

**XX CONGRESSO DELLA SOCIETA' CHIMICA ITALIANA**

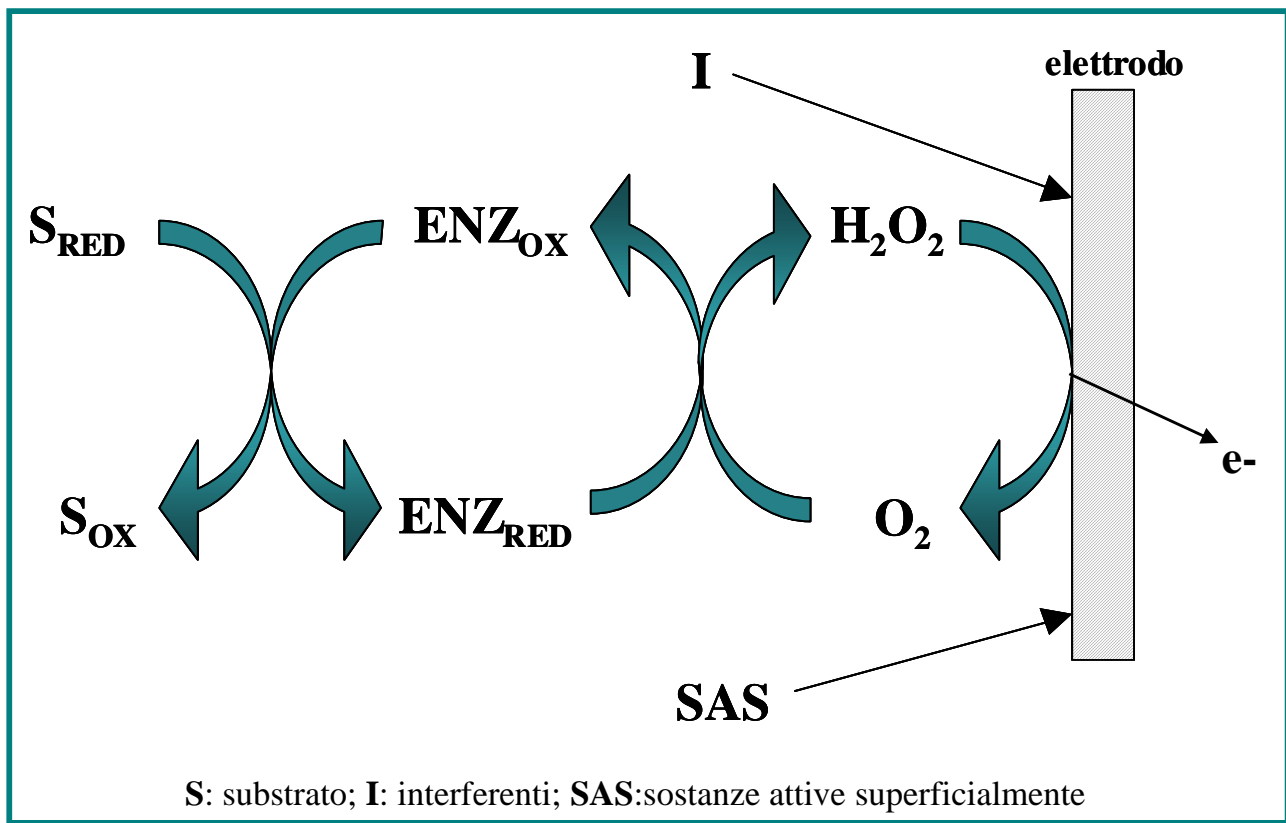
**RIMINI, 4-9 GIUGNO 2000**

**“BIOSENSORI AMPEROMETRICI AD  
ENZIMA IMMOBILIZZATO TRAMITE  
DEPOSIZIONE ELETTROFORETICA”**

**Rosanna Ciriello, Antonio Guerrieri**

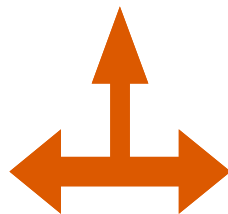
*Università degli Studi della Basilicata - Potenza*

# SCHEMA DI UN BIOSENSORE AMPEROMETRICO



## REALIZZAZIONE DI BIOSENSORI IMPIEGABILI PER L'ANALISI DI CAMPIONI REALI

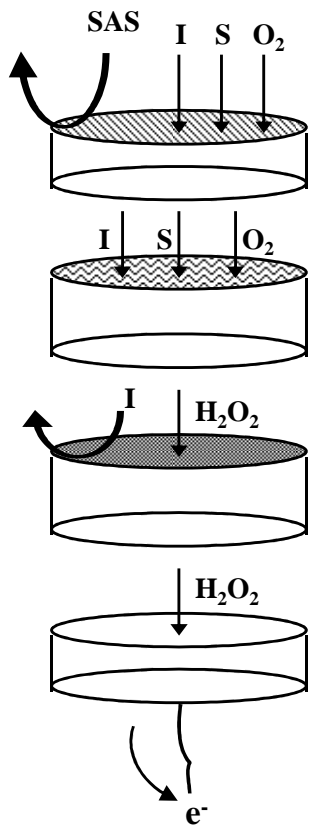
Sviluppare una metodica efficace di immobilizzazione enzimatica



Risolvere le problematiche associate alla trasduzione elettrochimica:

- ⊗ interferenza faradica;
- ⊗ avvelenamento elettrodico

## APPROCCIO CLASSICO



### MEMBRANA ANTI-AVVELENAMENTO

(e. g. membrana di policarbonato)

### MEMBRANA CON ENZIMA

### MEMBRANA ANTINTERFERENTE

(e. g. membrana di acetato di cellulosa)

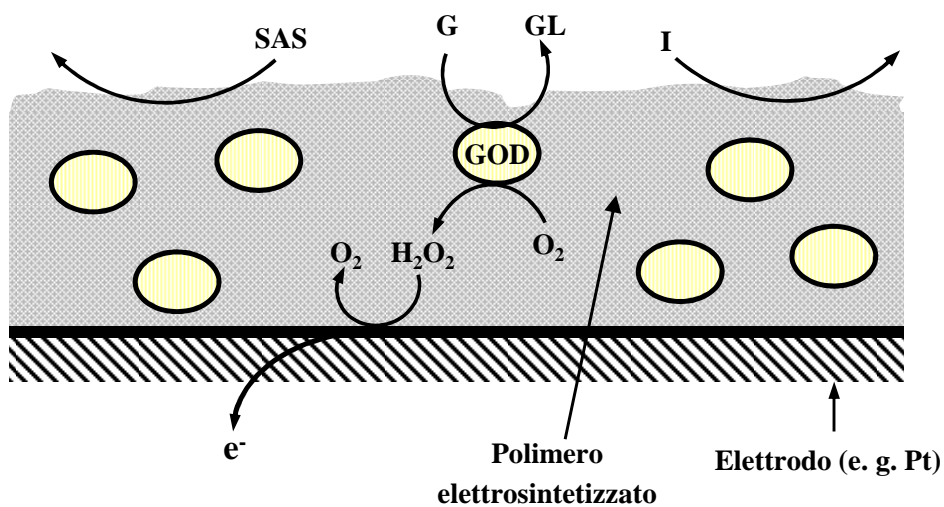
### ELETTRODO

(e. g. Pt)

