

## INTRODUZIONE

La dialisi consiste nella depurazione del sangue dai cataboliti proteici e nella sottrazione dei liquidi in esubero che non possono essere escreti per mera via fisiologica. Uno degli aspetti negativi della dialisi è la deplezione di sostanze metabolicamente e fisiologicamente utili quali amminoacidi, ormoni, vitamine e colina. Rennick et al. [1] hanno infatti mostrato che i livelli di colina libera nel plasma aumentano nei pazienti uremici per poi diminuire drasticamente durante l'emodialisi. La colina può quindi considerarsi un marker utile per individuare una eventuale disfunzione renale che, se cronica, porta alla dialisi.

Le principali metodologie analitiche per la determinazione della colina si avvalgono di tecniche cromatografiche, spettrofotometriche e radiometriche [2-4] che richiedono però una fase di derivatizzazione dell'analita comportando un aumento della complessità procedurale e strumentale che mal si adatta alle tipologie di analisi in campo o on-line. I biosensori amperometrici costituiscono una valida alternativa alle metodiche classiche di analisi in quanto assicurano elevata sensibilità e selettività, bassi costi di utilizzo e facilità di impiego.

Lo scopo del presente lavoro di ricerca è stato quello di realizzare un biosensore amperometrico per la determinazione della colina in campioni di siero e di dializzato basato sulla immobilizzazione della colina ossidasi mediante co-crosslinking enzimatico [5-7] su un elettrodo di Pt precedentemente modificato con un film polimerico permselectivo. Data la complessità delle matrici biologiche analizzate ed i bassi livelli di analita, nel presente lavoro sono state investigate le proprietà permselective di svariati film polimerici quali ad es. il poli(2-naftolo) [8], il polipirrolo overossidato [6] o bilayer [9] costituiti da un film isolante (poli(2-naftolo), poli(o-aminofenolo), poli(o-fenilendiammina)) elettrosintetizzato su polipirrolo allo scopo di realizzare un sensore immune da problemi di interferenza faradica ed avvelenamento elettrodico.

Il biosensore, applicato all'analisi della colina in campioni di siero e di dializzato, ha fornito valori di concentrazione in buon accordo con quelli riportati in letteratura [1] evidenziando una effettiva deplezione di tale nutriente essenziale durante il trattamento dialitico.

Riferimenti bibliografici

- [1] B. Rennick, M. Acara, P. Hysert, B. Mookerjee *Kidney Int.* 10 (1976) 329
- [2] J. R. Saucerman, C. E. Winstead, T. M. Jones *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (1984) 982
- [3] Y. Ikarashi, Y. Maruyama, *J. Chromatogr.* 616 (1993) 323
- [4] T. F. Woodman, B. Johnson, R. K. Marwaha *J. Liq. Chromatogr.* 5 (1982) 1341
- [5] A. Guerrieri, G. E. De Benedetto, F. Palmisano, P. G. Zambonin *The Analyst* 120 (1995) 2731
- [6] A. Guerrieri, G. E. De Benedetto, F. Palmisano, P. G. Zambonin *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 103
- [7] A. Guerrieri, F. Palmisano *Anal. Chem.* 73(13) (2001) 2875
- [8] R. Ciriello, T. R. I. Cataldi, D. Centonze, A. Guerrieri *Electroanalysis* 12 (11) (2000) 825
- [9] F. Palmisano, A. Guerrieri, M. Quinto, P.G. Zambonin *Anal. Chem.* 67(5) (1995) 1005

## PROPRIETA' PERMSELETTIVE DEGLI ELETTRODI MODIFICATI

### CONDIZIONI DI ELETTROSINTESI DEI POLIMERI

• **Poli(pirrolo) overossidato (PPy<sub>ovx</sub>):** E<sub>app</sub>=+0.7 V vs Ag/AgCl; carica di deposizione 300 mC/cm<sup>2</sup>; soluzione di monomero 0.4 M in KCl 0.1 M; overossidazione a +0.7 V vs Ag/AgCl in tampone fosfato (PBS) pH 7.0 per almeno 7 ore

