eseguita (standard o stoppata) i parametri di K<sub>m</sub> sono simili tra loro per tutti e tre i rapporti GOx/HRP. Questo è in linea con quanto atteso e permette di affermare che l'enzima cineticamente limitante per i tre rapporti è sempre la GOx [132]. Infatti, solamente il valore di K<sub>m</sub> ottenuto nella prova 1:1 stoppata risulta essere leggermente maggiore rispetto a quello ottenuto per gli altri due rapporti. Tuttavia, una discrepanza nei valori di K<sub>m</sub> di questa entità può essere considerata come accettabile e i parametri come coerenti tra loro.

Anche i valori di V<sub>max</sub> sono abbastanza confrontabili, soprattutto analizzandoli per tipologia. Queste piccole differenze potrebbero essere dovute anche ad errori sperimentali. Ad esempio, in presenza di una concentrazione di GOx maggiore rispetto alla nominale, si verrebbe a formare una maggiore quantità di perossido di idrogeno a parità di tempo e degli altri parametri, di conseguenza ad una maggiore ossidazione di TMB e dunque si otterrebbe un maggiore segnale ottico, che andrebbe a modificare i risultati ottenuti.

Complessivamente, si osserva solo per il rapporto 1:1 una certa latenza iniziale, dovuta probabilmente a limitazioni dovute alla diffusione, come già indicato in letteratura [132].

La concentrazione di TMB utilizzata nelle prove standard è 1 mM, mentre nelle stoppate è stata ridotta a 0.16 mM. Questo perché si è osservata la formazione di TMB precipitato nella soluzione stock costituita da una concentrazione di TMB pari a 2 mM e glucosio variabile nel range 3.13 - 25 mM. Questa variazione di concentrazione è risultata irrilevante per l'estrapolazione dei parametri cinetici e i livelli di OD raggiunti durante il test sono simili, come mostrato in Figura 6.29.

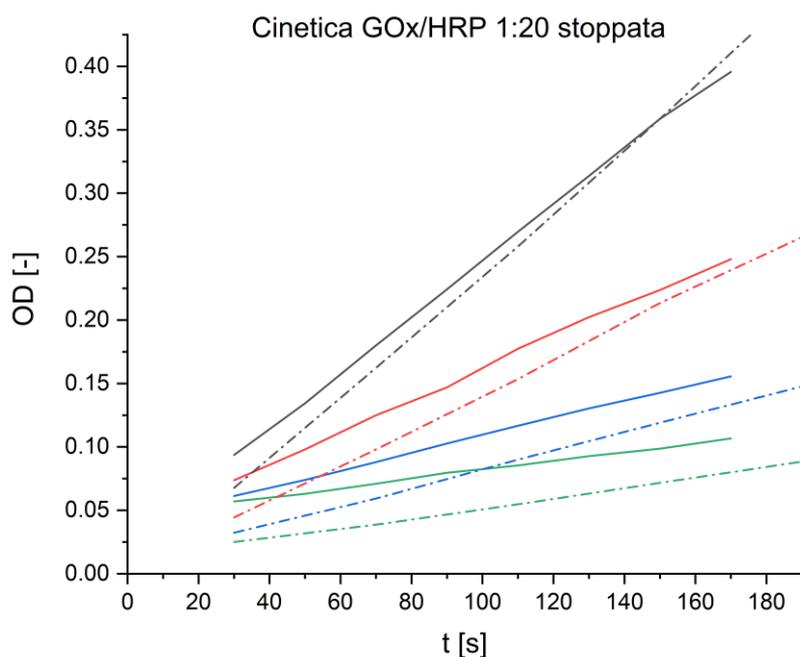


Figura 6.29: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo per due cinetiche stoppate con  $H_2SO_4$  per il rapporto GOx/HRP di 1:20. La concentrazione di TMB è 1 mM per i dati riportati con linea continua e 0.16 mM per quelli riportati con linea tratteggiata. Le concentrazioni di glucosio sono 1.56 mM (verde), 3.13 mM (blu), 6.25 mM (rosso) e 12.50 mM (nero).

Si può quindi ipotizzare che la molecola di TMB sia in eccesso rispetto al perossido di idrogeno generato in entrambi i casi e pertanto il segnale ottico misurato non sia limitato e corrisponda all'effettiva trasformazione del glucosio presente.

In Figura 6.30 si riporta un confronto per la cinetica stoppata, a parità di concentrazione di glucosio per i tre rapporti GOx/HRP indagati.

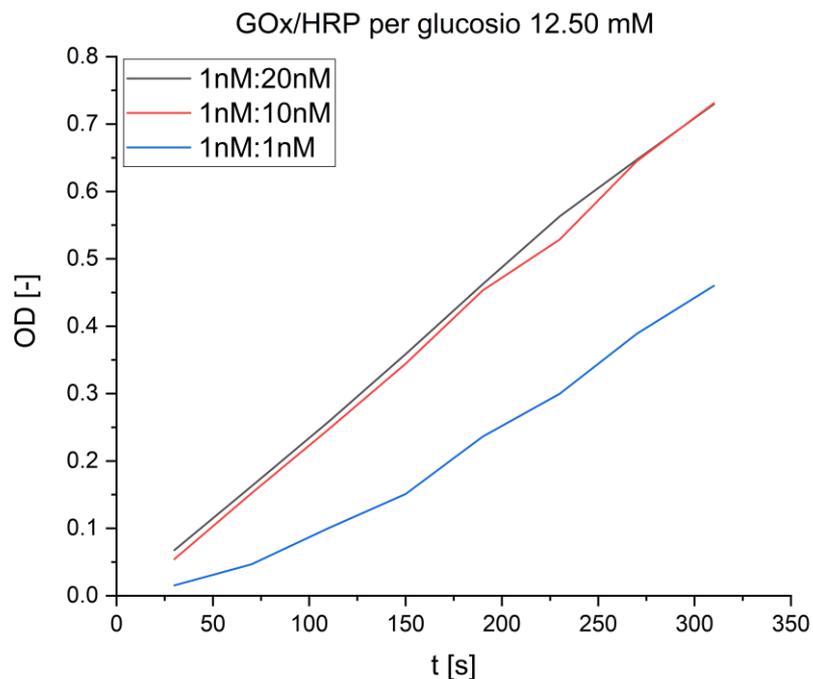


Figura 6.30: Confronto del segnale dato dalla differenza di OD a 450 nm e 630 nm ottenuto nelle cinetiche stoppate con  $H_2SO_4$  di GOx/HRP (i rapporti tra gli enzimi sono riportati nello specchietto in alto a sinistra). Concentrazione di glucosio pari a 12.50 mM e TMB pari a 0.16 mM.

Come si può notare dai dati riportati in Figura 6.30 i valori di OD per i rapporti GOx/HRP 1:10 e 1:20 sono maggiori di quelli ottenuti nel rapporto 1:1 a parità di tempo. Per il rapporto 1:1 si ha una limitazione dovuta molto probabilmente alla diffusione, che fa sì che il perossido di idrogeno generato grazie all'azione della GOx non venga immediatamente sfruttato dall'HRP per ossidare la TMB; pertanto, la curva presenta una concavità iniziale per poi proseguire linearmente, ma sempre ad una pendenza minore rispetto alle altre due condizioni fino al tratto finale della curva dove la pendenza diventa assimilabile a quella degli altri due rapporti [132]. Infatti, tenendo conto solo del tratto lineare i parametri cinetici sono confrontabili per tutti e tre i rapporti come riportato in Tabella 6.3. La presenza di limitazioni nel caso di rapporto 1:1 diventa evidente se si prende in considerazione anche il tratto non lineare nel calcolo dei

parametri cinetici. Ad esempio, nell'intervallo da 70 s a 310 s si ottiene una  $V_{max}$  di 7.00  $\mu\text{M}/\text{min}$  che è circa la metà del valore indicato in tabella.

Da questi studi preliminari in soluzione è stato possibile affermare che:

- I rapporti GOx/HRP 1:10 e 1:20 in soluzione risultano le condizioni migliori per i successivi test di immobilizzazione, in quanto l'enzima limitante è sempre la GOx, presupposto fondamentale per una quantificazione del glucosio.
- La concentrazione di glucosio pari a 12.50 mM fornisce un buon segnale colorimetrico e pertanto è stata identificata come la concentrazione ottimale per gli studi di co-immobilizzazione enzimatica su solido riportati nei prossimi paragrafi.

## 6.5 Immobilizzazione di GOx e co-immobilizzazione con HRP su campione stampato

### 6.5.1 Valutazione del rapporto di incubazione ottimale di GOx/HRP

Queste prove sono state effettuate sul materiale selezionato dalle prove di immobilizzazione di sola HRP, ossia, HDDA 10%AA. Tale studio è volto all'identificazione del rapporto GOx/HRP migliore da utilizzare in fase di co-immobilizzazione. I rapporti GOx/HRP analizzati in fase di incubazione sono stati: 1:20, 1:10, 1:1 mantenendo costante la concentrazione di GOx, ricalcando così gli studi cinetici condotti sui due enzimi in soluzione (vedi Paragrafo 6.4.2).

Le concentrazioni di GOx e HRP incubate sono riportate in Tabella 6.4.

*Tabella 6.4: Concentrazioni di GOx e HRP incubate nelle prove di co-immobilizzazione enzimatica su HDDA 10%AA per la selezione del rapporto migliore. La definizione di queste concentrazioni è stata determinata dalla stima dell'attività di HRP secondo il Protocollo riportato in 5.2.3.1 e la concentrazione di HRP incubata sui campioni 1:20 è quella che garantirebbe l'incubazione di 5 U di HRP. Nell'esecuzione di queste prove è stato seguito il Protocollo 1 riportato nel Paragrafo 5.2.6.1.*

Campione	GOx [ $\mu\text{M}$ ]	HRP [ $\mu\text{M}$ ]
<b>1:20</b>	$1.55 \cdot 10^{-2}$	$3.10 \cdot 10^{-1}$
<b>1:10</b>	$1.55 \cdot 10^{-2}$	$1.55 \cdot 10^{-1}$
<b>1:1</b>	$1.55 \cdot 10^{-2}$	$1.55 \cdot 10^{-2}$
<b>no GOx</b>	-	$3.10 \cdot 10^{-1}$
<b>no HRP</b>	$1.55 \cdot 10^{-2}$	-

In Figura 6.31 si riportano i risultati ottenuti in termini di OD.

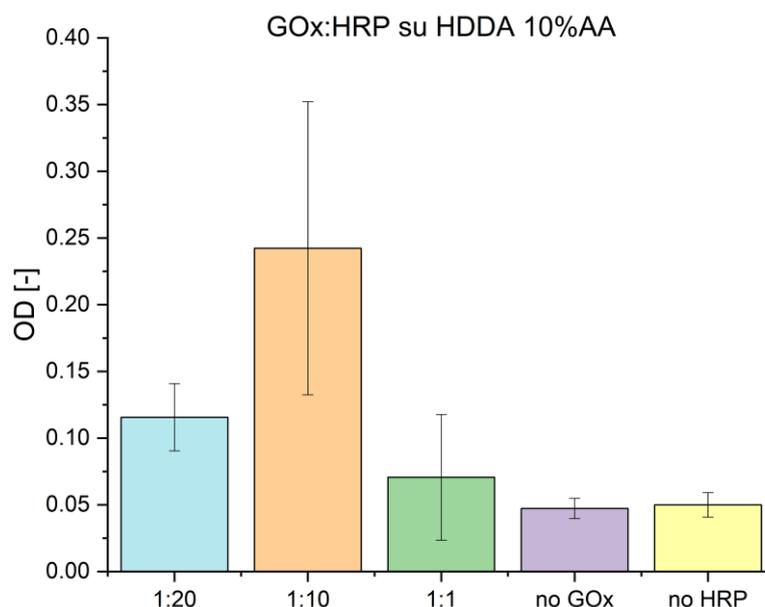


Figura 6.31: Grafico riportante le OD ottenute a seguito dello sviluppo di 1 ora per i campioni di HDDA 10%AA su cui si sono incubati GOx e HRP nelle concentrazioni e nei rapporti riportati in Tabella 6.4. Il valore di OD riportato è dato dalla differenza del valore di assorbanza letto a 450 nm e a 630 nm. Substrato: glucosio a 12.50 mM, TMB 0.16 mM in 90% BFC e 10% DMSO.