#### Svantaggi:

- ⊗ diffusione complessa ⇒ non linearità;
- ⊗ tempi di risposta elevati;
- ⊗ applicabile a superfici elettrodiche “macroscopiche”

## BIOSENSORI AD IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA ELETTROCHIMICA



#### Vantaggi:

- ⊙ controllo della distribuzione spaziale dell'enzima sull'elettrodo;
- ⊙ possibilità di miniaturizzazione;
- ⊙ elevata permselectività;
- ⊙ tempi di risposta brevi

## Biosensori amperometrici ad immobilizzazione elettrochimica

### Svantaggi

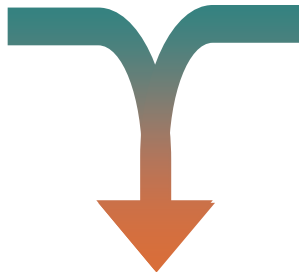
- ⊖ incompatibilità di alcuni substrati e/o enzimi con la matrice polimerica;
- ⊖ scarsa stabilità a lungo termine (tipicamente una settimana);
- ⊖ bassa quantità di enzima immobilizzato



### POSSIBILE RISOLUZIONE:

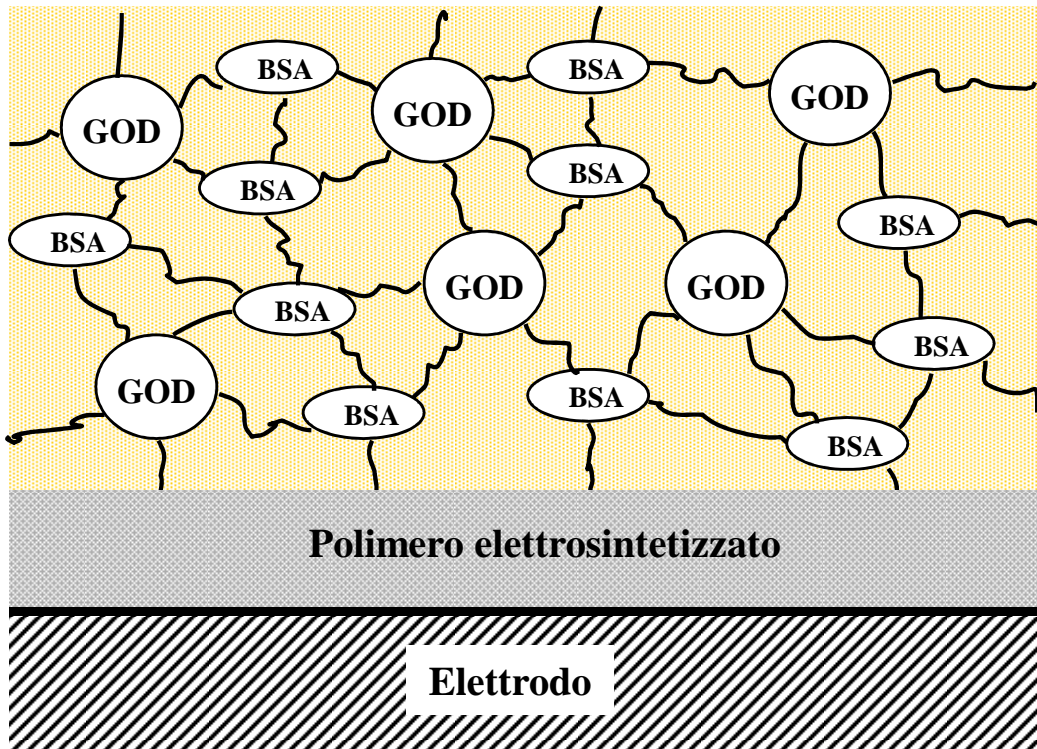
METODICHE CLASSICHE  
DI IMMOBILIZZAZIONE  
ENZIMATICA

USO DI MEMBRANE  
PERMSELETTIVE  
ELETTROSINTETIZZATE



**REALIZZAZIONE DI  
BIOSENSORI AMPEROMETRICI  
A “DESIGN IBRIDO”**

## ESEMPIO DI BIOSENSORE AMPEROMETRICO REALIZZATO MEDIANTE L'IMPIEGO DI TECNICHE IBRIDE



### Vantaggi

- ☺ elevata stabilità;
- ☺ caratteristiche di reiezione eccellenti;
- ☺ tempi di risposta sufficientemente bassi

### Svantaggi

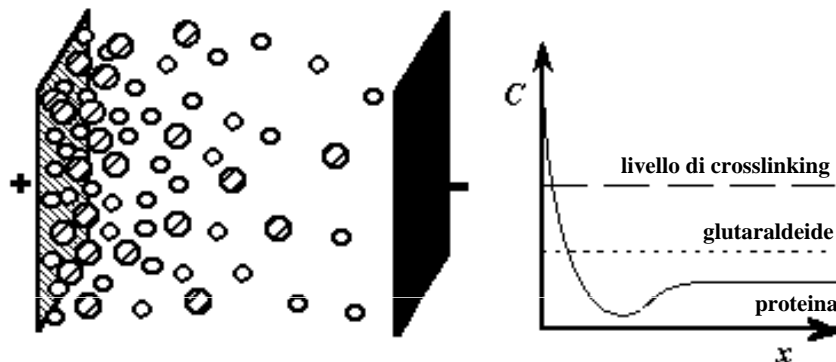
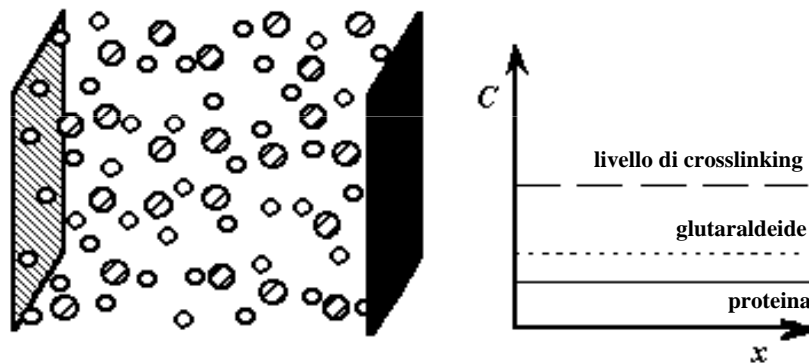
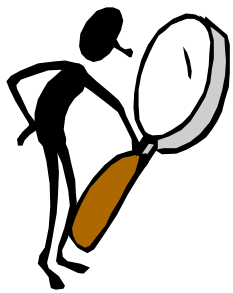
- ☹ scarsa capacità di controllo sulla deposizione e sullo spessore dello strato di enzima immobilizzato