• **Poli(2-naftolo) (P2NAF):** voltammetria ciclica nell'intervallo 0 - 0.8 V vs Ag/AgCl per 20 cicli; soluzione di monomero 5 mM in PBS pH 7.0; velocità di scansione 50mV/s

• **Poli(pirrolo)<sub>ovx</sub>/Poli(2-naftolo) (PPy<sub>ovx</sub>/P2NAF):** elettrosintesi del PPy; elettrosintesi del P2NAF su Pt/PPy; overossidazione dell'elettrodo Pt/PPy/P2NAF per 48 h in PBS a pH 7.0

• **Poli(pirrolo)<sub>ovx</sub>/Poli(o-aminofenolo) (PPy<sub>ovx</sub>/PoAP):** elettrosintesi del PPy; elettrosintesi del PoAP; voltammetria ciclica nell'intervallo -0.1 - 1.0 V vs Ag/AgCl per 20 cicli, soluzione di monomero 5 mM in PBS pH 7.0, velocità di scansione 50mV/s; overossidazione dell'elettrodo Pt/PPy/PoAP per 48 ore in PBS pH 7.0

• **Poli(pirrolo)<sub>ovx</sub>/Poli(o-diamminobenzene) (PPy<sub>ovx</sub>/PoDAB):** elettrosintesi del PPy; elettrosintesi del PoDAB; voltammetria ciclica nell'intervallo -0.1 - 0.6 V vs Ag/AgCl per 20 cicli; soluzione di monomero 5 mM in PBS pH 7.0, velocità di scansione di 50mV/s; overossidazione dell'elettrodo Pt/PPy/PoDAB per 48 ore in PBS pH 7.0

### RAPPORTO INTERFERENZIALE R<sub>i</sub>

$$R_{int} = \frac{r_{i,m}}{r_{i,u}} \quad R_{H_2O_2} = \frac{r_{H_2O_2,m}}{r_{H_2O_2,u}}$$