Come si può osservare dai risultati in Figura 6.31 il segnale migliore è dato dal set di campioni su cui sono stati incubati gli enzimi con concentrazioni GOx/HRP in rapporto 1:10. Risulta fondamentale garantire un eccesso di HRP attiva rispetto alla GOx immobilizzata sul campione portando ad un abbattimento di eventuali fenomeni di limitazione, come visualizzato in soluzione. Come riportato in 6.4.2, dagli studi condotti in soluzione emerge che per il rapporto GOx/HRP di 1:1 si ha un minore segnale colorimetrico a parità di tempo di sviluppo a causa di limitazioni dovute probabilmente alla diffusione. Dunque, il fatto di ottenere un minore segnale ottico per il rapporto 1:1 anche per gli enzimi co-immobilizzati sembra confermare questo aspetto. Di fatto non è stato possibile verificare l'effettivo mantenimento del rapporto di incubazione una volta che le biomolecole sono co-immobilizzate su solido, in quanto non è stato possibile quantificare la concentrazione dei due enzimi una volta immobilizzati. Il minore segnale ottico raggiunto a parità di tempo di sviluppo per il rapporto 1:1 potrebbe infatti essere dovuto anche ad una variazione delle attività mostrate dai due enzimi una volta co-immobilizzati. Si potrebbe supporre che la GOx, una volta immobilizzata, mantenga una maggiore attività rispetto all'HRP portando l'HRP ad essere l'enzima limitante e ad avere un segnale colorimetrico nettamente inferiore, tuttavia, non è stato possibile validare e verificare questa ipotesi. L'ipotesi che permette di spiegare il minore segnale ottenuto nel rapporto 1:20 è quella per cui l'incubazione di una concentrazione di HRP pari a 20 volte quella di GOx ne riduca l'immobilizzazione. Di conseguenza l'attività ottenuta sarebbe minore rispetto a quella di un rapporto inferiore, poiché la densità superficiale di molecole di GOx attiva sarebbe minore e dunque anche la velocità di produzione di perossido di idrogeno calerebbe. In conclusione, si può constatare che il rapporto migliore per l'incubazione di GOx e HRP è 1:10.

### 6.5.2 Prove di immobilizzazione di GOx per la definizione della concentrazione di incubazione

Successivamente, l'efficienza dell'immobilizzazione della GOx in diversi tamponi di incubazione è stata l'oggetto degli studi riportati in questa sezione. Dai risultati ottenuti verrà scelta la concentrazione di GOx rispetto alla quale scalare quella di HRP nelle prove di co-immobilizzazione. Le concentrazioni di GOx testate durante l'incubazione sono state 6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.6  $\mu\text{M}$ , nei buffer di incubazione BFC o PBS.

Per poter misurare il segnale della GOx, è stato necessario aggiungere dell'HRP a concentrazione 1  $\mu\text{g/ml}$  alla soluzione di sviluppo. Questa concentrazione di HRP in soluzione è stata considerata in eccesso rispetto alla GOx immobilizzata. I risultati ottenuti sono sintetizzati nel grafico in Figura 6.32.

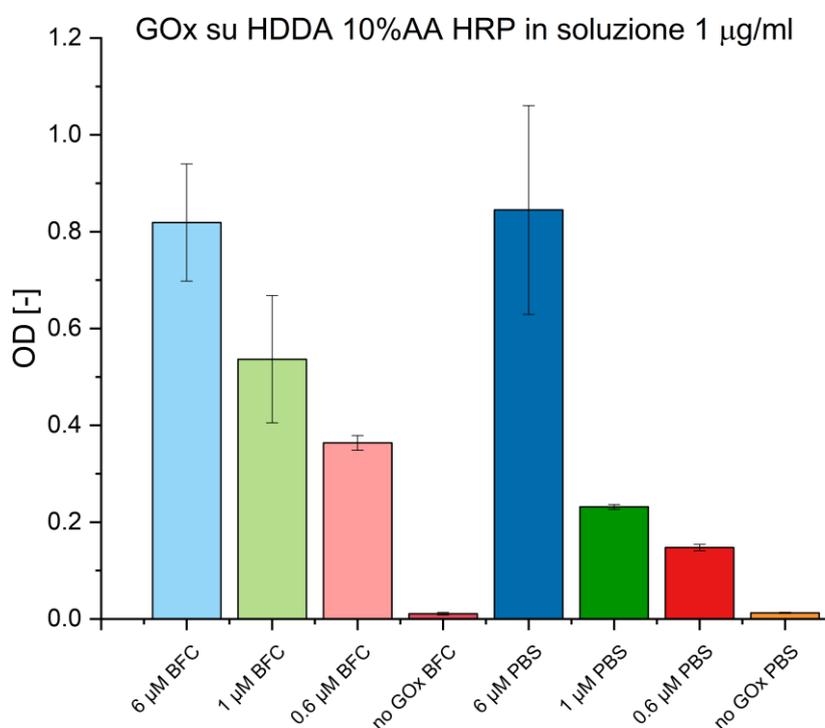


Figura 6.32: Prove di immobilizzazione di sola GOx incubata in BFC (barre chiare) o PBS (barre scure), su HDDA 10%AA. Il valore di OD riportato è dato dalla differenza del valore di assorbanza letto a 450 nm e a 630 nm. Il tempo di sviluppo è di 1 ora. La concentrazione di HRP in soluzione di 1  $\mu\text{g/ml}$ . I protocolli applicati per eseguire questa batteria di prove sono il Protocollo 1 (per i campioni PBS) e il Protocollo 2 (per i campioni BFC) riportati rispettivamente nei paragrafi 5.2.6.1 e 5.2.6.2. Il substrato utilizzato è costituito da glucosio a 12.50 mM, TMB 0.16 mM in 90% BFC e 10% DMSO. I controlli (no GOx) prevedono l'incubazione di solo buffer.

Come si osserva in Figura 6.32, il valore di OD raggiunto aumenta all'aumentare della concentrazione di GOx incubata per entrambi i buffer testati. Più nel dettaglio, il valore di OD medio raggiunto per 6  $\mu\text{M}$  è leggermente maggiore per i campioni in PBS, ma la deviazione standard del dato risulta essere maggiore rispetto al set di campioni in BFC. A concentrazioni

minori invece il segnale è nettamente più alto per i campioni in BFC. Alla luce di questi risultati, il BFC è stato selezionato come buffer migliore per l'immobilizzazione della GOx.

Per quanto concerne la concentrazione di incubazione, nel grafico riportato in Figura 6.33 si può notare che il guadagno in termini di OD ottenuto muovendosi da 1  $\mu\text{M}$  a 6  $\mu\text{M}$  è inferiore in relazione alla differenza di concentrazione incubata se rapportato all'aumento del segnale che si ottiene passando da 0.6  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ . Essendo il segnale ottico registrato a seguito dell'incubazione di GOx a 1  $\mu\text{M}$  accettabile, si è fissata questa concentrazione come valore di concentrazione di GOx rispetto a cui scalare la concentrazione di HRP nelle prove eseguite successivamente.

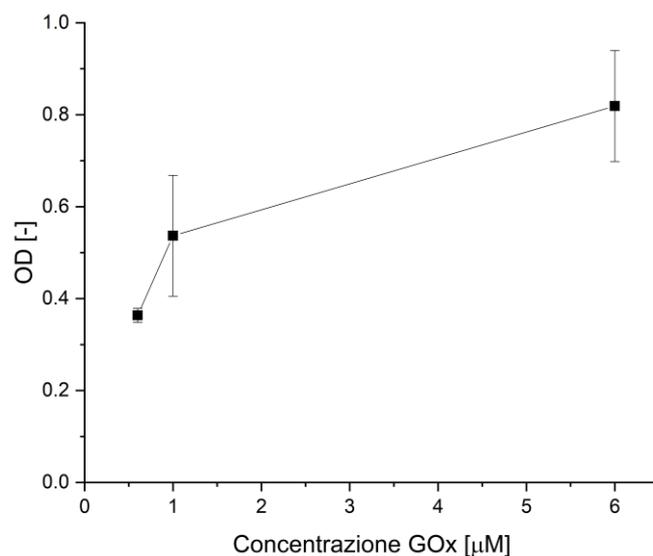


Figura 6.33: Grafico che mostra la misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm ottenuti nelle prove di incubazione di sola GOx per i campioni in BFC in funzione della concentrazione di GOx incubata.

### 6.5.3 Protocollo di co-immobilizzazione per GOx e HRP

Una volta definite le concentrazioni da incubare, ossia GOx 1  $\mu\text{M}$  e HRP 10  $\mu\text{M}$ , è stato ottimizzato il protocollo per la co-immobilizzazione degli enzimi da trasferire sul dispositivo. Questo studio di co-immobilizzazione enzimatica è stato portato avanti su HDDA e HDDA 10%AA con diversi obiettivi.

Innanzitutto, si è voluta verificare l'efficacia dello step di attivazione delle funzionalità carbossiliche (step 1 e 2 previsti dal *Protocollo 1* e dal *Protocollo 2*). Siccome il processo di immobilizzazione assistito da EDC/s-NHS raggiunge la sua massima efficienza a pH 7.5 [83], il fatto che l'incubazione in BFC dia buoni risultati per l'immobilizzazione di GOx, ha portato ad ipotizzare che l'attivazione dei gruppi carbossilici introdotti con l'acido acrilico non giochi un ruolo fondamentale e che dunque l'enzima si leghi covalentemente ai gruppi -COOH presenti in superficie indipendentemente dallo step di attivazione. Inoltre, si è cercata la conferma dei risultati ottenuti nelle prove di immobilizzazione di sola GOx per quanto concerne la scelta del buffer di incubazione (risultati riportati in Paragrafo 6.5.2). Infine, con le prove riportate in questa sezione si è voluto analizzare il tipo di legame che le biomolecole instaurano con la superficie. Infatti, le prove di co-immobilizzazione qui riportate sono state condotte sia su HDDA che su HDDA 10%AA al fine di comprendere se anche per la GOx la componente

di adsorbimento rappresenta un meccanismo di interazione con la superficie rilevante come per l'HRP (risultati riportati nel Paragrafo 6.3.1).

In Tabella 6.5 è riportata una legenda dei campioni analizzati con dettagli sulla formulazione utilizzata ed il protocollo seguito per la fase di immobilizzazione enzimatica, In Figura 6.34 sono mostrati i risultati ottenuti in termini di OD.

Tabella 6.5: Condizioni sperimentali per l'ottimizzazione della co-immobilizzazione di HRP e GOx. La quarta e la quinta colonna riportano rispettivamente il buffer di incubazione e la presenza o meno del processo di attivazione: la combinazione di queste condizioni si traduce nei protocolli descritti nel Paragrafo 5.2.6.

Campione	GOx/HRP [ $\mu$ M]	Formulazione	Buffer di incubazione	Step di attivazione	Protocollo
HDDA att. BFC	1/10	HDDA	BFC	si	2
HDDA no att. BFC	1/10	HDDA	BFC	no	3
HDDA att. PBS	1/10	HDDA	PBS	si	1
HDDA no att. PBS	1/10	HDDA	PBS	no	3
HDDA no HRP BFC	1/-	HDDA	PBS	si	1
HDDA no GOx BFC	-/10	HDDA	PBS	si	1
HDDA 10%AA att. BFC	1/10	HDDA 10%AA	BFC	si	2
HDDA 10%AA no att. BFC	1/10	HDDA 10%AA	BFC	no	3
HDDA 10%AA att. PBS	1/10	HDDA 10%AA	PBS	si	1
HDDA 10%AA no att. PBS	1/10	HDDA 10%AA	PBS	no	3
HDDA 10%AA no HRP PBS	1/-	HDDA 10%AA	PBS	si	1
HDDA 10%AA no GOx PBS	-/10	HDDA 10%AA	PBS	si	1

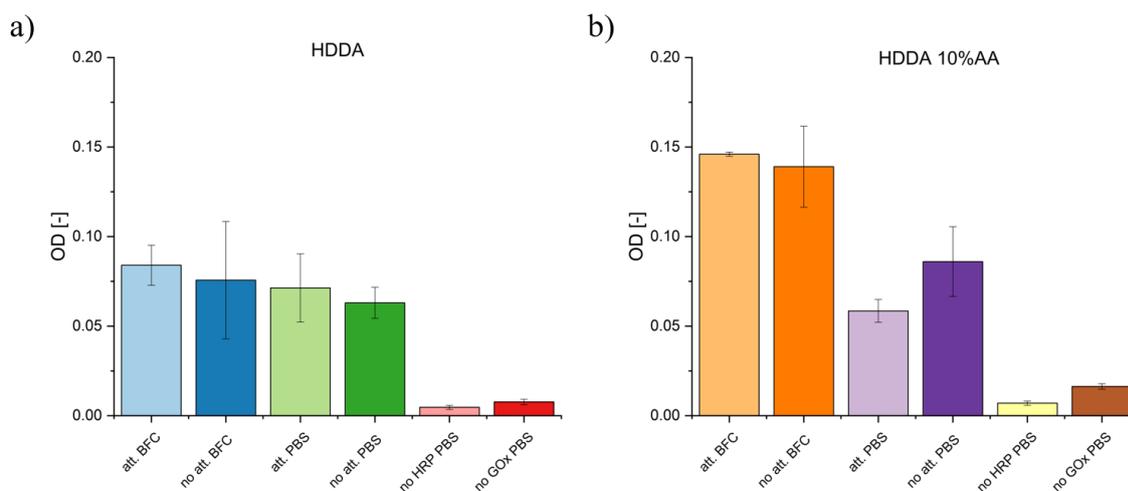


Figura 6.34: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm a seguito dello sviluppo di 1 h su campioni con GOx/HRP co-immobilizzate 1/10  $\mu$ M. Il substrato è costituito da glucosio a 12.50 mM, TMB 0.16 mM in 90% BFC e 10% DMSO. Incubazione in BFC e PBS su HDDA (a) e su HDDA 10%AA (b).