*L'ideale sarebbe poter effettuare il processo di enzyme co-crosslinking sulla superficie elettrodica assistito elettrochimicamente al fine di poter ottenere tutti i vantaggi offerti dalla immobilizzazione elettrochimica*

# IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA MEDIANTE DEPOSIZIONE ELETTROFORETICA

- ☞ Migrazione elettroforetica delle proteine verso l'elettrodo
- ☞ Concentrazione/elettrodeposizione sull'elettrodo
- ☞ Co-crosslinking "in situ" mediante glutaraldeide



## Possibili vantaggi:

- ☺ estensione ad un **gran numero di proteine e/o enzimi**;
- ☺ vantaggi della **“electrochemical immobilization”**:
  - ❖ capacità di controllo della distribuzione spaziale del deposito enzimatico;
  - ❖ possibilità di **miniaturizzazione**;
  - ❖ possibilità di realizzare strutture multistrato e/o multienzimatiche.

## IMPIEGO DELLA DEPOSIZIONE ENZIMATICA ELETTROFORETICA PER LA REALIZZAZIONE DI BIOSENSORI AMPEROMETRICI

**La tecnica di deposizione elettroforetica sembra riscontrare scarsa attenzione in letteratura:**



REALIZZAZIONE DI UN SENSORE PER IL GLUCOSIO

- ◆ K.W. Johnson, Sensors and Actuators B, 5 (1991) 85
- D.J. Strike et al., Sensors and Actuators B, 13-14 (1993) 61
  - elettrodeposizione galvanostatica di GOD e BSA;
  - crosslinking ex-situ con glutaraldeide (GLU)
- ◆ D.J. Strike et Al., Biosensor & Bioelectronics, 10 (1995) 61
  - estensione della tecnica tramite deposizione galvanodinamica.

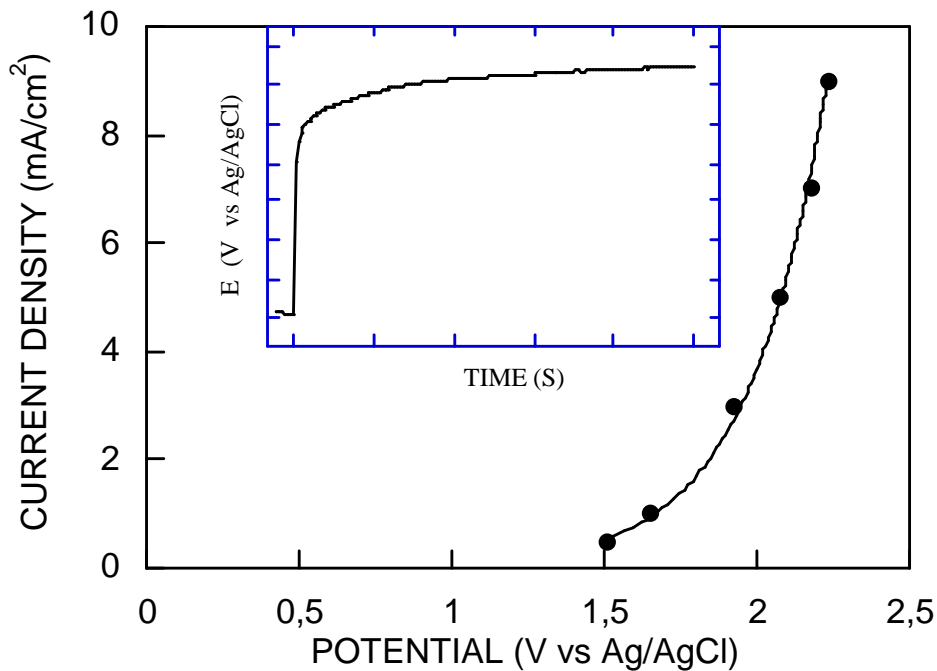


### **STUDIO ED OTTIMIZZAZIONE DI UNA TECNICA ELETTROCHIMICA CHE:**

- ◆ PERMETTA UN ADEGUATO CONTROLLO SULLA DEPOSIZIONE PROTEICA
- ◆ MINIMIZZI L'INDESIDERATO PROCESSO COLLATERALE DI SCARICA DEL SOLVENTE
- ◆ SIA COMPATIBILE CON LA DEPOSIZIONE ELETTROCHIMICA DI FILM PERMSELETTIVI

## DEPOSIZIONE GALVANOSTATICA

- ❖ applicazione di un impulso di **corrente costante** nell'intervallo **0.5 - 9 mA/cm<sup>2</sup>**
- ❖ evidenza di un **deposito schiumoso** solo per elevati valori di corrente imposta;
- ❖ evidente **evoluzione di ossigeno**



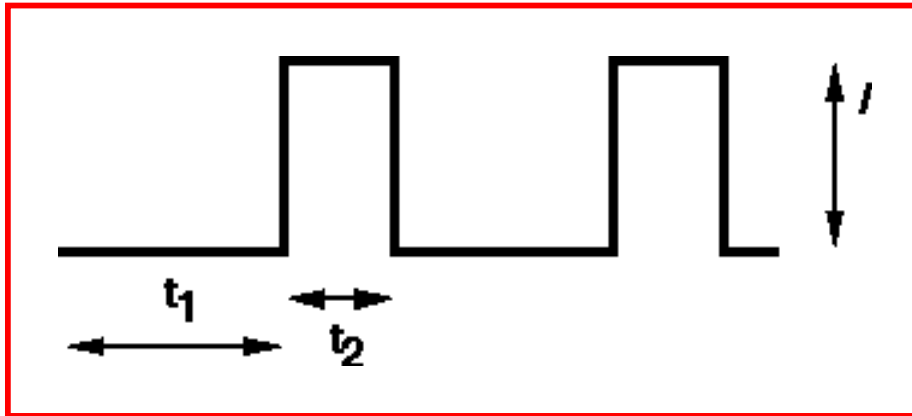
Per quanto **basso** possa essere il valore di **corrente** imposto per la deposizione, il potenziale raggiunge valori così alti da **promuovere la scarica dell'acqua**



**L'EVOLUZIONE DI GAS SULLA SUPERFICIE DELL'ELETTRODO INTERFERISCE PESANTEMENTE O IMPEDISCE LA FORMAZIONE DI UN DEPOSITO PROTEICO**