$$R_i = \frac{R_{int}}{R_{H_2O_2}}$$

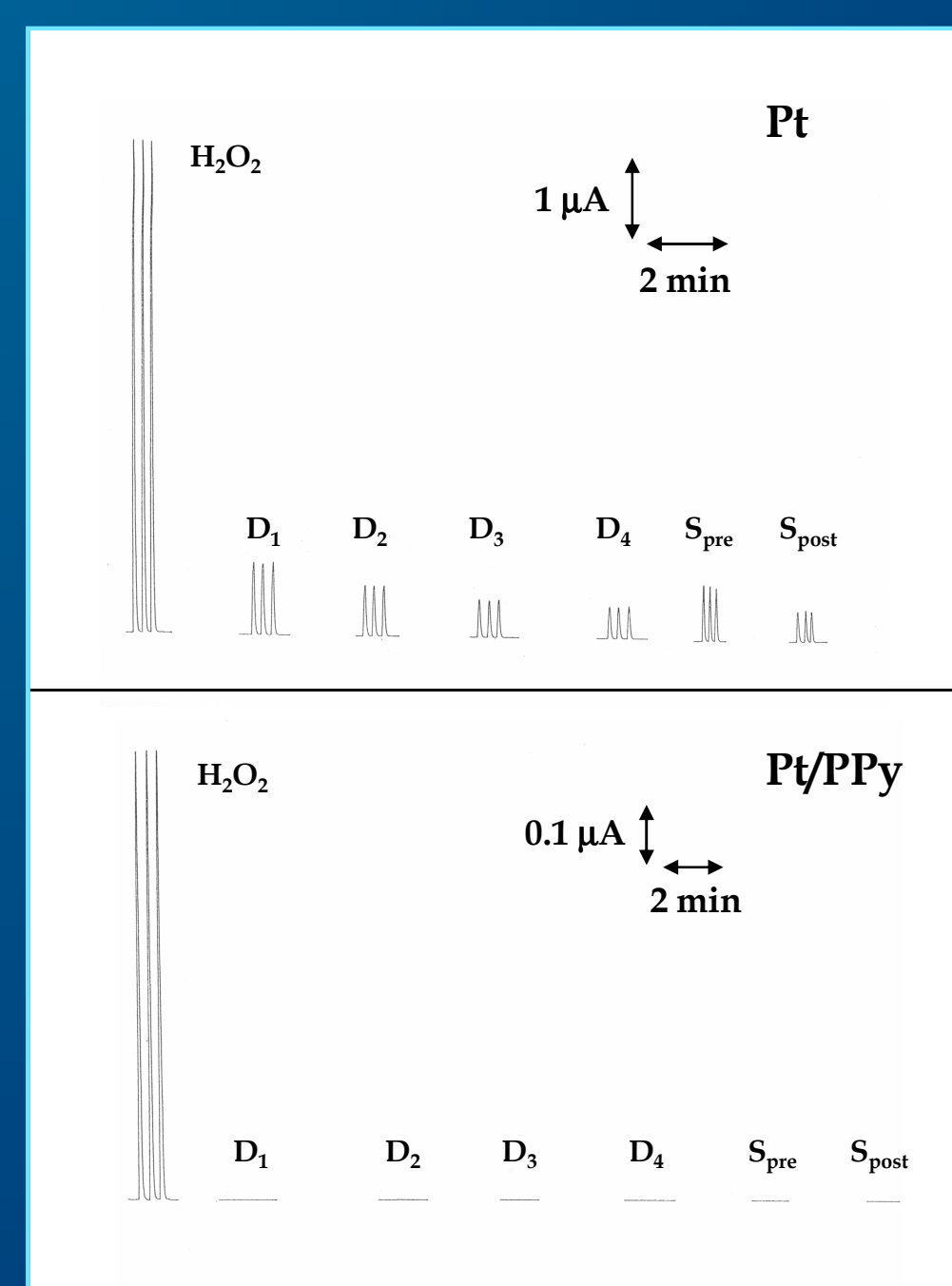
r<sub>i,m</sub> = segnale di corrente dell'interferente i-esimo su Pt modificato

r<sub>i,u</sub> = segnale di corrente dell'interferente i-esimo su Pt tal quale

Interferente	R <sub>i</sub>				
	Pt/PPy <sub>ovx</sub>	Pt/P2NAF	Pt/PPy <sub>ovx</sub> /P2NAF	Pt/PPy <sub>ovx</sub> /PoAP	Pt/PPy <sub>ovx</sub> /PoDAB
Acido ascorbico (AA) 0.1 mM	0.039	0.2	n.q.	0.002	0.004
Acido urico (AU) 0.5 mM	n.q.*	0.025	0.095	0.0001	n.q.
Paracetamolo (PA) 0.2 mM	n.q.	0.033	0.083	0.0005	0.0001
Cisteina (Cis) 0.1 mM	n.q.	0.05	0.22	0.0006	0.0003

\* n.q. non quantificabile

## SEGNALE DEI CAMPIONI DI DIALIZZATO E DI SIERO SU Pt E SU Pt/PPy<sub>ovx</sub>



D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>: campioni di dializzato prelevati ad intervalli regolari di 1 h; S<sub>pre</sub> e S<sub>post</sub>: campioni di siero prelevati prima e dopo la seduta dialitica (diluizione 1:3)