Dai grafici in Figura 6.34 si può dedurre che anche nel caso della co-immobilizzazione di HRP e GOx si ha un segnale maggiore per i campioni incubati in BFC rispetto a quelli incubati in PBS, pertanto, si può constatare che il BFC sia il buffer più adatto a garantire l'immobilizzazione di GOx sia che questa sia incubata da sola che in presenza di HRP. Inoltre, la presenza di un'assorbanza non trascurabile anche per i campioni di HDDA (Figura 6.34a) permette di affermare che anche per la GOx la componente di adsorbimento è rilevante nella sua immobilizzazione così come era stato riconosciuto per la sola HRP (6.3.1). Inoltre, come già indicato per la sola HRP potrebbe esserci un contributo dovuto a reazioni di tipo aza-michael [134]. Confrontando i dati relativi alle incubazioni in BFC, si ha un aumento del segnale per i campioni di HDDA 10%AA rispetto al solo HDDA, il che permette di asserire che i gruppi -COOH introdotti con l'acido acrilico hanno comunque un ruolo nella fase di immobilizzazione. Così come si è definito nella sezione 6.3.1, anche in questo caso si può affermare la presenza di una componente di immobilizzazione di tipo covalente ascrivibile alla creazione di un legame tra i gruppi carbossilici superficiali e i gruppi amminici presenti nelle biomolecole. Infine, confrontando le coppie "attivato/non attivato" a parità di tutte le altre proprietà, si può notare che il segnale non risulta differire in maniera sostanziale. In conclusione, si può dedurre che la fase di attivazione delle funzionalità carbossiliche non risulta essere necessaria ai fini dell'immobilizzazione degli enzimi in questo protocollo.

## 6.6 Valutazione dei parametri cinetici degli enzimi su campione stampato

Al fine di confrontare i risultati cinetici ottenuti per GOx e HRP in soluzione sono state condotte delle cinetiche stoppate con enzimi immobilizzati su provino HDDA 10%AA e i risultati ottenuti riportati in questa sezione.

### 6.6.1 Cinetica dell'HRP immobilizzata su HDDA 10%AA

La struttura della prova è stata descritta in 5.2.7. Avendo selezionato il tampone BFC per il protocollo finale di immobilizzazione che verrà utilizzato nel dispositivo (vedi 5.2.6.3), anche per la cinetica di HRP immobilizzata su campione stampato è stata applicata la stessa procedura. Su ogni campione di HDDA 10%AA sono state incubate 5 U di HRP (la concentrazione corrispondente a questo valore è pari a 23.70 µg/ml).

In Figura 6.35 si riporta il grafico di OD rispetto al tempo di reazione, mentre in Figura 6.36 la linearizzazione di Lineweaver-Burk.

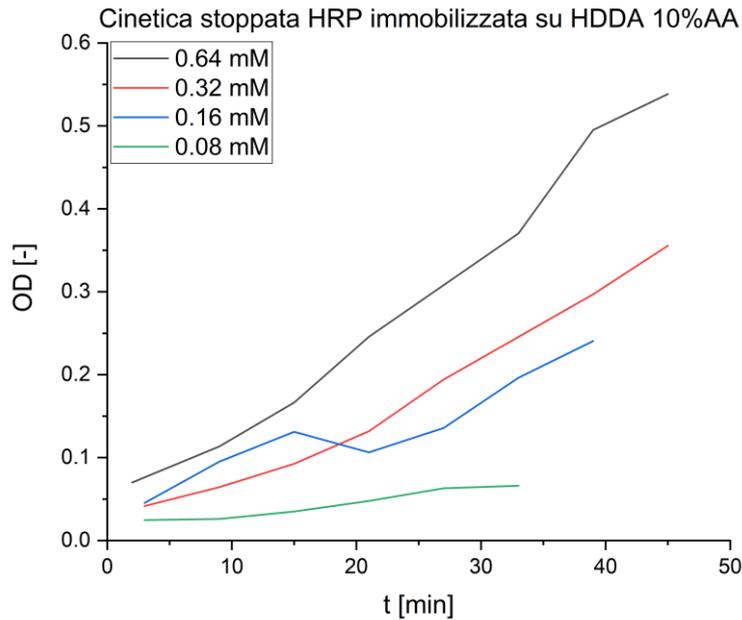


Figura 6.35: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo per la cinetica stoppata di HRP immobilizzata. Le concentrazioni di TMB sono riportate nello specchio in alto a sinistra. La concentrazione di perossido di idrogeno è mantenuta in eccesso e pari a 4.90 mM.

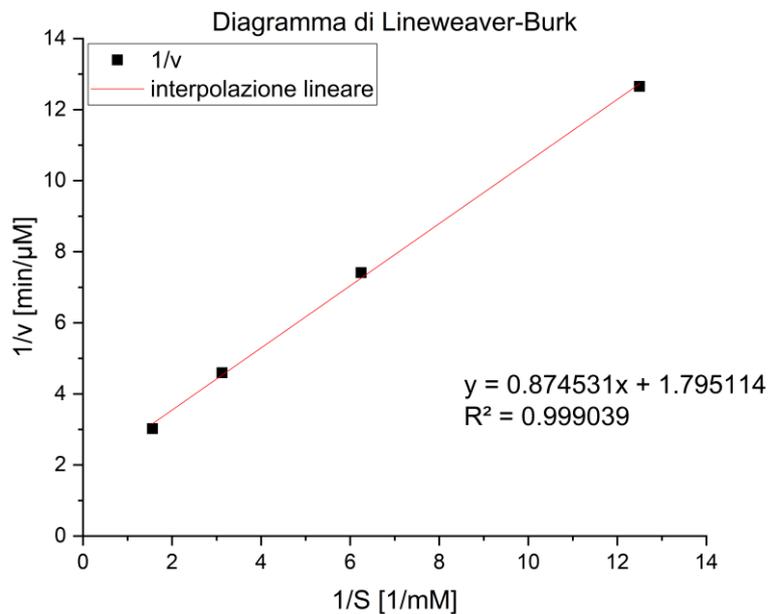


Figura 6.36: Diagramma di Lineweaver-Burk per la cinetica dell'HRP immobilizzata su campione HDDA 10%AA.

I parametri cinetici estrapolati dal diagramma di Lineweaver-Burk di Figura 6.36 per l'HRP immobilizzata su HDDA 10%AA sono messi a confronto con i parametri ottenuti per l'enzima in soluzione (prove presentate in 6.4.1.2) come è possibile osservare in Tabella 6.6.

Tabella 6.6: Confronto dei parametri cinetici ottenuti per la cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  di HRP immobilizzata su provino HDDA 10%AA e dei parametri cinetici ottenuti dalla cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  di HRP in soluzione.

	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu$ M/min]
Stoppata HRP immobilizzata	0.49	0.56
Stoppata HRP in soluzione	1.15	206.14

Come si può osservare dai parametri riportati in Tabella 6.6, si ha un lieve abbassamento della  $K_m$  per l'enzima immobilizzato su campione stampato rispetto a quello dell'enzima in soluzione. Questo risultato potrebbe essere dovuto ad una maggior stabilità dell'enzima immobilizzato rispetto a quello libero in soluzione. In realtà, vista la lieve differenza è probabilmente dovuto all'incertezza della misura, e quindi non rappresenta un dato rilevante per il confronto tra l'enzima in soluzione ed immobilizzato. Tuttavia, il valore di  $V_{max}$  per l'enzima immobilizzato è nettamente inferiore rispetto a quello dell'HRP in soluzione. Il parametro di  $V_{max}$  dipende dalla concentrazione totale di enzima, pertanto, anche se non è stato possibile risalire alla quantità di HRP effettivamente immobilizzata sul campione di HDDA10%AA, questo valore dimostra come tale quantità sia nettamente inferiore rispetto alla concentrazione incubata durante le fasi di immobilizzazione, o che una gran parte dell'enzima immobilizzato non sia più funzionale, una volta immobilizzato sulla superficie. Ad esempio, si può ipotizzare una minore accessibilità del sito attivo dell'enzima immobilizzato che va ad influenzare i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$ .

### 6.6.2 Cinetica GOx/HRP co-immobilizzate su HDDA 10%AA

Successivamente, sono state condotte delle prove di cinetica anche per il caso di coimmobilizzazione su HDDA 10%AA. Le concentrazioni di GOx e HRP rispettivamente incubate sono state 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M in BFC ed il protocollo seguito è quello riportato in 5.2.6.3.

In Figura 6.37 si riporta il grafico in OD e in Figura 6.38 il diagramma di Lineweaver-Burk.

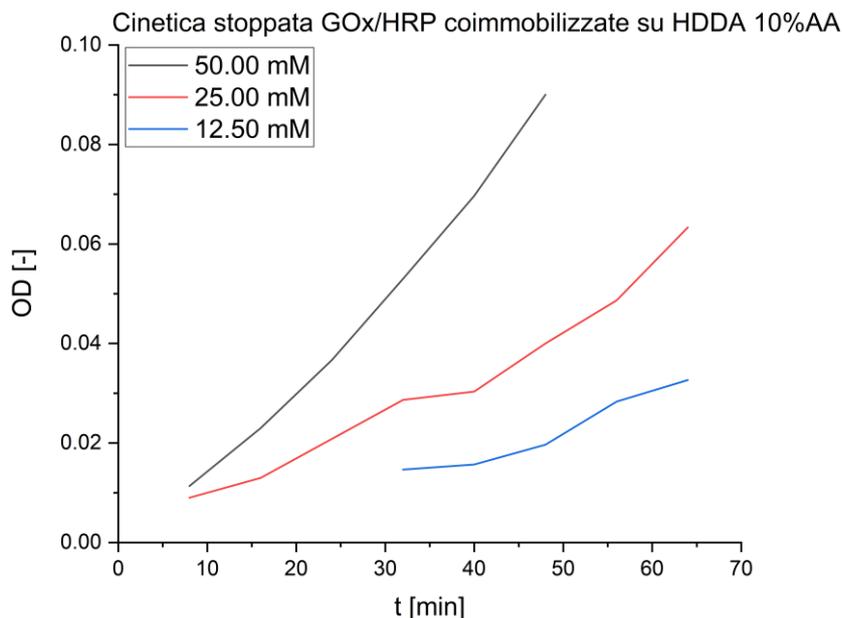


Figura 6.37: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm nel tempo per la cinetica stoppata di GOx/HRP immobilizzate. Le concentrazioni di glucosio sono riportate nello specchio in alto a sinistra. La concentrazione di TMB è mantenuta costante e pari a 0.16 mM.

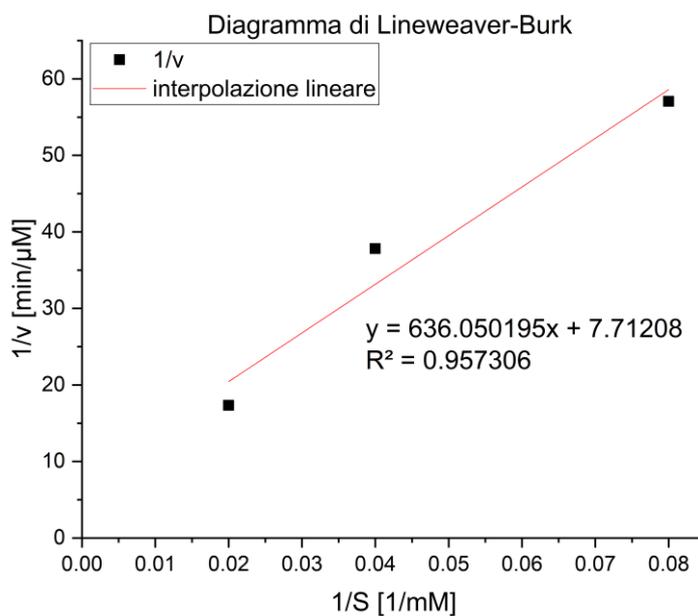


Figura 6.38: Diagramma di Lineweaver-Burk per la cinetica di GOx/HRP co-immobilizzate su campione HDDA 10%AA.

I parametri cinetici estrapolati dal diagramma di Lineweaver-Burk di Figura 6.38 per GOx e HRP co-immobilizzate su HDDA 10%AA sono messi a confronto con i parametri ottenuti per l'enzima in soluzione (prove presentate in 6.4.2) come è possibile osservare in Tabella 6.7.

Tabella 6.7: Confronto dei parametri cinetici ottenuti per la cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  di GOx/HRP co-immobilizzate su provino HDDA 10%AA e parametri cinetici ottenuti dalla cinetica stoppata con  $H_2SO_4$  di GOx/HRP in soluzione. In entrambi i casi il rapporto GOx/HRP è 1:10.