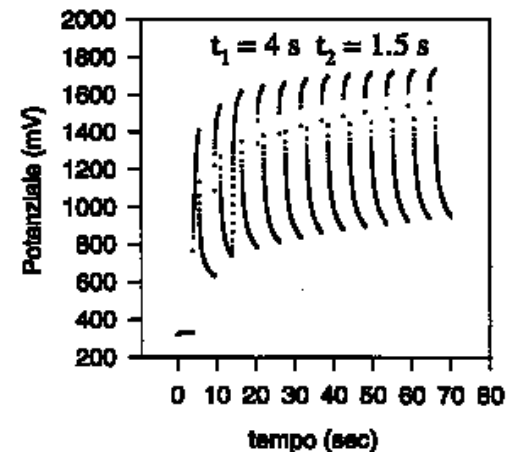
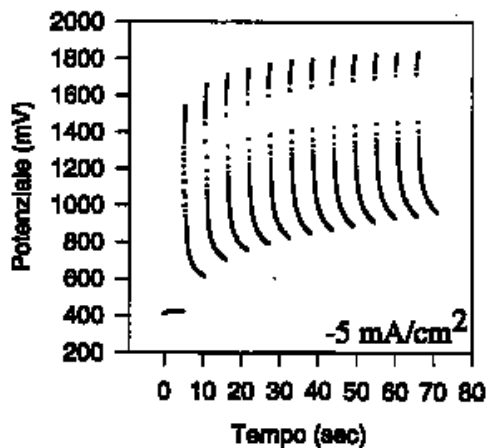
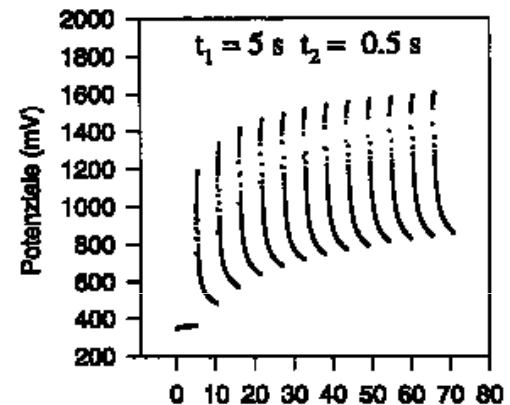
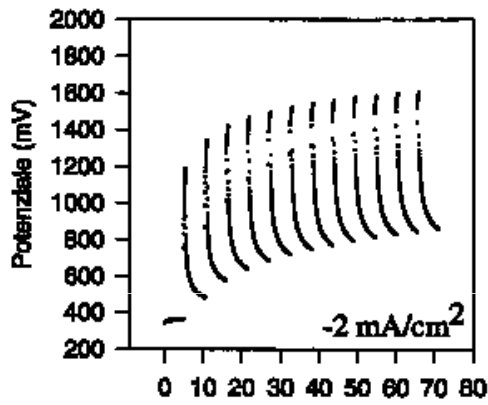
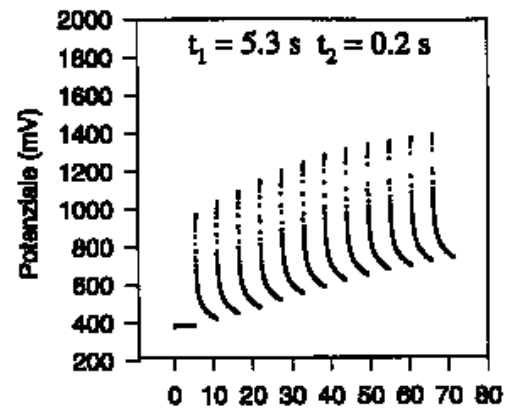
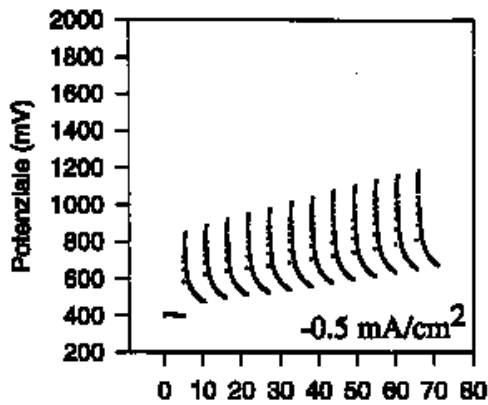