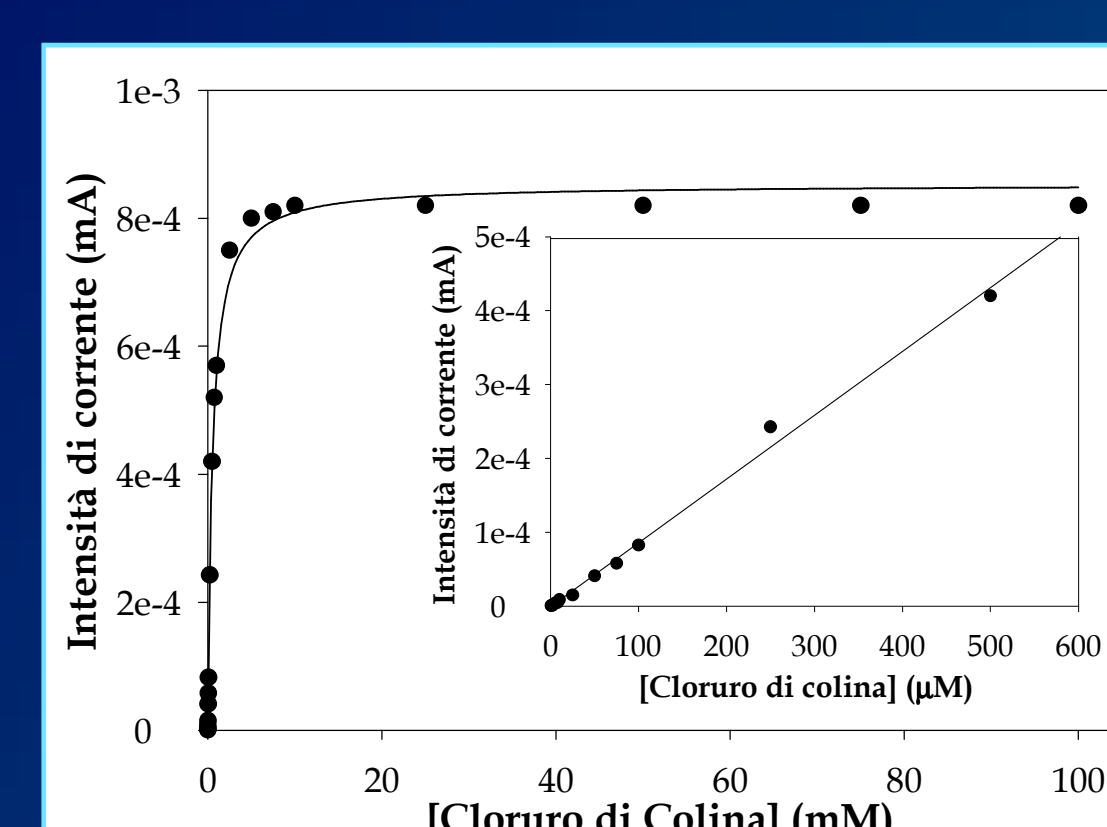
Le interferenze faradiche ed i fenomeni di avvelenamento elettrodico sono praticamente nulli in presenza del film polimerico PPy<sub>ovx</sub>.

Nelle peggiori condizioni, il bias in colina introdotto dall'interferenza dei campioni è risultato circa 0.5 μM nel caso dei dializzati e circa 1 μM per i campioni di siero, corrispondenti rispettivamente ad un errore del 6% e del 4%

L'utilizzo di membrane polimeriche bilayer, con proprietà permselective più efficienti, sicuramente comporterà prestazioni anti-interferenza migliori.