	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu$ M/min]
Stoppata GOx/HRP co-immobilizzata	82.47	0.13
Stoppata GOx/HRP in soluzione	32.84	17.02

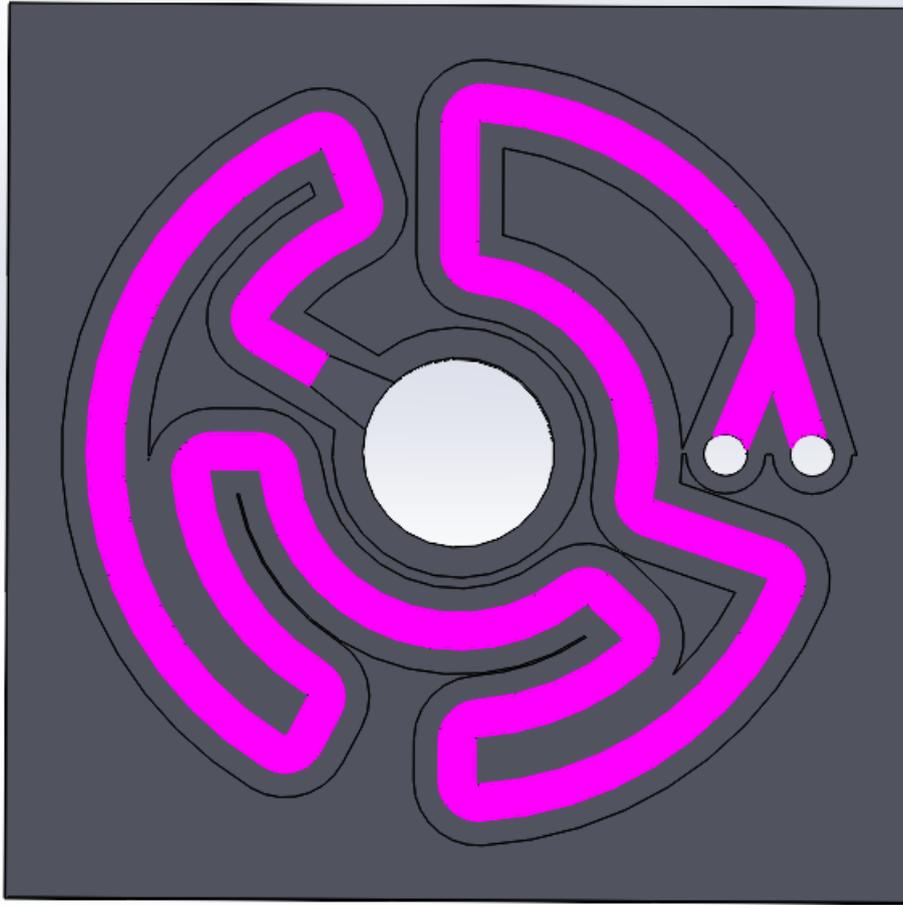
Come si può osservare dal grafico in Figura 6.37 si ha mancanza dei punti a tempistiche basse per la concentrazione minore di glucosio, in quanto non hanno fornito un segnale accettabile in termini di densità ottica. Dai dati in Tabella 6.7 emerge che la  $K_m$  ottenuta per il sistema risulta essere circa 2.5 volte maggiore rispetto a quella ottenuta in soluzione. Visto che è improbabile che ci sia stata una variazione dell'affinità, probabilmente questo risultato dimostra come sussistano delle limitazioni dovute alle due reazioni catalizzate in cascata dai due enzimi, o molto più probabilmente il sito di legame di uno dei due enzimi o di entrambi risulta meno accessibile dopo l'immobilizzazione. Questo si riflette anche sui valori di  $V_{max}$ . Come per la cinetica di sola HRP immobilizzata, anche in questo caso si nota una forte diminuzione di questo valore. Perciò, anche in questo caso si può ipotizzare che la quantità di enzima effettivamente immobilizzato sia molto bassa, rispetto alla concentrazione incubata in fase di immobilizzazione, o che ci sia una minore accessibilità del sito attivo dei due enzimi immobilizzati che va ad influenzare i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$ .

## 6.7 Stampa del dispositivo

Sulla base di tutti gli studi preliminari riportati nella sezione 6.3 il materiale utilizzato per la stampa del biosensore è stato HDDA 10%AA.

Il CAD del dispositivo è stato realizzato con il software SOLIDWORKS®. Il design è stato studiato nell'ottica del raggiungimento di due obiettivi principali: inserire una fluidica dal profilo tortuoso, così da agevolare il mescolamento delle soluzioni in ingresso (TMB e glucosio) e facilitare la fase di lettura del segnale colorimetrico che il biosensore fornisce. Il biosensore realizzato presenta due input: uno per la soluzione contenente il TMB e l'altro per la soluzione contenente l'analita d'interesse, ossia il glucosio, e la loro miscelazione è condizione necessaria per la buona riuscita della misura. Tuttavia, per gli studi preliminari portati a termine in questo progetto di Tesi, si è iniettata sempre una sola soluzione contenente entrambi i substrati (glucosio e TMB) sfruttando dunque un solo ingresso.

È stato disegnato un dispositivo adattabile al lettore di piastre multipozzetto, strumento che permette l'analisi del segnale colorimetrico prodotto dal biosensore, in modo tale da rendere agevole il processo di lettura del segnale. Più nel dettaglio la fluidica si sviluppa su una base quadrata  $25 \times 25 \times 0.5 \text{ mm}^3$  e si articola attorno ad un cilindro cavo nel quale si ha lo scarico della soluzione dopo che questa ha attraversato l'intera fluidica. In Figura 6.39 si riporta una sezione del CAD che mostra il profilo del percorso delineato dal canale.



*Figura 6.39: Sezione della fluidica (rosa). Il quadrato (grigio scuro) su cui si posiziona il canale è la base  $25 \times 25 \text{ mm}^2$ . I due ingressi sono rappresentati dai fori sulla destra e il sistema di caricamento è perpendicolare rispetto alla base quadrata.*

La sezione del condotto sporge dalla base quadrata ed il caricamento della soluzione è perpendicolare rispetto alla base stessa. Per evitare problemi di perdita del liquido legati alla tensione superficiale, si è realizzato uno svaso in corrispondenza della terminazione del canale nel cilindro. La sezione della fluidica è rettangolare con larghezza pari a 1 mm, altezza pari a 1.5 mm ed uno spessore della parete pari a 0.7 mm. In Figura 6.40 si mostra un'immagine della fluidica stampata.



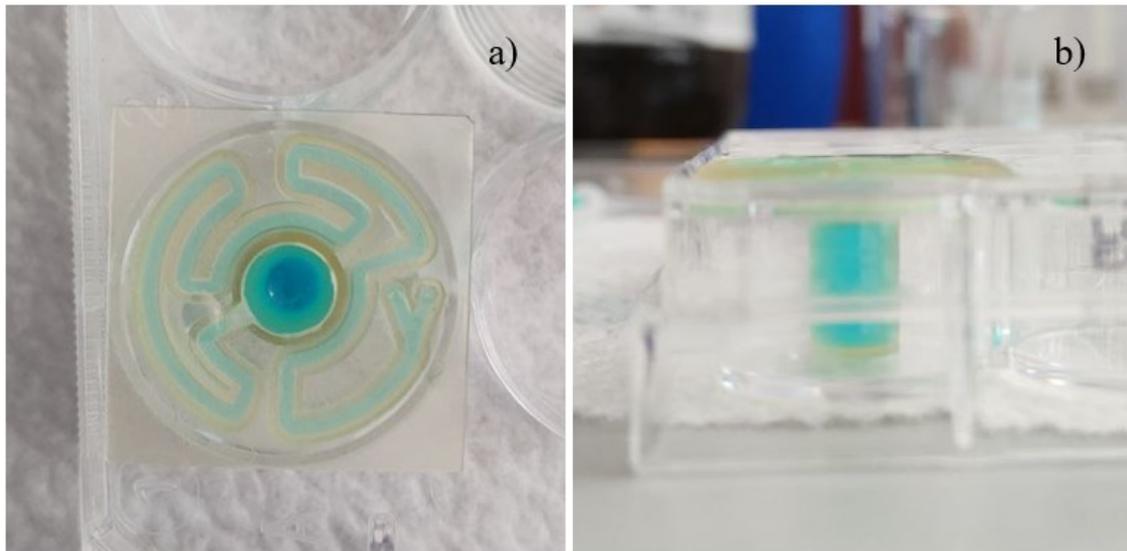
*Figura 6.40: Immagine della base quadrata del dispositivo dalla quale sporge la fluidica. Si può osservare la modalità di caricamento del liquido (soluzione acquosa di colorante "Brilliant Green") che è perpendicolare al piano della base quadrata.*

L'intero percorso è inscritto in una circonferenza di diametro 22 mm. Questa dimensione è stata definita poiché uno degli obiettivi perseguiti è quello di poter sfruttare il pozzetto di una piastra da 12 pozzetti per alloggiarvi il dispositivo come mostrato in Figura 6.41, dato che il diametro superiore di un pozzetto di una piastra da 12 pozzetti è 22.78 mm. L'ancoraggio al pozzetto è garantito dal fatto che la fluidica è sporgente rispetto alla base quadrata.



*Figura 6.41: Stampa parziale della prima versione del dispositivo inserita in un pozzetto di una piastra da 12 pozzetti.*

Sono state realizzate due versioni della struttura del biosensore. I due prototipi sono accomunati dal disegno e dalle dimensioni del condotto e della base quadrata descritti in precedenza. Nella prima struttura realizzata il liquido viene scaricato in un cilindro cavo e chiuso sul fondo il quale replica le dimensioni di un pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. Lo scopo, infatti, è stato quello di costruire un pozzetto di una piastra da 96 pozzetti stampato 3D che possa essere inserito in un lettore di piastre multipozzetto. In Figura 6.42 si riporta la vista dall'alto (Figura 6.42 a) e laterale (Figura 6.42 b) del dispositivo con all'interno una soluzione acquosa di colorante "Brilliant Green".



*Figura 6.42: Vista dall'alto (a) e laterale (b) della prima versione del dispositivo con all'interno una soluzione acquosa di colorante "Brilliant Green".*

Nella seconda versione del dispositivo è stato eliminato il pozzetto stampato 3D poiché il fondo avrebbe interferito con la lettura di assorbanza ed è stato sostituito con un cilindro cavo passante più corto e con un diametro minore come mostrato in Figura 6.43. Più precisamente il cilindro in cui viene scaricato il liquido in questa seconda versione presenta diametro interno pari a 5.3 mm e spessore della parete pari a 0.4 mm e sporge per 1.8 mm oltre la struttura della fluidica: ciò permette al dispositivo di ancorarsi all'interno di un pozzetto della piastra da 96 pozzetti, il cui diametro superiore è di 6.96 mm.

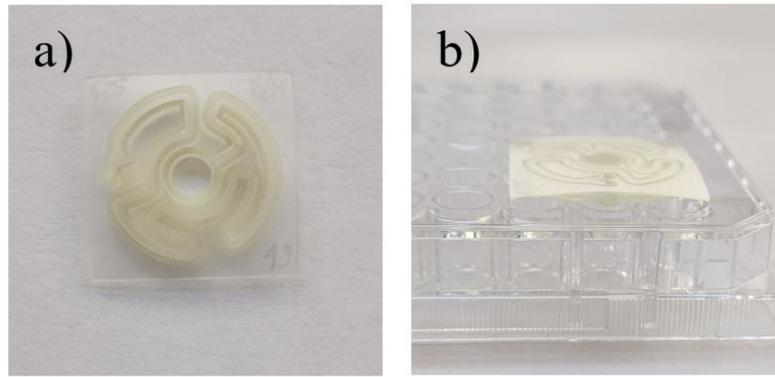


Figura 6.43: Vista dall'alto del dispositivo finale (a), vista laterale del dispositivo finale (b) sul pozzetto di una piastra da 96 pozzetti.

In questo modo il liquido può essere direttamente raccolto in un pozzetto di una piastra multipozzetto da 96 pozzetti come mostrato in Figura 6.44.

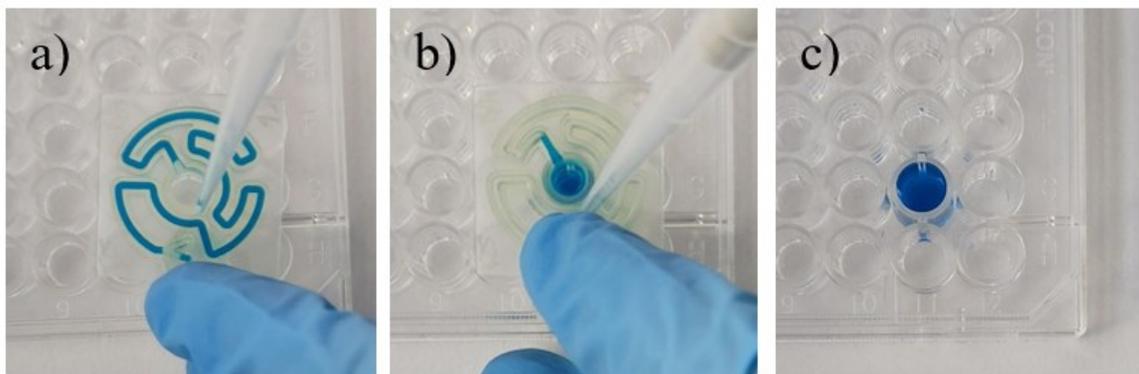


Figura 6.44: Sequenza del caricamento di una soluzione di colorante alimentare nella versione finale del dispositivo (a) e raccolta di questa nel pozzetto di una piastra da 96 pozzetti (b-c).

Questa soluzione ha permesso di sfruttare i pozzetti di una piastra da 12 pozzetti per gestire le fasi di immobilizzazione enzimatica e gli studi preliminari eseguiti sui dispositivi avendo comunque garanzia di una buona lettura del segnale al lettore di piastre.