# DEPOSIZIONE GALVANODINAMICA

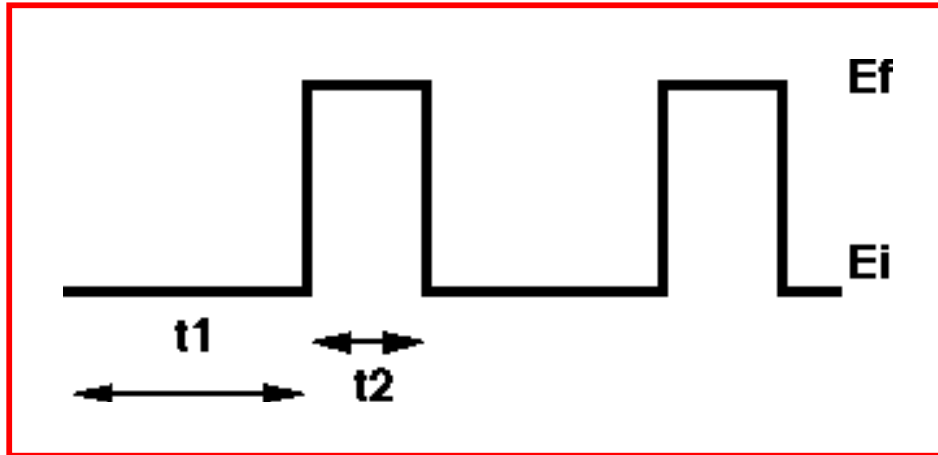


Studio ed ottimizzazione di  $I$

Studio ed ottimizzazione di  $t_1$  e  $t_2$

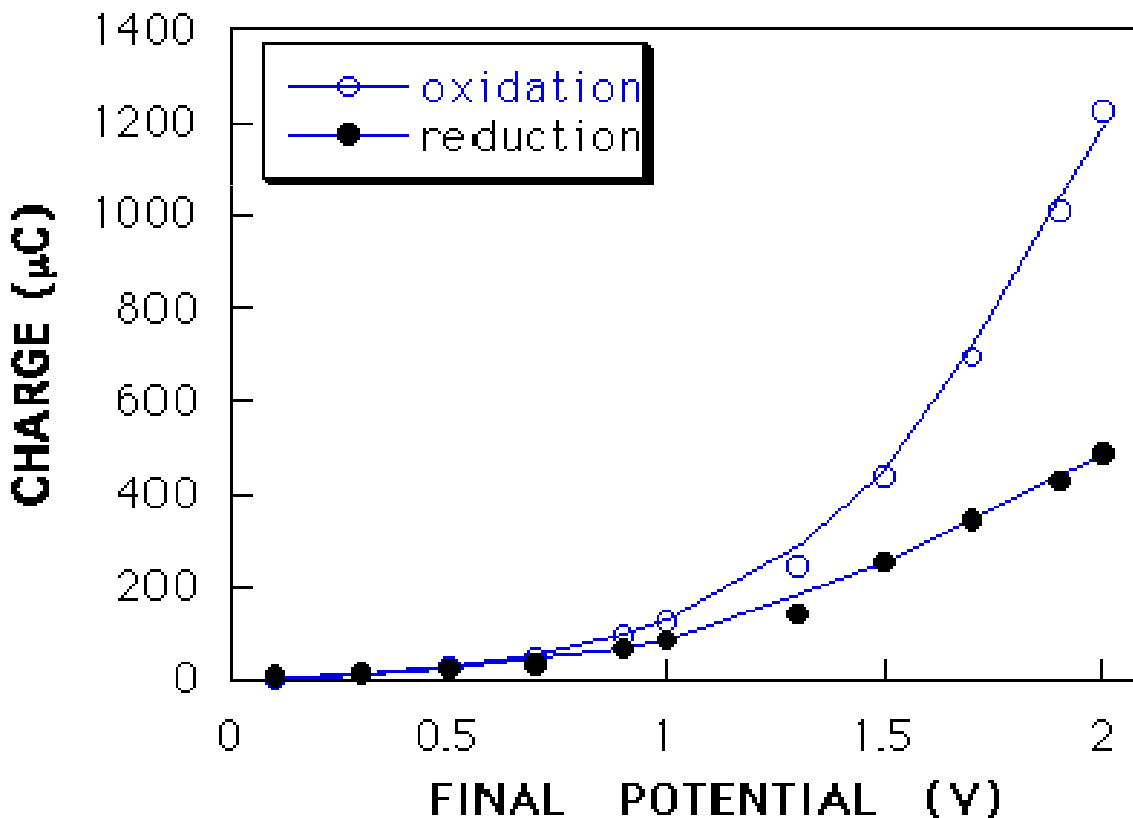


## DEPOSIZIONE POTENZIODINAMICA



*Applicazione di un potenziale  $E_i$  sufficientemente negativo da promuovere il completo stripping dell'ossido di platino formatosi durante l'applicazione positiva dell'impulso.*

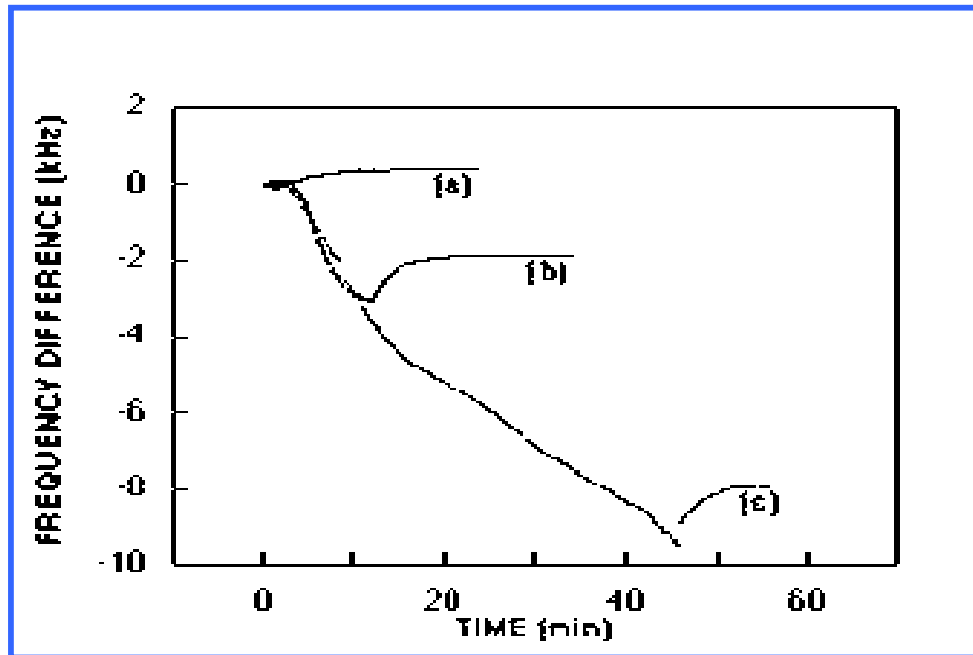
## STUDIO POTENZIODINAMICO DELLA FORMAZIONE/STRIPPING DELL'OSSIDO DI PLATINO



## DEPOSIZIONE ELETTROFORETICA: STUDIO EQCM

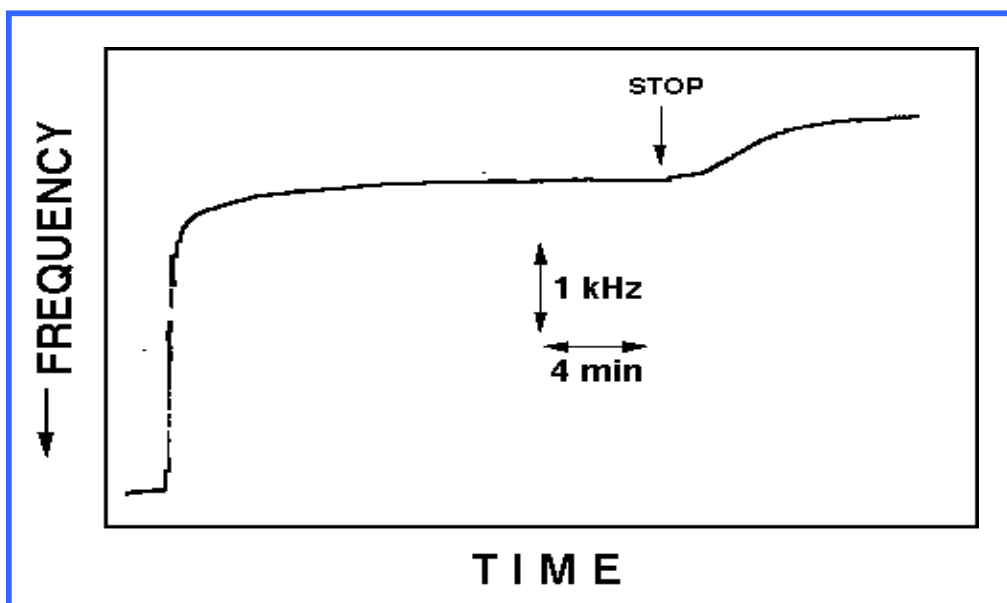
Studio della formazione e della crescita del deposito proteico tramite microbilancia elettrochimica a cristallo di quarzo (EQCM)