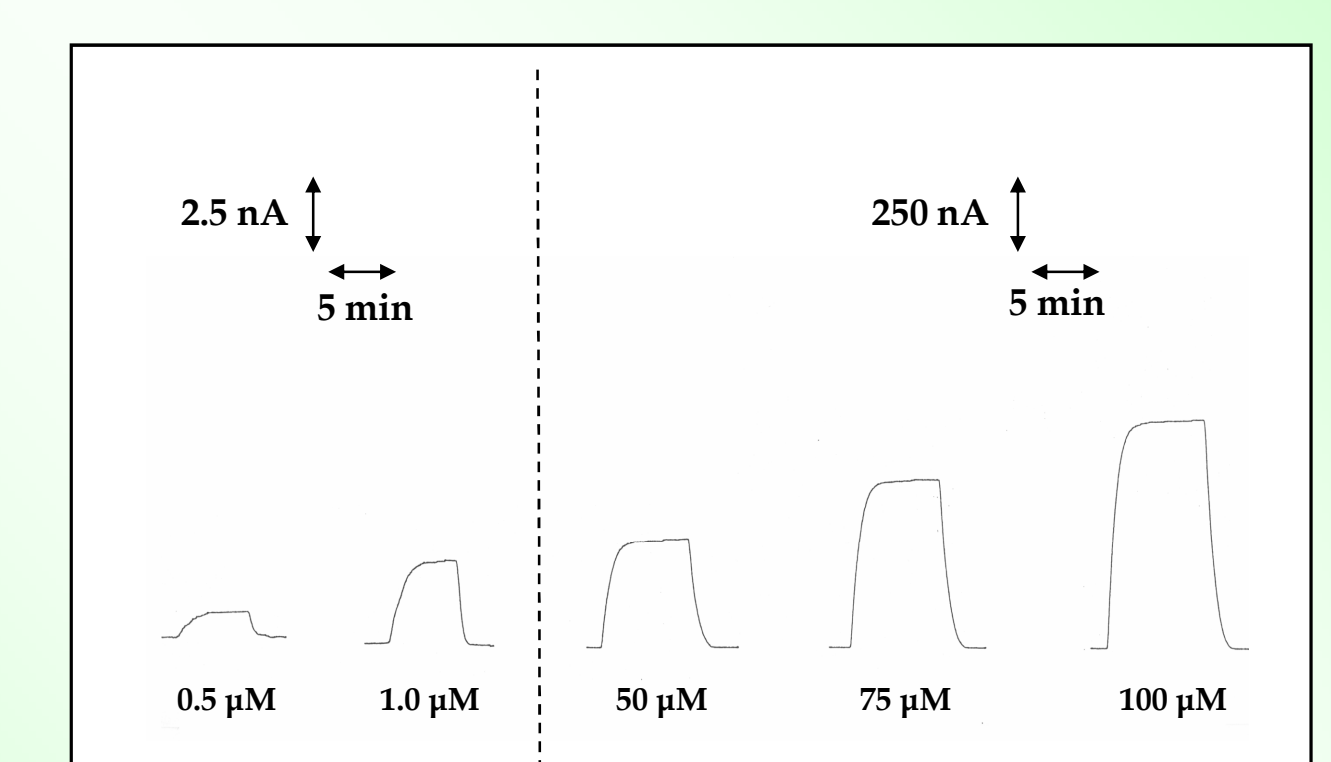
**Elettrolita di supporto:** tampone bicarbonato a pH 8.0 contenente NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, CH<sub>3</sub>COONa 8 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.75 mM, NaCl 100 mM e 2 g di glucosio

## CARATTERIZZAZIONE DEL BIOSENSORE Pt/PPy<sub>ovx</sub>/ChO



- K'<sub>M</sub> = 5.14·10<sup>-4</sup> M I<sub>max</sub> = 8.53·10<sup>-7</sup> A
- Sensibilità = 8.64·10<sup>-4</sup> A/M
- Intervallo lineare: fino a 5·10<sup>-4</sup> M
- Limite di rivelabilità = 0.5 μM