In Figura 6.45 si riporta la scansione 3D del dispositivo finale per verificarne la *print fidelity* mentre in Figura 6.46 la scansione 3D dello stesso.

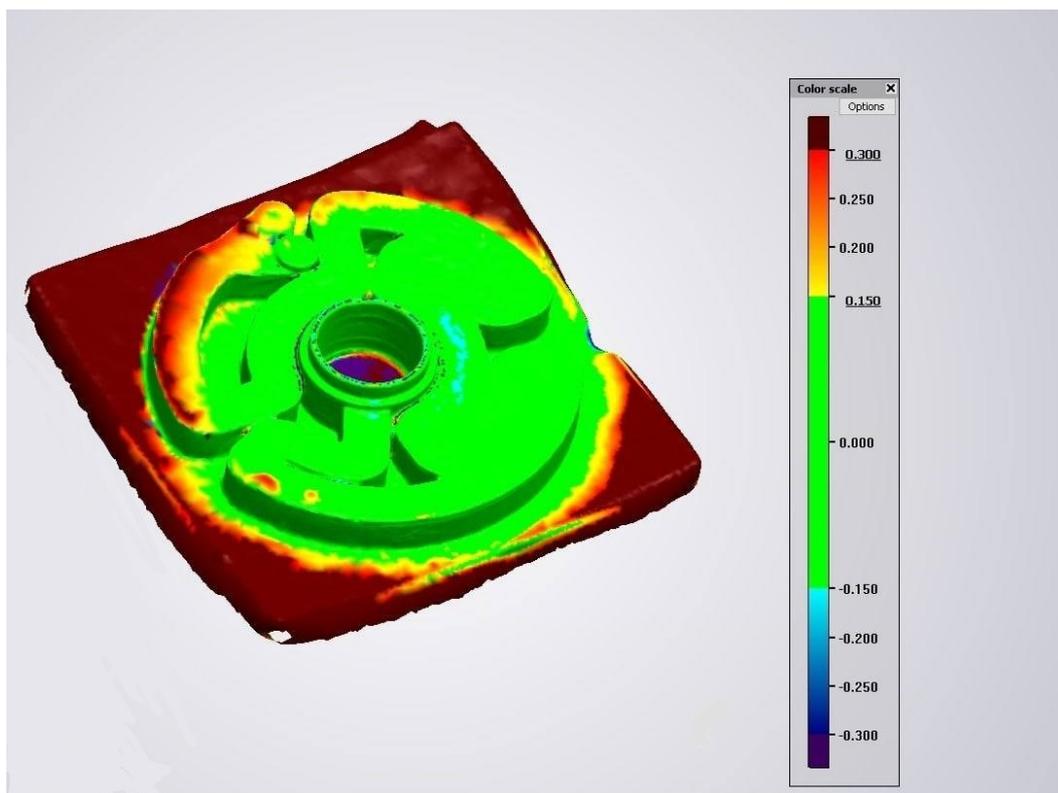


Figura 6.45: Scansione 3D del dispositivo per verificarne la print fidelity.

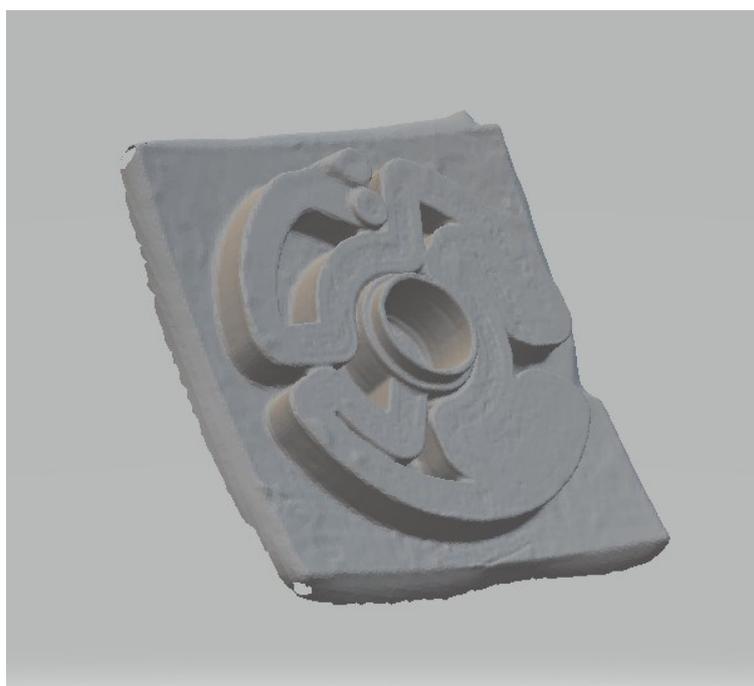


Figura 6.46: Modello del dispositivo ottenuto durante la scansione 3D.

## 6.8 Co-immobilizzazione GOx/HRP nel dispositivo

Nel passaggio dal campione  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  al dispositivo, sono state mantenute le concentrazioni di incubazione di GOx e HRP definite dagli studi riportati nel Paragrafo 6.5.2, vale a dire GOx  $1 \mu\text{M}$  e HRP  $10 \mu\text{M}$ . In Tabella 6.8 si riporta un confronto tra le condizioni di incubazione su campione e nel dispositivo.

Tabella 6.8: Confronto tra le condizioni di incubazione per il campione  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  e il dispositivo. La superficie esposta è stata stimata sul CAD realizzato attraverso la funzione di proprietà di massa di SOLIDWORKS.

	Volume incubato (V) [mm <sup>3</sup> ]	Superficie esposta (S) [mm <sup>2</sup> ]	[GOx]:[HRP] [μM]	V/S
Campione $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$	50	~ 25	1:10	~ 2
Dispositivo microfluidico	160	~ 500	1:10	~ 0.3

Da Tabella 6.8 si può notare che il rapporto V/S è molto più alto per il campione rispetto a quello ottenuto per la fluidica e dunque a parità di volume incubato si ha una disponibilità di superficie molto maggiore per il dispositivo rispetto al campione.

Il protocollo seguito per eseguire la prova è quello riportato in 5.2.6.4. I risultati in termini di OD raggiunti sono riportati in Figura 6.47.

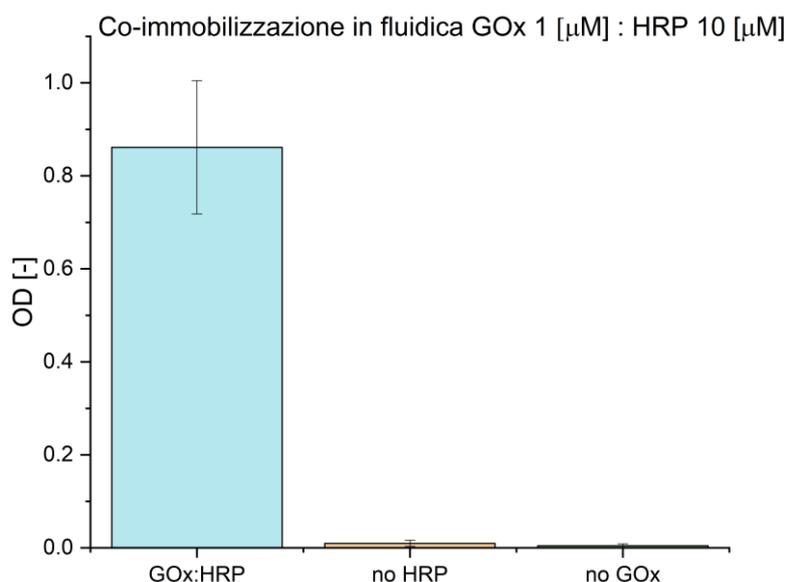


Figura 6.47: Misura della differenza tra i segnali di OD a 450 nm e 630 nm a seguito dello sviluppo di 30.5 minuti con glucosio 12.50 mM e TMB 0.16 mM. Le concentrazioni di GOx e HRP incubate sono rispettivamente 1 μM e 10 μM. I controlli sono costituiti dall'incubazione di 1 μM di GOx (no HRP) e 10 μM di HRP (no GOx).

Come mostrato in Figura 6.47 il valore di densità ottica raggiunto a seguito dello sviluppo del dispositivo (~0.86) è nettamente superiore rispetto ai valori di OD ottenuti per i campioni non attivati ed incubati in BFC (~0.14) (campioni “no att. BFC” di Figura 6.34b), nonostante il tempo di sviluppo della reazione sia stato la metà. Questo è indice del fatto che anche se il numero di moli di enzimi disponibili ad essere immobilizzate per unità di superficie è inferiore rispetto al caso del  $5 \times 5 \times 0.9 \text{ mm}^3$  si ottiene un segnale ottico maggiore. Per spiegare questo

fenomeno si potrebbe ipotizzare che la disponibilità di una maggiore area superficiale porti alla immobilizzazione di un maggior numero di molecole di enzima e dunque la velocità della reazione aumenti. Inoltre, poiché il substrato si trova costretto all'interno della fluidica, è presente una minore influenza dei fenomeni di trasferimento di massa e ciò si traduce in una maggiore probabilità che il substrato entri in contatto con il sito attivo del rispettivo enzima e venga trasformato. In Figura 6.48 si riporta un'immagine dei dispositivi durante lo sviluppo.

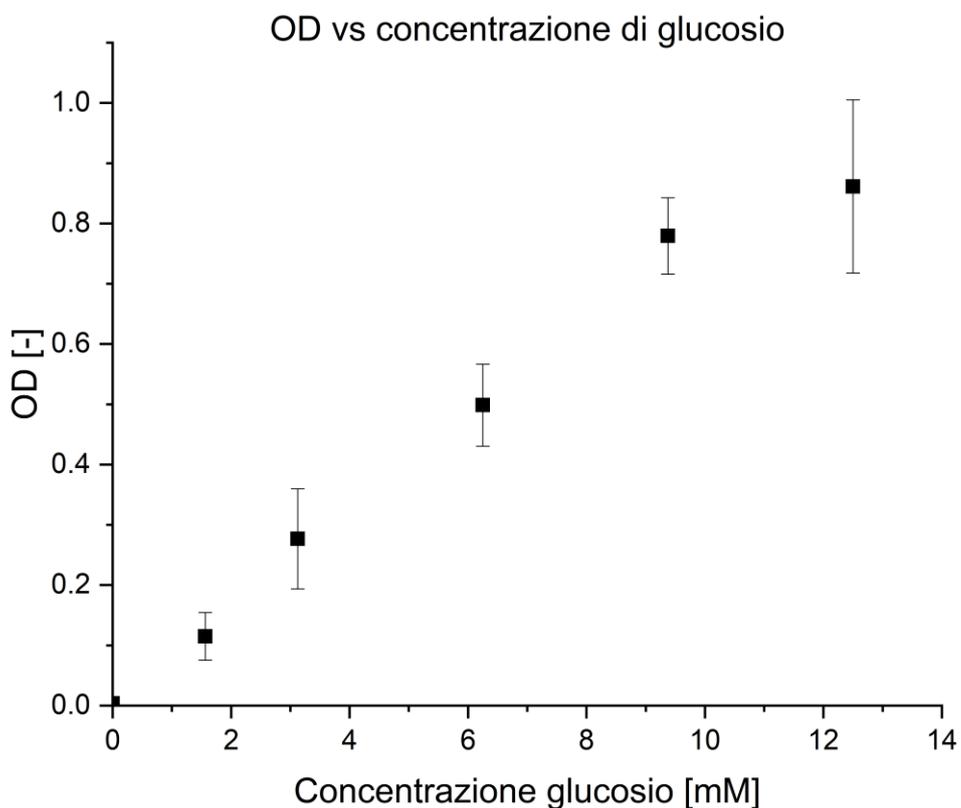


Figura 6.48: Immagine dei dispositivi durante lo sviluppo. I campioni positivi con co-immobilizzate GOx e HRP sono collocati nella prima riga in alto, la seconda riga è costituita da “no HRP”, la terza da “no GOx”.

Come evidente in Figura 6.48, il colore della soluzione nei dispositivi positivi tende al giallo. La TMB, dunque, tende a trovarsi nella forma di diimmina già durante lo sviluppo, prima che la reazione venga bloccata con  $H_2SO_4$ . Per spiegare questo fenomeno sono state portate avanti diverse supposizioni. Una prima spiegazione è quella secondo cui questo fenomeno sia dovuto alla presenza di un pH basso all'interno della fluidica che porta la forma “complesso a trasferimento di carica” (CTC) di TMB ossidata da HRP ad ossidarsi a diimmina. Oppure potrebbe essere un fenomeno legato all'elevata presenza di HRP all'interno della fluidica che nelle condizioni di concentrazione di TMB e glucosio porta nel tempo alla doppia ossidazione della TMB [73], [136].

## 6.9 Curva di calibrazione del dispositivo e calcolo di LOD e LOQ

In ultima analisi sono state eseguite delle prove volte a valutare la sensibilità del biosensore. Inoltre, è stato possibile valutare il range di linearità, ossia, l'intervallo di concentrazioni per cui il segnale generato dal biosensore cambia linearmente [89]. Il range di concentrazioni di glucosio indagate va da 0 mM a 12.50 mM. In Figura 6.49 si riportano i risultati di OD medie ottenute in funzione della concentrazione di glucosio.