Impulsi di corrente



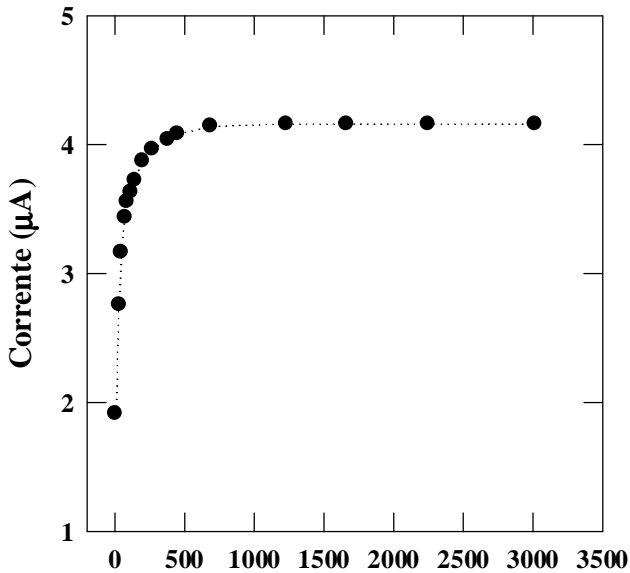
- (a) Solo elettrolita di supporto (variazione max  $\approx 0.1$  kHz)
- (b) Profilo di crescita per tempi brevi
- (c) Profilo di crescita per tempi lunghi

Impulsi di potenziale



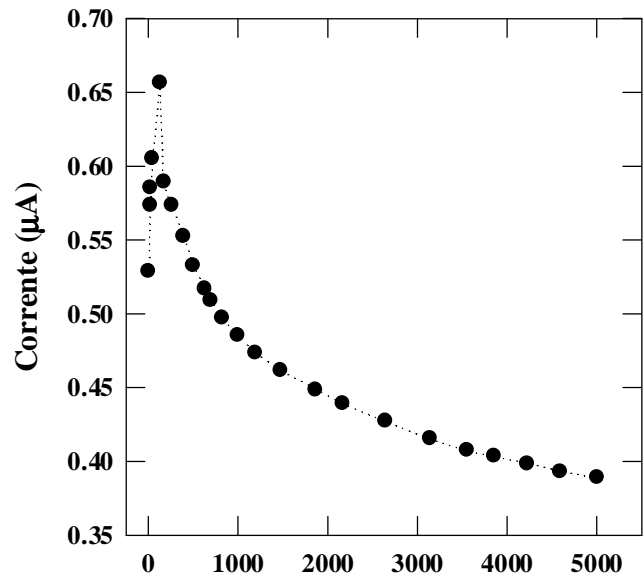
## Comportamento idrodinamico di sensori del tipo Pt/proteina

Strato spesso



Velocità di rotazione (rpm)

Strato sottile



Velocità di rotazione (rpm)

Responsi di un sensore Pt/GOD a diverse velocità di rotazione dell'elettrodo conseguenti all'aggiunta di glucosio 1.5 mM in tampone fosfato 0.1 M, pH 7.

L'aumento del responso all'aumentare della velocità di rotazione indica che la diffusione del substrato e/o del prodotto di reazione enzimatica all'interno della membrana proteica **non è cineticamente trascurabile.**

Controllo cinetico di tipo **diffusivo** solo per basse velocità di rotazione; all'aumentare della velocità di rotazione è la **catalisi enzimatica** a diventare lo **stadio cineticamente determinante.**



**POSSIBILITÀ DI MODULARE IL CONTROLLO DIFFUSIVO DEI BIOSENSORI VARIANDO OPPORTUNAMENTE LO SPESSORE DEL DEPOSITO PROTEICO**

# REALIZZAZIONE DI BIOUSENSORI AMPEROMETRICI MEDIANTE CODEPOSIZIONE ALL'ELETTRODO DELLO STRATO PROTEICO E DI UN FILM PERMSELETTIVO

## DUE APPROCCI PERSEGUITI:

- ◆ ELETTROSINTESI DI FILM PERMSELETTIVI SU ELETTRODI RICOPERTI DALLO STRATO PROTEICO (*Elettrodi Pt/strato proteico/film*)
- ◆ DEPOSIZIONE ELETTROFORETICA SU ELETTRODI PRECEDENTEMENTE MODIFICATI CON FILM PERMSELETTIVI (*Elettrodi Pt/film/strato proteico*)

### 1. *Elettrodi Pt/strato proteico/film*

Studio dell'influenza del deposito proteico sull'elettrosintesi di film polimerici permselettivi

### 2. *Elettrodi Pt/film/strato proteico*

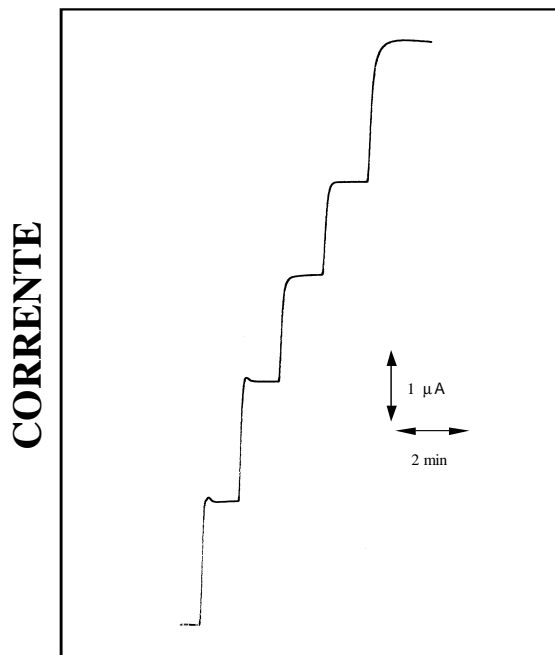
Studio dell'influenza della deposizione elettroforetica sulla permselettività dei film polimerici



Il PoAP risente solo in minima parte dell'applicazione della perturbazione elettrodica necessaria per la deposizione elettroforetica ed è quindi in teoria impiegabile per la realizzazione di biosensori di entrambe le configurazioni.

# RISPOSTA DEI BIOSENSORI AL GLUCOSIO

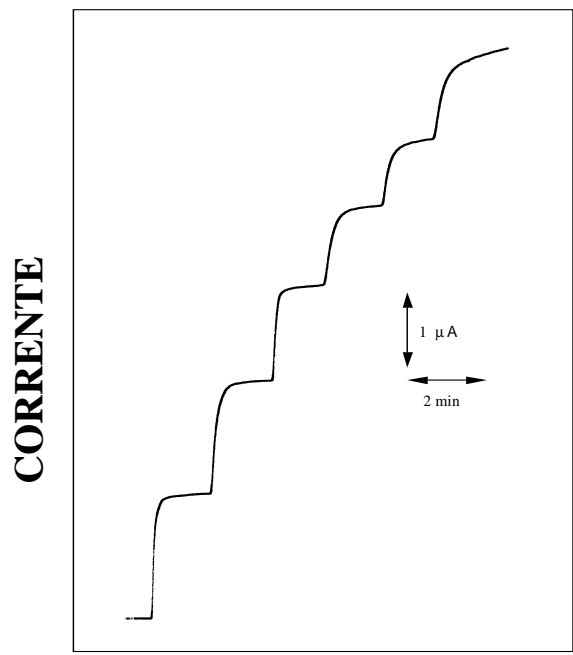
## • Biosensore Pt/PoAP/GOD



TEMPO

Responsi corrente-tempo relativi ad aggiunte di soluzioni standard di glucosio ad un elettrodo rotante (1000 rpm) effettuate in tampone fosfato I 0.1 M, pH 7. Concentrazioni di glucosio aggiunte: 1.25, 2.49, 3.72, 4.95, 7.39 mM.