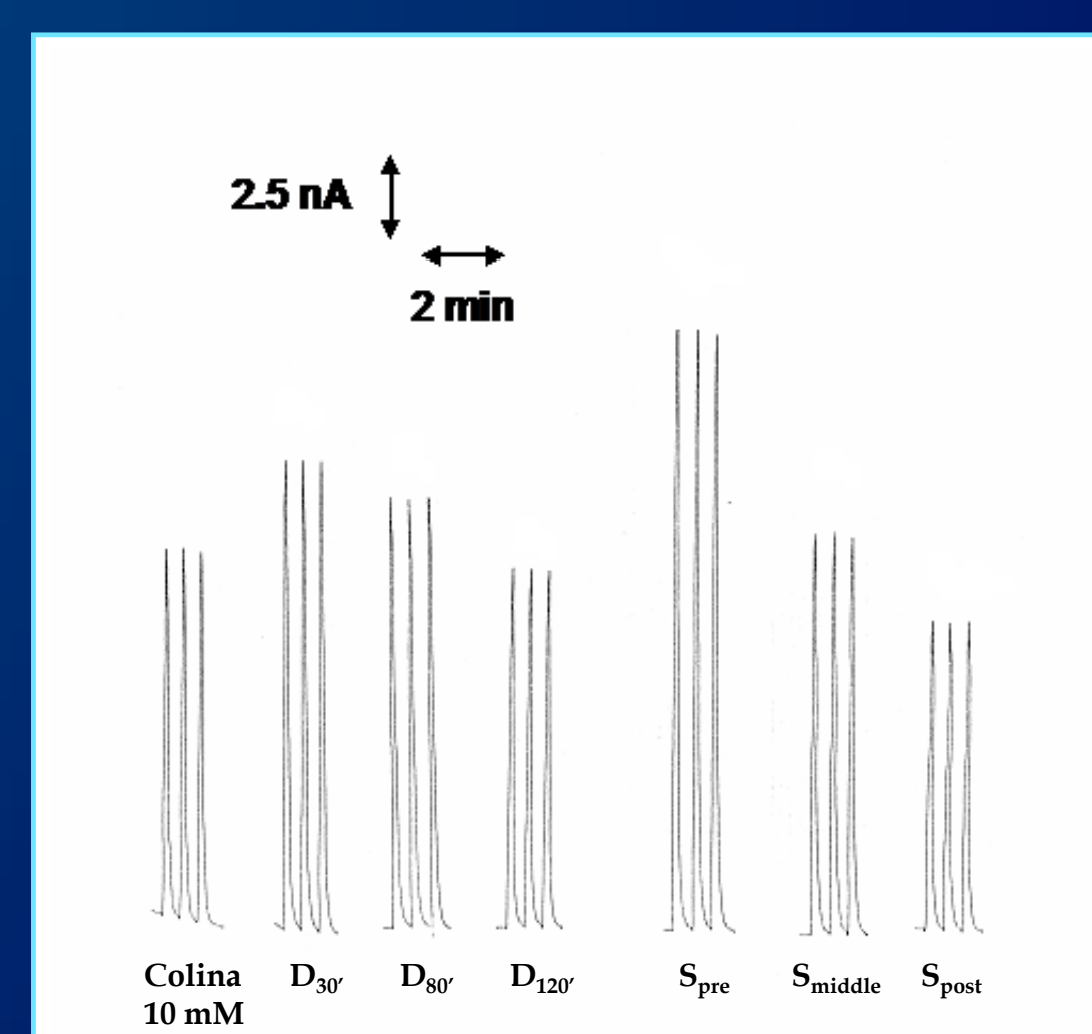
## SIMULAZIONE DI ANALISI 'ON LINE' CON SISTEMA A FLUSSO CONTINUO MEDIANTE BIOSENSORE Pt/ChO



- K'<sub>M</sub> = 8.87·10<sup>-4</sup> M I<sub>max</sub> = 1.61·10<sup>-6</sup> A
- Intervallo lineare: fino a 7.5·10<sup>-5</sup> M
- Sensibilità: 1.94·10<sup>-3</sup> A/M
- Assenza di rumore idrodinamico