*Figura 6.49: Curva OD vs Concentrazione di glucosio per il biosensore.*

Come si può osservare dal grafico in Figura 6.49 è presente un tratto lineare che va da 0 mM ad una concentrazione di glucosio pari a 9.38 mM, pertanto, si può affermare che il range di concentrazioni in cui il biosensore presenta linearità arriva fino a 9.38 mM. Prendendo in considerazione questo tratto lineare sono stati calcolati il LOD e il LOQ del biosensore.

In Figura 6.50 si riporta la retta di interpolazione da cui sono stati estrapolati il valore di coefficiente angolare e intercetta sfruttati per il calcolo di LOD e LOQ.

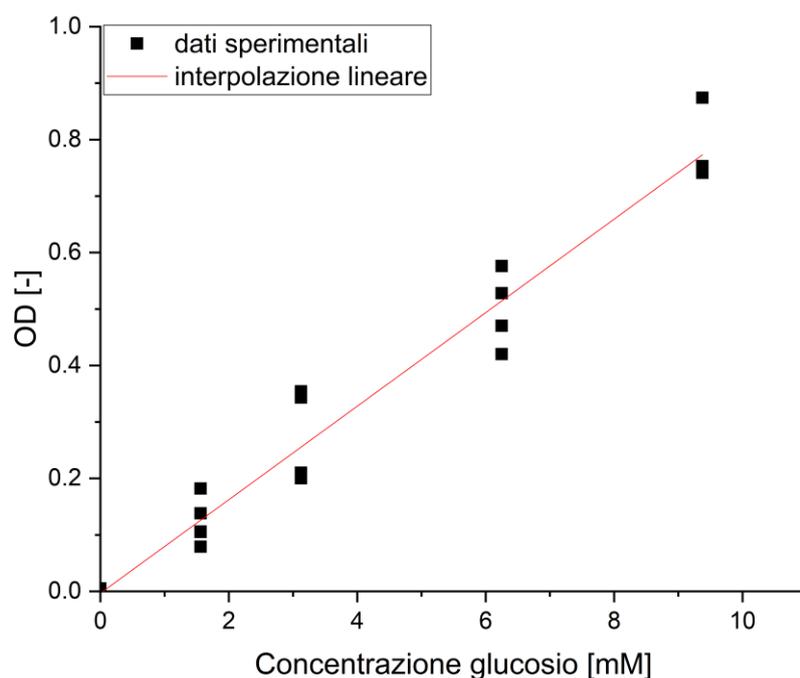


Figura 6.50: Retta di taratura del tratto lineare per calcolo di LOD e LOQ.

Coefficiente angolare e intercetta della retta di interpolazione ottenuta con il software ORIGIN sono riportati in Tabella 6.9.

Tabella 6.9: Valore del coefficiente angolare ( $m$ ) e dell'intercetta ( $q$ ) e relative incertezze ottenute dall'interpolazione dei dati sperimentali con il software ORIGIN.

	Valore	Deviazione standard
$m$	0.0828	0.0037
$q$	-0.00323	0.0192

Sfruttando i parametri di interpolazione riportati in Tabella 6.9 si sono calcolati LOD e LOQ secondo il metodo riportato nel Paragrafo 5.2.8. I valori di LOD e LOQ trovati sono riportati in Tabella 6.10.

Tabella 6.10: Valori di LOD e LOQ ottenuti per il biosensore.

	Concentrazione [ $\mu\text{M}$ ]	Concentrazione [mg/dl]
LOD	139.00	2.50
LOQ	268.14	4.83

Dato il range di linearità, il biosensore sviluppato risulta versatile e potrebbe essere applicato nel settore medico per l'analisi della concentrazione di glucosio nel sangue. In particolare, si ha che il livello normale di glucosio nel sangue va da 80 a 100 mg/dl a digiuno per rimanere sotto i 140 mg/dl dopo un pasto [137]. In Tabella 6.11 si riportano i livelli di glucosio nel sangue.

Tabella 6.11: Concentrazione di glucosio nel sangue di diverse categorie di persone prima e dopo un pasto.  
 Tabella tradotta da [137].

Categoria della persona	Digiuno		Dopo pasto
	Glucosio minimo [mg/dl]	Glucosio massimo [mg/dl]	2-3 ore dopo il pasto Glucosio [mg/dl]
Ipoglicemico	-	< 59	< 60
Pre-ipoglicemico	60	69	60-70
Normale	80	100	< 140
Pre-diabetico	101	126	140-200
Diabetico	> 126	-	> 200

La massima concentrazione rilevabile nel tratto lineare (9.38 mM) corrisponde a ~170 mg/dl il che permette di rilevare il livello glicemico di un prediabetico a digiuno. Inoltre, il valore dato dal LOQ corrisponde 4.83 mg/dl il che permette di affermare che il biosensore è sensibile nel range di valori legati all'ipoglicemia e alla normalità della concentrazione di glucosio nel sangue.

## 7 Conclusioni e prospettive future

In questo lavoro di Tesi è stato sviluppato un primo prototipo di biosensore enzimatico stampato 3D con tecnologia DLP per il rilevamento del glucosio. Inoltre, sono stati condotti degli studi in soluzione per ottenere i parametri cinetici dei due enzimi utilizzati, ossia GOx e HRP da confrontare poi con i parametri ottenuti una volta che le biomolecole sono state immobilizzate sul materiale polimerico.

La formulazione che si è dimostrata più adatta alla realizzazione del dispositivo è stata HDDA 10%AA, grazie alla bassa viscosità, al basso grado di rigonfiamento mostrato e al mantenimento di attività delle biomolecole una volta che queste sono state immobilizzate.

Gli studi di co-immobilizzazione enzimatica sono stati svolti lavorando su due fronti: la ricerca del migliore rapporto tra GOx e HRP per il raggiungimento del migliore risultato in termini di segnale colorimetrico e la ricerca del migliore protocollo da seguire per raggiungere un buon grado di immobilizzazione delle biomolecole. L'esito di questi esperimenti ha portato alla selezione del rapporto GOx/HRP 1:10 come migliore rapporto di incubazione per ottenere un buon segnale colorimetrico. Inoltre, la concentrazione di incubazione di GOx selezionata è stata 1  $\mu\text{M}$ . Infine, il protocollo di immobilizzazione inizialmente previsto con attivazione con EDC/s-NHS e incubazione delle biomolecole in PBS è stato modificato eliminando la fase di attivazione e incubando le biomolecole in BFC.

Dal confronto degli studi cinetici in soluzione con le cinetiche enzimatiche su campione stampato in HDDA 10%AA è possibile affermare che il valore di  $K_m$  per la TMB mostrato dall'HRP immobilizzata è risultato confrontabile con quello dell'enzima in soluzione. Al contrario il valore ottenuto dalla reazione a cascata di GOx co-immobilizzata con HRP è maggiore rispetto a quello ottenuto con i due enzimi in soluzione, probabilmente per effetto di limitazioni dovute al trasferimento di massa, o ad una minore accessibilità del sito attivo dei due enzimi immobilizzati. Queste ipotesi sono corroborate dal confronto dei valori di  $V_{max}$  che si ottengono coi due enzimi liberi in soluzione o immobilizzati. Sia la sola HRP che i due enzimi co-immobilizzati mostrano dei valori di  $V_{max}$  nettamente ridotti. Questo in parte è sicuramente dovuto ad una scarsa efficienza di immobilizzazione dei due enzimi in una forma cataliticamente attiva.

Il risultato di maggior rilievo raggiunto sta nell'ottenimento di un dispositivo miniaturizzato e sensibile con un buon range di linearità che arriva a 9.38 mM di glucosio e un LOD pari a 139  $\mu\text{M}$ , ovvero 2.50 mg/dl. Grazie a questi risultati, il dispositivo realizzato può considerarsi tra i primi prototipi di un biosensore di glucosio prodotti tramite additive manufacturing per applicazione in ambito medico ed alimentare.

Il biosensore è stato testato solamente con soluzioni ideali, ossia, per misurare l'analita sciolto in buffer. Una prospettiva futura per questo lavoro potrebbe essere quella di testare la sensibilità del biosensore con soluzioni a matrice complessa e soluzioni a pH diverso rispetto a quello utilizzato in questo lavoro di Tesi. Inoltre, potrebbe essere testato in modalità dinamica ossia con l'ausilio di un sistema di movimentazione delle soluzioni che permetta ai reagenti di essere in movimento durante lo sviluppo per verificare se i parametri ottenuti possono essere influenzati dalla fluidica.

Altro aspetto che potrebbe essere approfondito è quello della stabilità del biosensore nel tempo: si potrebbero effettuare studi volti a verificare quanto la riproducibilità della misura fornita dal dispositivo venga influenzata dall'invecchiamento del materiale polimerico o degli enzimi immobilizzati oppure dalle condizioni di conservazione del dispositivo stesso.

## 8 Bibliografia

- [1] D. Liu *et al.*, “Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 122, p. 115701, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.trac.2019.115701.
- [2] G. P. Nikoleli, C. Siontorou, D. Nikolelis, S. Bratakou, S. Karapetis, and N. Tzamtzis, “Biosensors Based on Microfluidic Devices Lab-on-a-Chip and Microfluidic Technology,” in *Nanotechnology and Biosensors*, 2018, pp. 375–394. doi: 10.1016/B978-0-12-813855-7.00013-1.
- [3] D. Rackus, M. Shamsi, and A. Wheeler, “Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, pp. 5320–5340, 2015, doi: 10.1039/C4CS00369A.
- [4] M.-Y. Lee, A. Srinivasan, B. Ku, and J. S. Dordick, “Multienzyme catalysis in microfluidic biochips,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 83, no. 1, pp. 20–28, Jul. 2003, doi: 10.1002/bit.10642.
- [5] Z. X. Low, Y. T. Chua, B. M. Ray, D. Mattia, I. S. Metcalfe, and D. A. Patterson, “Perspective on 3D printing of separation membranes and comparison to related unconventional fabrication techniques,” *J. Memb. Sci.*, vol. 523, pp. 596–613, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.memsci.2016.10.006.
- [6] S. C. Ligon, R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr, and R. Mülhaupt, “Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 15, pp. 10212–10290, Aug. 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00074.
- [7] T. D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K. T. Q. Nguyen, and D. Hui, “Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 143, pp. 172–196, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.compositesb.2018.02.012.
- [8] O. Diegel, “Additive Manufacturing: An overview,” in *Comprehensive Materials Processing*, vol. 10, Elsevier, 2014, pp. 3–18. doi: 10.1016/B978-0-08-096532-1.01000-1.
- [9] N. Shahrubudin, T. C. Lee, and R. Ramlan, “An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications,” *Procedia Manuf.*, vol. 35, pp. 1286–1296, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.06.089>.
- [10] D. Bourell *et al.*, “Materials for additive manufacturing,” *CIRP Ann.*, vol. 66, no. 2, pp. 659–681, 2017, doi: 10.1016/j.cirp.2017.05.009.
- [11] ASTM Standard F2792-12a, “Terminology for Additive Manufacturing Technologies,” 2012 doi: 10.1520/F2792-12A.
- [12] S. A. M. Tofail, E. P. Koumoulos, A. Bandyopadhyay, S. Bose, L. O’Donoghue, and C. Charitidis, “Additive manufacturing: scientific and technological challenges, market uptake and opportunities,” *Mater. Today*, vol. 21, no. 1, pp. 22–37, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.001>.
- [13] G. Palmara, F. Frascella, I. Roppolo, A. Chiappone, and A. Chiadò, “Functional 3D printing: Approaches and bioapplications,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 175, no. July 2020, pp. 1–16, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112849.
- [14] I. Karakurt and L. Lin, “3D printing technologies: techniques, materials, and post-processing,” *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 28, pp. 134–143, 2020, doi: 10.1016/j.coche.2020.04.001.