## • Biosensore Pt/GOD/P2NAF



TEMPO

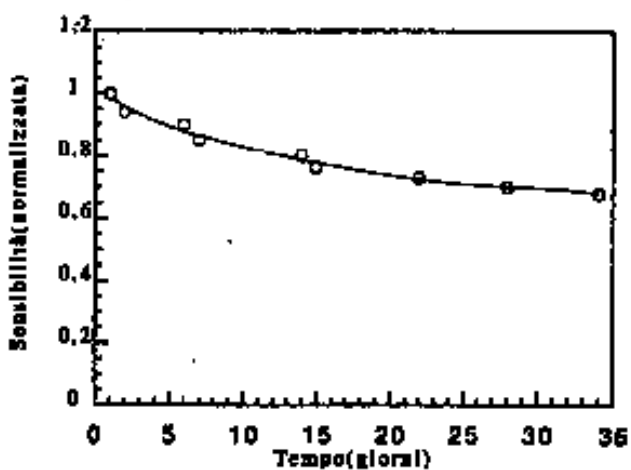
Responsi corrente-tempo relativi ad aggiunte di soluzioni standard di glucosio ad un elettrodo rotante (1000 rpm) effettuate in tampone fosfato I 0.1 M, pH 7. Concentrazioni di glucosio aggiunte: 1.25, 2.49, 3.72, 4.95, 6.17, 8.60 mM.

☺ **Tempo di risposta:** 4÷5 secondi

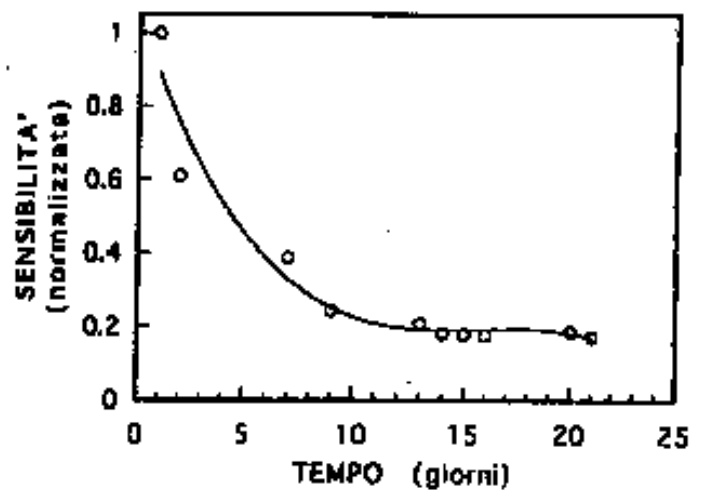
☺ **Sensibilità:** 0.3÷0.6 μA/(mM mm<sup>2</sup>)

☺ **Stabilità:** dopo circa 40 giorni di utilizzo la sensibilità è pari al 70% del valore iniziale

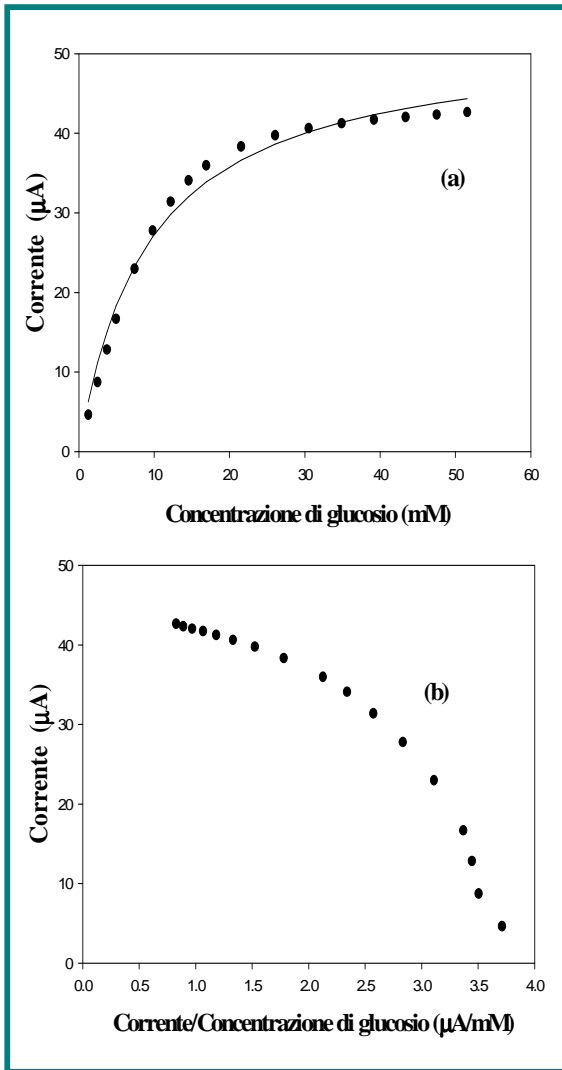
### Biosensore Pt/PoAP/GOD



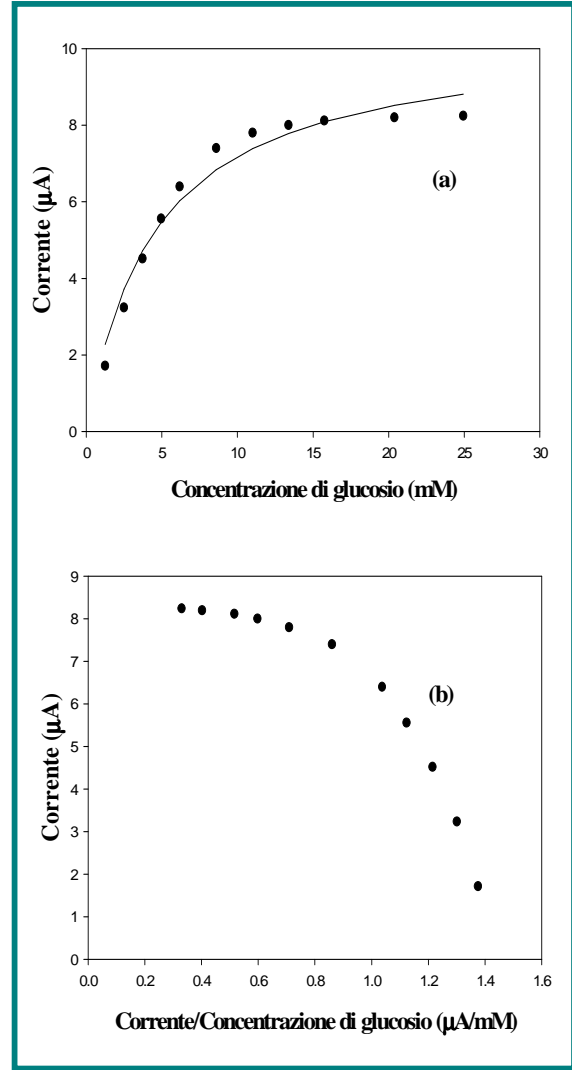
### Biosensore Pt/GOD-PoAP



• Biosensore Pt/PoAP/GOD



• Biosensore Pt/GOD/P2NAF



Curve di calibrazione (a) e diagrammi di Eadie-Hofstee (b) relativi a successive aggiunte di glucosio