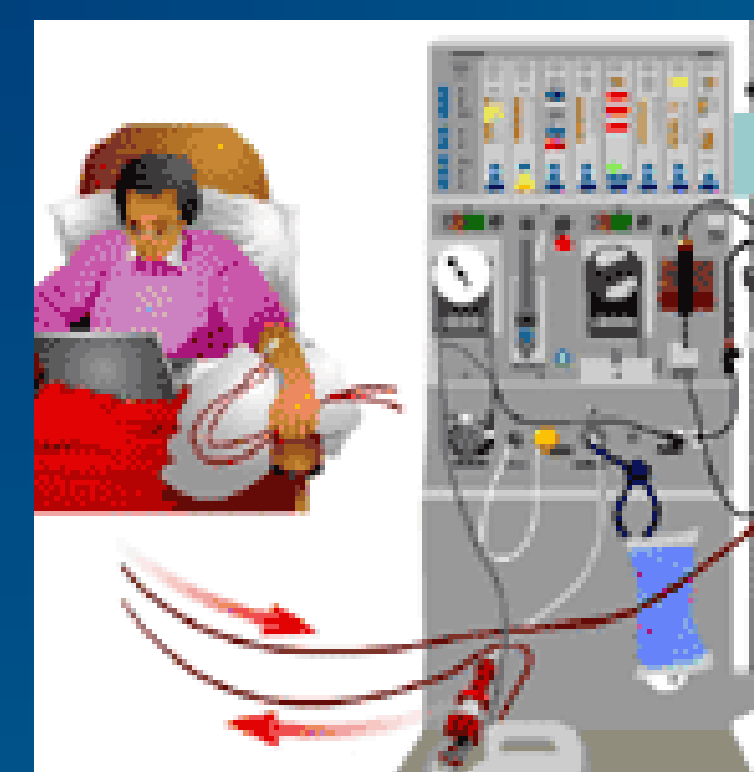
↓  
possibilità di integrare il biosensore nel sistema operativo per seguire l'andamento della colina durante l'intera seduta dialitica

## DETERMINAZIONE DELLA COLINA IN CAMPIONI DI SIERO E DIALIZZATO MEDIANTE BIOSENSORE Pt/PPy<sub>ovx</sub>/ChO



Nel siero la concentrazione di colina libera diminuisce di circa il 50 % durante la seduta dialitica

La colina riesce a permeare le fibre del 'rene artificiale' passando quindi nel dializzato



Colina (μM)	Valori di riferimento nel siero	Dializzato (30 min)	Dializzato (80 min)	Dializzato (120 min)	Siero (prima)	Siero (durante)	Siero (dopo)
Soggetto sano	12.9±0.6 <sup>a</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Soggetto con disfunzione renale cronica	37.3±0.9 <sup>a</sup>	11.00±0.07	10.4±0.5	8.44±0.02	32±2 <sup>a</sup> 42±1	26±2 <sup>a</sup> 28.0±0.2	25±2 <sup>a</sup> 22.2±0.2

<sup>a</sup> Y. Ozarda Ilcol, K. Dilek, M. Yurtkuran, I. H. Ulus *Clinical Biochemistry* 35 (2002) 233

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro di ricerca ha consentito la realizzazione di un dispositivo analitico avanzato di sicuro interesse per la determinazione della colina in campioni di siero e di dializzato.

E' stato messo a punto un biosensore amperometrico basato su un metodo classico di immobilizzazione enzimatica, quale il co-crosslinking, combinato all'elettrosintesi di un film polimerico permselectivo. Prove condotte modificando con diversi polimeri o con bilayer di polimeri la superficie elettrodica hanno consentito di ottimizzare le proprietà permselective del dispositivo analitico oviando alle comuni problematiche di avvelenamento elettrodico e di interferenza faradica nelle quali ci si imbatte allorché si analizzano matrici complesse quali quelle biologiche. Il biosensore è inoltre caratterizzato da un tempo di risposta molto breve ed è quindi impiegabile come rivelatore amperometrico in flusso fornendo notevoli prestazioni in termini di sensibilità e stabilità.

L'applicazione di tale dispositivo all'analisi di campioni di siero e di dializzato per la determinazione del contenuto di colina ha fornito risultati pienamente soddisfacenti e in accordo con i dati riportati in letteratura. Esperimenti preliminari di simulazione on line incoraggiano infine una possibile integrazione del biosensore nel sistema di dialisi per seguire in modo continuo l'andamento della colina nel corso dell'intera seduta dialitica.