- [15] D. Srinivasan *et al.*, “3D Printing Manufacturing Techniques, Materials, and Applications: An Overview,” *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2021, pp. 1–10, Dec. 2021, doi: 10.1155/2021/5756563.
- [16] M. Pagac *et al.*, “A review of vat photopolymerization technology: Materials, applications, challenges, and future trends of 3d printing,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 4, pp. 1–20, Feb. 2021, doi: 10.3390/polym13040598.
- [17] M. Mukhtarkhanov, A. Perveen, and D. Talamona, “Application of Stereolithography Based 3D Printing Technology in Investment Casting,” *Micromachines*, vol. 11, no. 10, p. 946, Oct. 2020, doi: 10.3390/mi11100946.
- [18] S. Zakeri, M. Vippola, and E. Levänen, “A comprehensive review of the photopolymerization of ceramic resins used in stereolithography,” *Addit. Manuf.*, vol. 35, p. 101177, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.addma.2020.101177.
- [19] F. P. W. Melchels, J. Feijen, and D. W. Grijpma, “A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 24, pp. 6121–6130, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.050.
- [20] F. Zhang *et al.*, “The recent development of vat photopolymerization: A review,” *Addit. Manuf.*, vol. 48, pp. 1–20, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.addma.2021.102423.
- [21] J. Zhang, Q. Hu, S. Wang, J. Tao, and M. Gou, “Digital Light Processing Based Three-dimensional Printing for Medical Applications,” *Int. J. Bioprinting*, vol. 6, no. 1, pp. 12–24, Nov. 2019, doi: 10.18063/ijb.v6i1.242.
- [22] J. R. Tumbleston *et al.*, “Continuous liquid interface production of 3D objects,” *Science*, vol. 347, no. 6228, pp. 1349–1352, Mar. 20, 2015. doi: 10.1126/science.aaa2397.
- [23] A. Bagheri and J. Jin, “Photopolymerization in 3D Printing,” *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 1, no. 4, pp. 593–611, Apr. 2019, doi: 10.1021/acsapm.8b00165.
- [24] T. Shakouri *et al.*, “Comparative study of photoinitiators for the synthesis and 3D printing of a light-curable, degradable polymer for custom-fit hard tissue implants,” *Biomed. Mater.*, vol. 16, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1748-605X/aba6d2.
- [25] Y. Yagci, S. Jockusch, and N. J. Turro, “Photoinitiated Polymerization: Advances, Challenges, and Opportunities,” *Macromolecules*, vol. 43, no. 15, pp. 6245–6260, Aug. 2010, doi: 10.1021/ma1007545.
- [26] S. Lantean, “A novel approach to fabricate composite materials: the 3D bioinspired programmable Printing way,” Politecnico di Torino, 2021.
- [27] T. G. Ribelli, K. F. Augustine, M. Fantin, P. Krysz, R. Poli, and K. Matyjaszewski, “Disproportionation or Combination? the Termination of Acrylate Radicals in ATRP,” *Macromolecules*, vol. 50, no. 20, pp. 7920–7929, Oct. 2017, doi: 10.1021/acs.macromol.7b01552.
- [28] J. Lee, J. An, and C. K. Chua, “Fundamentals and applications of 3D printing for novel materials,” *Appl. Mater. Today*, vol. 7, pp. 120–133, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.02.004>.
- [29] M. A. Tehfe *et al.*, “New cleavable photoinitiator architecture with huge molar extinction coefficients for polymerization in the 340–450 nm range,” *Macromolecules*, vol. 46, no. 3, pp. 736–746, 2013, doi: 10.1021/ma3024359.
- [30] A. Eibel, D. E. Fast, and G. Gescheidt, “Choosing the ideal photoinitiator for free radical photopolymerizations: Predictions based on simulations using established data,” *Polym.*

- Chem.*, vol. 9, no. 41, pp. 5107–5115, 2018, doi: 10.1039/c8py01195h.
- [31] Y. C. Chen, J. L. Ferracane, and S. A. Prah, “Quantum yield of conversion of the photoinitiator camphorquinone,” *Dent. Mater.*, vol. 23, no. 6, pp. 655–664, 2007, doi: 10.1016/j.dental.2006.06.005.
- [32] S. C. Ligon, B. Husár, H. Wutzel, R. Holman, and R. Liska, “Strategies to Reduce Oxygen Inhibition in Photoinduced Polymerization,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 1, pp. 557–589, Jan. 2014, doi: 10.1021/cr3005197.
- [33] E. Andrzejewska, “Free radical photopolymerization of multifunctional monomers,” in *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-photon Polymerization*, Elsevier Inc., 2016, pp. 62–81. doi: 10.1016/B978-0-323-35321-2/00004-2.
- [34] T. Y. Lee, C. A. Guymon, E. S. Jönsson, and C. E. Hoyle, “The effect of monomer structure on oxygen inhibition of (meth)acrylates photopolymerization,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 45, no. 18, pp. 6155–6162, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.06.060.
- [35] M. Gastaldi *et al.*, “Functional Dyes in Polymeric 3D Printing: Applications and Perspectives,” *ACS Mater. Lett.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2021, doi: 10.1021/acsmaterialslett.0c00455.
- [36] P. K. Robinson, “Enzymes: principles and biotechnological applications,” *Essays Biochem.*, vol. 59, pp. 1–41, 2015, doi: 10.1042/BSE0590001.
- [37] R. Pogaku, J. K. Raman, and G. Ravikumar, “Evaluation of Activation Energy and Thermodynamic Properties of Enzyme-Catalysed Transesterification Reactions,” *Adv. Chem. Eng. Sci.*, vol. 2, pp. 150–154, 2012, doi: 10.4236/aces.2012.21018.
- [38] S. M. Roberts and A. J. Gibb, “Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs,” in *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development: Theory and Case Studies*, 2013, pp. 1–55. doi: 10.1016/B978-0-12-397176-0.00001-7.
- [39] A. Blanco and G. Blanco, “Enzymes,” in *Medical Biochemistry*, A. Blanco and G. Blanco, Eds. Elsevier, 2017, pp. 153–175. doi: 10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2.
- [40] K. Miyanaga and H. Unno, “Reaction Kinetics and Stoichiometry,” in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, Second Edi., vol. 2, Elsevier B.V., 2011, pp. 33–46. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00085-4.
- [41] “cofactor,” *Encyclopaedia Britannica*, 1998. <https://www.britannica.com/science/cofactor> (accessed Jun. 20, 2022).
- [42] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. F. Prazeres, V. Vojinović, J. M. S. Cabral, and L. P. Fonseca, “Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology,” *Biotechnol. Annu. Rev.*, vol. 9, pp. 199–247, 2003, doi: 10.1016/S1387-2656(03)09003-3.
- [43] A. L. Latner, “The nature of isoenzymes,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 4, pp. 8–13, 1970, doi: 10.1136/jcp.s1-4.1.8.
- [44] H. Younus, “Oxidoreductases: Overview and Practical Applications,” in *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications*, Q. Husain and M. F. Ullah, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 39–55. doi: 10.1007/978-3-030-25023-2\_3.
- [45] “transferase,” *Encyclopaedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/transferase> (accessed Jun. 29, 2022).

- [46] “isomerase,” *Encyclopaedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/isomerase> (accessed Jun. 29, 2022).
- [47] “ligase,” *Encyclopaedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/ligase> (accessed Jun. 29, 2022).
- [48] J. Sheikh and I. Bramhecha, “Enzymes for green chemical processing of cotton,” in *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology*, Elsevier Ltd., 2018, pp. 135–160. doi: 10.1016/B978-0-08-102491-1.00006-X.
- [49] H. Bisswanger, “Enzyme assays,” *Perspect. Sci.*, vol. 1, no. 1–6, pp. 41–55, 2014, doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- [50] L. A. Campos and J. Sancho, “The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH,” *FEBS Lett.*, vol. 538, no. 1–3, pp. 89–95, 2003, doi: 10.1016/S0014-5793(03)00152-2.
- [51] A. Rogers and Y. Gibon, “Enzyme Kinetics: Theory and Practice,” in *Plant Metabolic Networks*, J. Schwender, Ed. New York, NY: Springer New York, 2009, pp. 71–103. doi: 10.1007/978-0-387-78745-9.
- [52] A. T. Smith, S. A. Sanders, R. N. F. Thorneley, J. F. Burke, and R. R. C. Bray, “Characterisation of a haem active-site mutant of horseradish peroxidase, Phe41 Val, with altered reactivity towards hydrogen peroxide and reducing substrates,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 207, pp. 507–519, 1992.
- [53] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, “Glucose oxidase - An overview,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 4, pp. 489–501, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- [54] J. A. Bauer, M. Zámocká, J. Majtán, and V. Bauerová-Hlinková, “Glucose Oxidase, an Enzyme ‘Ferrari’: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 3, pp. 1–25, Mar. 2022, doi: 10.3390/biom12030472.
- [55] R. Wilson and A. P. F. Turner, “Glucose oxidase: an ideal enzyme,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 7, no. 3, pp. 165–185, Jan. 1992, doi: 10.1016/0956-5663(92)87013-F.
- [56] F. Janati-Fard, M. R. Housaindokht, and H. Monhemi, “Investigation of structural stability and enzymatic activity of glucose oxidase and its subunits,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 134, pp. 16–24, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.molcatb.2016.09.008.
- [57] S. Witt, G. Wohlfahrt, D. Schomburg, H.-J. R. Hecht, and H. M. Kalisz, “Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of  $\beta$ -D-glucose,” *Biochem. J.*, vol. 347, pp. 553–559, 2000.
- [58] C. M. Wong, K. H. Wong, and X. D. Chen, “Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 78, no. 6, pp. 927–938, 2008, doi: 10.1007/s00253-008-1407-4.
- [59] J. H. Pazur and K. Kleppe, “The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*,” *Biochemistry*, vol. 3, no. 4, pp. 578–583, 1964, doi: 10.1021/bi00892a018.
- [60] S. H. Khatami *et al.*, “Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, no. March, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1002/bab.2165.

- [61] A. N. P. Hiner *et al.*, “The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: An example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate,” *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 6, no. 5–6, pp. 504–516, 2001, doi: 10.1007/s007750100219.
- [62] F. W. Krainer and A. Glieder, “An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 4, pp. 1611–1625, Feb. 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6346-7.
- [63] J. B. Sumner, “Enzymes, the basis of life,” *J. Chem. Educ.*, vol. 29, no. 3, pp. 114–118, 1952, doi: 10.1021/ed029p114.
- [64] D. Humer and O. Spadiut, “Improving the Performance of Horseradish Peroxidase by Site-Directed Mutagenesis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 4, p. 916, Feb. 2019, doi: 10.3390/ijms20040916.
- [65] S. Aibara, H. Yamashua, E. Mori, M. Kato, and Y. Morita, “Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase,” *J. Biochem.*, vol. 92, no. 2, pp. 531–539, 1982, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133961.
- [66] K. G. Welinder, “Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7),” *FEBS Lett.*, vol. 72, no. 1, pp. 19–23, 1976, doi: 10.1016/0014-5793(76)80804-6.
- [67] N. C. Veitch, “Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme,” *Phytochemistry*, vol. 65, no. 3, pp. 249–259, 2004, doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
- [68] T. L. Poulos, “Heme enzyme structure and function,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 7, pp. 3919–3962, Apr. 2014, doi: 10.1021/cr400415k.
- [69] A. M. L. Zátón and E. Ochoa de Aspuru, “Horseradish peroxidase inhibition by thiouracils,” *FEBS Lett.*, vol. 374, no. 2, pp. 192–194, 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)01088-V.
- [70] J. Clarke and L. M. Shannon, “The isolation and characterization of the glycopeptides from Horseradish Peroxidase isoenzyme C,” *Biochim. Biophys.*, vol. 427, pp. 428–442, 1976.
- [71] S. Madersbacher and P. Berger, “Double wavelength measurement of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) provides a three-fold enhancement of the ELISA measuring range,” *J. Immunol. Methods*, vol. 138, no. 1, pp. 121–124, 1991, doi: 10.1016/0022-1759(91)90071-M.
- [72] H. Hosoda, W. Takasaki, T. Oe, R. Tsukamoto, and T. Nambara, “A comparison of chromogenic substrates for horseradish peroxidase as a label in steroid enzyme immunoassay,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 34, no. 10, pp. 4177–4182, 1986, doi: 10.1248/cpb.34.4177.
- [73] P. D. Josephy, T. Eling, and R. P. Mason, “The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine,” *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 7, pp. 3669–3675, Apr. 1982, doi: 10.1016/S0021-9258(18)34832-4.
- [74] H. H. Nguyen and M. Kim, “An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization,” *Appl. Sci. Conver. Technol.*, vol. 26, no. 6, pp. 157–163, Nov. 2017, doi: 10.5757/asct.2017.26.6.157.
- [75] J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, and M. Pinelo, “A general overview of support

- materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility,” *Catalysts*, vol. 8, no. 2, 2018, doi: 10.3390/catal8020092.
- [76] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, and R. Stevanato, “Enzyme immobilization: An update,” *J. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 185–205, 2013, doi: 10.1007/s12154-013-0102-9.
- [77] J. Meena, A. Gupta, R. Ahuja, M. Singh, and A. K. Panda, “Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity,” *J. Mol. Liq.*, vol. 338, p. 116602, 2021, doi: 10.1016/j.molliq.2021.116602.
- [78] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, “Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials,” *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [79] T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, “Enzyme immobilization by adsorption: A review,” *Adsorption*, vol. 20, no. 5–6, pp. 801–821, 2014, doi: 10.1007/s10450-014-9623-y.
- [80] C. Zhang and X. H. Xing, “Enzyme bioreactors,” in *Comprehensive Biotechnology*, Third Edit., vol. 2, Elsevier, 2019, pp. 479–488. doi: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00083-5.
- [81] K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, and H. J. Griesser, “Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 3, pp. 392–418, 2006, doi: 10.1002/ppap.200600021.
- [82] S. J. Novick and J. D. Rozzell, “Immobilization of Enzymes by Covalent Attachment,” in *Methods in Biotechnology*, vol. 17, 2005, pp. 247–271. doi: 10.1385/1-59259-846-3:247.
- [83] Thermo Fisher, “Easy molecular bonding: crosslinking technology.” pp. 1–53, 2012. [Online]. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>
- [84] V. Calabrò, “Engineering aspects of membrane bioreactors,” in *Handbook of Membrane Reactors*, vol. 2, 2013, pp. 3–53. doi: 10.1533/9780857097347.1.3.
- [85] B. Brena, P. González-Pombo, and F. Batista-Viera, “Immobilization of Enzymes: A Literature Survey,” in *Methods in molecular biology*, vol. 1051, J. M. Guisan, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 15–31. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7\_2.
- [86] R. A. Sheldon, “Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance,” *Adv. Synth. Catal.*, vol. 349, no. 8–9, pp. 1289–1307, Jun. 2007, doi: 10.1002/adsc.200700082.
- [87] L. S. Cock, A. M. Z. Arenas, and A. A. Aponte, “Use of enzymatic biosensors as quality indices: A synopsis of present and future trends in the food industry,” *Chil. J. Agric. Res.*, vol. 69, no. 2, pp. 270–280, 2009.
- [88] C. Karunakaran, R. Rajkumar, and K. Bhargava, “Introduction to Biosensors,” in *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier Inc., 2015, pp. 1–68. doi: 10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3.
- [89] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, “Introduction to biosensors,” *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1042/EBC20150001.
- [90] A. Shrivastava and V. Gupta, “Methods for the determination of limit of detection and