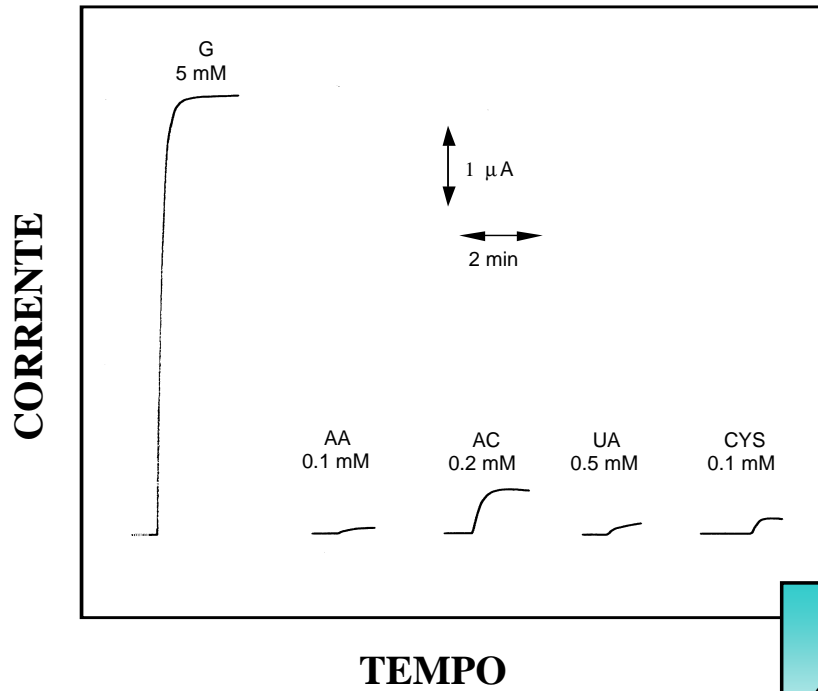
❖ I valori sperimentali corrente-concentrazione si discostano dal classico modello Michaelis-Menten tipicamente invocato in catalisi enzimatica:



Il processo di **diffusione** dei substrati e/o del prodotto di reazione enzimatica all'interno dello strato proteico non è cineticamente trascurabile

# CARATTERISTICHE ANTI-INTERFERENZIALI DEGLI ELETTRODI MODIFICATI Pt/DEPOSITOPROTEICO/FILM

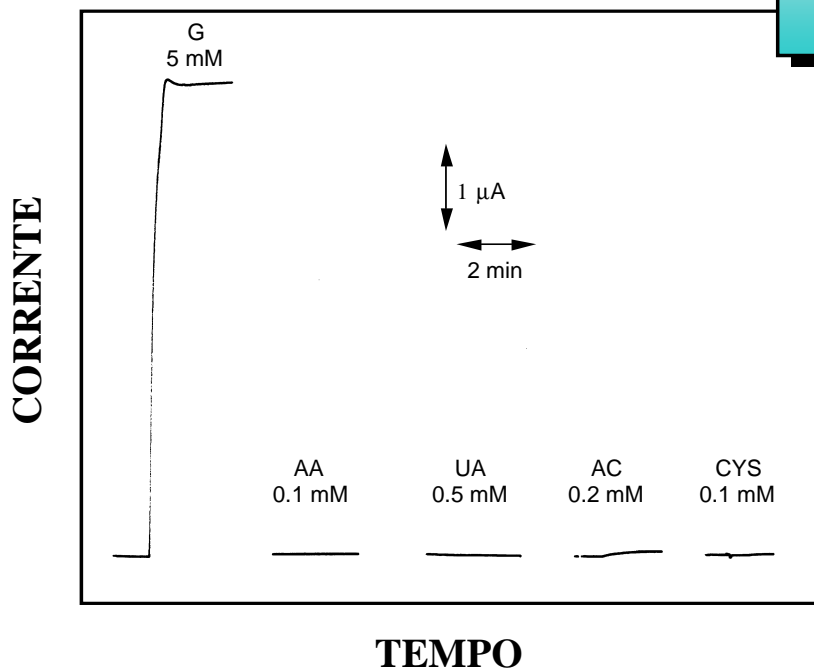
## • Biosensore Pt/GOD/PoAP



<i>Interferente</i>	<i>Bias</i>
AA 0.1 mM	0.068 mM
UA 0.5 mM	0.119 mM
AC 0.2 mM	0.494 mM
CYS 0.1 mM	0.170 mM

**G = glucosio**  
**AA = acido ascorbico**  
**UA = acido urico**  
**AC = acetamminofene**  
**CYS = cisteina**

## • Biosensore Pt/GOD/P2NAF



Responsi corrente-tempo relativi ad aggiunte di glucosio 5 mM, acido ascorbico 0.1 mM, acido urico 0.5 mM, acetamminofene 0.2 mM e cisteina 0.1 mM ad un elettrodo rotante (1000 rpm) in tampone fosfato I = 0.1 M, pH = 7.



# CONCLUSIONI

## REALIZZAZIONE DI BIOSENSORI AMPEROMETRICI BASATI SU METODICHE INNOVATIVE DI MODIFICAZIONE ELETTRODICA PER L'IMMOBILIZZAZIONE DI ENZIMI

- ◆ Sviluppo di una *metodica elettrochimica di immobilizzazione enzimatica* basata su:
  - **migrazione elettroforetica delle proteine sulla superficie elettrodica**
  - **co-crosslinking in situ con glutaraldeide**
  
- ◆ Ottimizzazione della metodica di elettrodeposizione:
  - sviluppo di una tecnica di elettrodeposizione proteica **galvanodinamica**
  - sviluppo di una tecnica di elettrodeposizione proteica **potenziodinamica**:
    - ⇒ selettività del processo di deposizione
    - ⇒ possibilità di controllare lo spessore dello strato depositato
  
- ◆ Codeposizione elettrochimica di film permselettivi
  - modificazione elettrodica del tipo Pt/film/strato proteico
  - modificazione elettrodica del tipo Pt/strato proteico/film



realizzazione di **biosensori amperometrici ibridi** caratterizzati da:

- ☺ elevata sensibilità
- ☺ elevata stabilità a breve e lungo termine
- ☺ eccellente reiezione degli interferenti