- limit of quantitation of the analytical methods,” *Chronicles Young Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 21–25, 2011, doi: 10.4103/2229-5186.79345.
- [91] N. Ronkainen, H. Halsall, and W. Heineman, “Electrochemical biosensors,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 1747–1763, May 2010, doi: 10.1039/b714449k.
- [92] R. Monošík, M. Stred’anský, and E. Šturdík, “Biosensors - classification, characterization and new trends,” *Acta Chim. Slovaca*, vol. 5, no. 1, pp. 109–120, 2012, doi: doi:10.2478/v10188-012-0017-z.
- [93] A. Hasan *et al.*, “Recent advances in application of biosensors in tissue engineering,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/307519.
- [94] C. R. Ispas, G. Crivat, and S. Andreescu, “Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis,” *Anal. Lett.*, vol. 45, no. 2–3, pp. 168–186, Jan. 2012, doi: 10.1080/00032719.2011.633188.
- [95] R. Vargas-Bernal, E. Rodriguez-Miranda, and G. Herrera-Prez, “Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides,” in *Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*, 2012. doi: 10.5772/46227.
- [96] L. C. Clark and C. Lyons, “Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 29–45, Dec. 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [97] S. J. Updike and G. P. Hicks, “The enzyme electrode,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 214, pp. 986–988, 1967.
- [98] M. Mascini, “A Brief Story of Biosensor Technology,” in *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, 2007, pp. 4–10. doi: 10.1007/978-0-387-36672-2\_2.
- [99] J. P. Lafleur, A. Jönsson, S. Senkbeil, and J. P. Kutter, “Recent advances in lab-on-a-chip for biosensing applications,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 76, pp. 213–233, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.08.003.
- [100] M. L. Salva, M. Rocca, C. M. Niemeyer, and E. Delamarche, “Methods for immobilizing receptors in microfluidic devices: A review,” *Micro Nano Eng.*, vol. 11, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.mne.2021.100085.
- [101] J. H. T. Luong, K. B. Male, and J. D. Glennon, “Biosensor technology: Technology push versus market pull,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 5, pp. 492–500, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.007>.
- [102] J. Wang, “Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges,” *Electroanalysis*, vol. 13, no. 12, pp. 983–988, 2001, doi: 10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23.
- [103] C. Karunakaran, T. Madasamy, and N. K. Sethy, “Enzymatic Biosensors,” in *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, pp. 133–204. doi: 10.1016/B978-0-12-803100-1.00003-7.
- [104] Y.-C. Zhu *et al.*, “Enzyme-Based Biosensors and Their Applications,” in *Advances in Enzyme Technology*, R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, and C. Larroche, Eds. Elsevier, 2019, pp. 201–223. doi: 10.1016/B978-0-444-64114-4.00008-X.
- [105] M. M. F. Choi, “Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers,” *Microchim. Acta*, vol. 148, no. 3–4, pp. 107–132, 2004, doi: 10.1007/s00604-004-0273-8.

- [106] S. Gavrilaş, C. Ştefan Ursachi, S. Perţa-Crişan, and F. D. Munteanu, “Recent Trends in Biosensors for Environmental Quality Monitoring,” *Sensors*, vol. 22, no. 4, 2022, doi: 10.3390/s22041513.
- [107] F. M. Lopes, K. de A. Batista, G. L. A. Batista, and K. F. Fernandes, “Biosensor for determination of glucose in real samples of beverages,” *Food Sci. Technol.*, vol. 32, no. 1, pp. 65–69, Jan. 2012, doi: 10.1590/S0101-20612012005000003.
- [108] W. Zhang, Y. Du, and M. L. Wang, “Noninvasive glucose monitoring using saliva nano-biosensor,” *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 4, pp. 23–29, 2015, doi: 10.1016/j.sbsr.2015.02.002.
- [109] J. Zhang, J. Liu, H. Su, F. Sun, Z. Lu, and A. Su, “A wearable self-powered biosensor system integrated with diaper for detecting the urine glucose of diabetic patients,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 341, no. January, p. 130046, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130046.
- [110] B. Peng, J. Lu, A. S. Balijepalli, T. C. Major, B. E. Cohan, and M. E. Meyerhoff, “Evaluation of enzyme-based tear glucose electrochemical sensors over a wide range of blood glucose concentrations,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 49, pp. 204–209, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.05.014.
- [111] L. V. Shkotova, N. Y. Piechniakova, O. L. Kukla, and S. V. Dzyadevych, “Thin-film amperometric multibiosensor for simultaneous determination of lactate and glucose in wine,” *Food Chem.*, vol. 197, pp. 972–978, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.066.
- [112] G. Luka *et al.*, “Microfluidics integrated biosensors: A leading technology towards lab-on-A-chip and sensing applications,” *Sensors*, vol. 15, no. 12, pp. 30011–30031, 2015, doi: 10.3390/s151229783.
- [113] B. Gross, S. Y. Lockwood, and D. M. Spence, “Recent advances in analytical chemistry by 3D printing,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 57–70, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04344.
- [114] C. L. Manzanares Palenzuela and M. Pumera, “(Bio)Analytical chemistry enabled by 3D printing: Sensors and biosensors,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 103, pp. 110–118, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.03.016.
- [115] D. M. dos Santos *et al.*, “Advances in 3D printed sensors for food analysis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 154, p. 116672, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116672.
- [116] C. K. Su, “Review of 3D-Printed functionalized devices for chemical and biochemical analysis,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1158, p. 338348, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2021.338348.
- [117] Y. Ukita, Y. Utsumi, and Y. Takamura, “Direct digital manufacturing of a mini-centrifuge-driven centrifugal microfluidic device and demonstration of a smartphone-based colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay,” *Anal. Methods*, vol. 8, no. 2, pp. 256–262, 2016, doi: 10.1039/c5ay01969a.
- [118] C. A. Mandon, L. J. Blum, and C. A. Marquette, “Adding Biomolecular Recognition Capability to 3D Printed Objects: 4D Printing,” *Procedia Technol.*, vol. 27, pp. 1–2, 2017, doi: 10.1016/j.protcy.2017.04.001.
- [119] S. Stassi *et al.*, “Polymeric 3D Printed Functional Microcantilevers for Biosensing Applications,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 22, pp. 19193–19201, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b04030.

- [120] A. Chiadò *et al.*, “A modular 3D printed lab-on-a-chip for early cancer detection,” *Lab Chip*, vol. 20, no. 3, pp. 665–674, 2020, doi: 10.1039/c9lc01108k.
- [121] “Bisphenol A ethoxylate diacrylate.” <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/aldrich/412090> (accessed Jun. 14, 2022).
- [122] T. Ohara *et al.*, “Acrylic Acid and Derivatives,” *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley, pp. 1–21, Jan. 03, 2020. doi: 10.1002/14356007.a01\_161.pub4.
- [123] “Poly(ethylene glycol) diacrylate.” <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/aldrich/437441> (accessed Jun. 19, 2022).
- [124] “1,6-Hexanediol diacrylate.” <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/aldrich/246816> (accessed Jun. 19, 2022).
- [125] C. Dietlin *et al.*, “New phosphine oxides as high performance near-UV type I photoinitiators of radical polymerization,” *Molecules*, vol. 25, no. 7, pp. 1–9, 2020, doi: 10.3390/molecules25071671.
- [126] “Phenylbis(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide -.” [https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/substance/phenylbis246trimethylbenzoylphosphineoxide41846162881267?gclid=CjwKCAjw5NqVBhAjEiwAeCa97W58fWC0aVnezZwPd7pXrGryR9dVKBo0D9XjHxIXTSX08mXwEt6ZJxoCWcgQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/substance/phenylbis246trimethylbenzoylphosphineoxide41846162881267?gclid=CjwKCAjw5NqVBhAjEiwAeCa97W58fWC0aVnezZwPd7pXrGryR9dVKBo0D9XjHxIXTSX08mXwEt6ZJxoCWcgQAvD_BwE) (accessed Jun. 25, 2022).
- [127] “Acrylic acid anhydrous.” <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/aldrich/147230> (accessed Jun. 25, 2022).
- [128] “MAX X - Products - Asiga.” [https://www.asiga.com/products/printers/max\\_series/max\\_x/](https://www.asiga.com/products/printers/max_series/max_x/) (accessed Jun. 25, 2022).
- [129] “2,2 -Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).” <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/a1888> (accessed Jun. 25, 2022).
- [130] Thermo Scientific, “Thermo Scientific Multiskan GO.” pp. 1–46, 2015. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/51119200>
- [131] A. T. Smith *et al.*, “Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca<sup>2+</sup> and Heme,” *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 22, pp. 13335–13343, Aug. 1990, doi: 10.1016/S0021-9258(19)38303-6.
- [132] Y. Zhang, S. Tsitkov, and H. Hess, “Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase–horseradish peroxidase cascade,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13982.
- [133] C. A. Warr, H. S. Hinnen, S. Avery, R. J. Cate, G. P. Nordin, and W. G. Pitt, “3D-Printed Microfluidic Droplet Generator with Hydrophilic and Hydrophobic Polymers,” *Micromachines*, vol. 12, no. 1, p. 91, Jan. 2021, doi: 10.3390/mi12010091.
- [134] M. Bilal, T. Rasheed, Y. Zhao, H. M. N. Iqbal, and J. Cui, “‘Smart’ chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 278–290, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.134.
- [135] D. J. Gilfoyle, J. N. Rodriguez-Lopez, and A. T. Smith, “Probing the Aromatic-Donor-Binding Site of Horseradish Peroxidase Using Site-Directed Mutagenesis and the Suicide Substrate Phenylhydrazine,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 236, no. 2, pp. 714–722, Mar. 1996, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00714.x.

- [136] R. W. Bally and T. C. J. Gribnau, "Some Aspects of the Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as Hydrogen Donor in a Horseradish Peroxidase Assay," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 27, no. 10, pp. 791–796, 1989, doi: 10.1515/cclm.1989.27.10.791.
- [137] A. Hariri and L. Y. Wang, "Observer-Based State Feedback for Enhanced Insulin Control of Type 'I' Diabetic Patients," *Open Biomed. Eng. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 98–109, Dec. 2011, doi: 10.2174/1874120701105010098.

## Ringraziamenti

In primo luogo, ringrazio i miei genitori per essermi sempre stati vicini da tutta la vita e anche nei momenti di pieno sconforto che hanno accompagnato il percorso universitario: senza di voi non sarei mai arrivata a questo traguardo. I blocchi sono stati tanti e anche scrivere queste parole mi viene difficile. L'esperienza universitaria è stata totalizzante e mi ha messo di fronte a grossi limiti che sto cercando di superare. Mamma, senza il tuo supporto e la tua grande pazienza e amore non sarei riuscita ad uscirne: sei e sarai per tutta la vita il mio faro. Papà, sei sempre stato presente e hai sempre cercato di sostenermi in tutto e so di essere meno espansiva nei tuoi confronti, ma ti apprezzo tanto e ti voglio ringraziare per tutto l'amore e la forza che hai sempre cercato di darmi.

Ringrazio la mia famiglia i miei nonni e i miei zii per avermi sempre sostenuto.

Ringrazio Diego che ho conosciuto all'inizio di questo percorso universitario e con cui ho salito e sceso milioni di gradini parlando di termodinamica e colonne di distillazione: senza di te questo percorso non sarebbe stato lo stesso.

Ringrazio Elena, mi hai sempre supportata nonostante ci siamo conosciute da poco.

Ringrazio Ilaria con cui non si sono mai rotti i rapporti dal liceo ad oggi, sei sempre presente nella mia vita anche solo per un paio di parole che, però, fanno la differenza.

Ringrazio Enrico, ogni tua parola l'ho sempre sentita sincera, abbiamo condiviso poco dopo esserci persi per anni, ma sei una persona speciale e di cuore e vorrei ringraziarti per questo.

Ringrazio Gloria, negli ultimi anni ho riscoperto una persona meravigliosa, sono felice di averti ritrovata.

Ringrazio la Dottoressa Piccardo per avermi tenuto testa nel vero senso della parola nei momenti di maggiore difficoltà.

Ringrazio mia zia Bruna per avermi sempre illuminata con la sua allegria e accoglienza.

Ringrazio mio zio Gianni in particolare, perché mi ha sempre accolto nel momento di totale sconforto e mi ha capita.

Vorrei, infine, ringraziare una persona speciale, che è sempre dentro di me da anni: nonna il tuo ricordo mi scalda il cuore ogni secondo.