



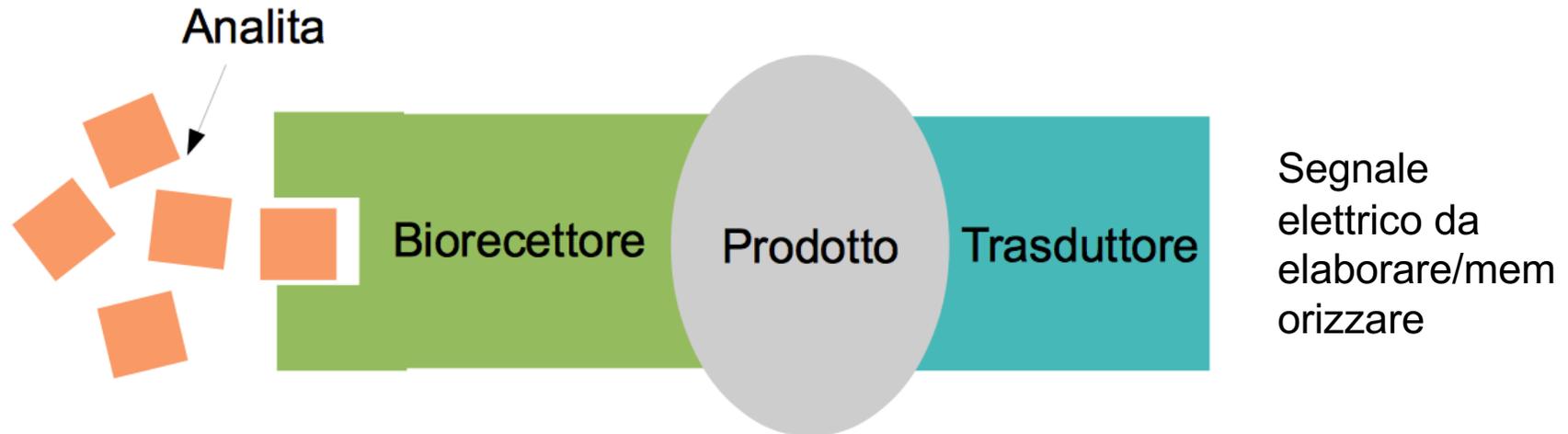
BioSensori

Alessandro Tognetti

Biosensori

▪ Definizione

- Un biosensore è un dispositivo di misura che utilizza un “recettore” biologico (o un suo derivato sintetico) associato ad un trasduttore di tipo chimico fisico



- Analita -> sostanza che intendiamo “misurare”
 - Glucosio, biomarker cardiaci, biomarker tumorali.....
- Biorecettore
 - Enzima (biosensore catalitico), anticorpo (biosensore di affinità), DNA/RNA, aptametro
- Trasduttore
 - Elettrochimico (potenziometrico, amperometrico), ottico, elettromeccanico, meccanico, acustico....

Biosensori

- In generale l'analita (A) reagisce con il recettore dando luogo ad un **prodotto** (P) la cui concentrazione viene misurata con **tecniche tradizionali** (elettrochimiche, ottiche...). In generale l'interazione biorecettore/analita dà luogo al prodotto e ci aspettiamo una certa relazione tra [A] e [P].

$$[A] = f([P])$$

- Nota: la relazione sopra-riportata non contiene la variabile tempo, ci riferiamo dunque a uno stato stazionario (consideriamo tutti i transitori esauriti)
- La relazione che intercorre tra concentrazione dell'analita ([A]) e concentrazione del prodotto ([P]) è di fondamentale importanza per un biosensore. Tale relazione deve essere nota (modelli cinetici, fisico/chimici) o determinabile attraverso una taratura effettuata per mezzo di sistemi standard
- **NB: In un biosensore si misura la concentrazione di P e si risale alla concentrazione di A attraverso la conoscenza di f (misura indiretta)**

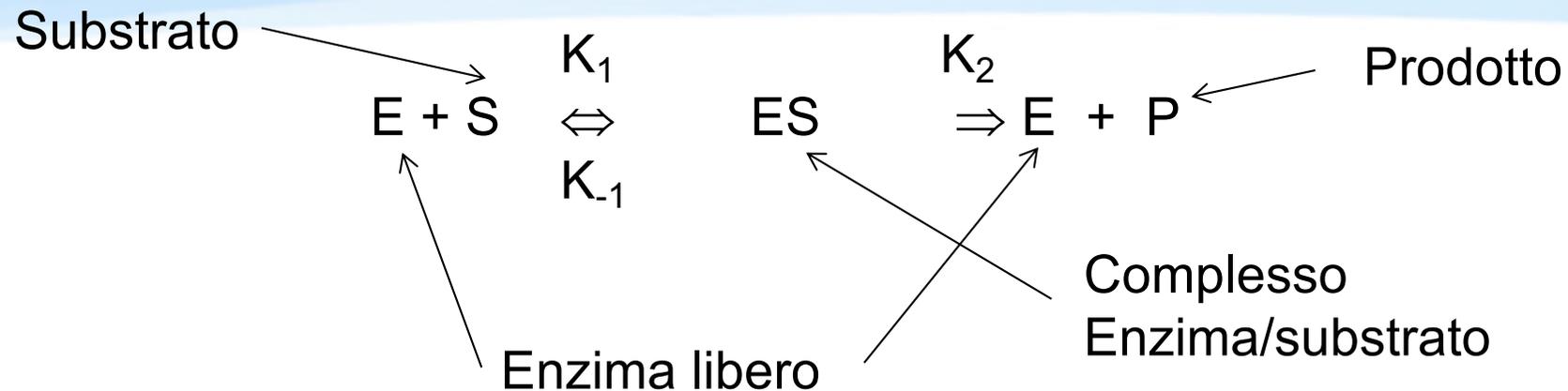
Biosensori

- La principale caratteristica di un biosensore è la **specificità** che è garantita dall'utilizzo di recettori biologici che per loro natura intrinseca sono specifici verso particolari analiti.
- Specificità: capacità di reagire solo con un determinato analita e non con altri che possono essere presenti nel nostro ambiente di misura.
 - In altri termini, gli altri analiti presenti nell'ambiente di misura sono grandezze di influenza con un effetto trascurabile.
- Caratteristiche biosensori:
 - Alta sensibilità
 - Velocità di misura
 - Economicità

Biosensori Catalitici

- Rappresentano la prima generazione di biosensori
 - Applicazione principale nella misura del glucosio per pazienti diabetici
- Sfruttano la caratteristica degli **enzimi** di catalizzare in **modo specifico** determinate reazioni
 - In particolare la presenza di un enzima specifico per una determinata reazione diminuisce l'energia di attivazione e accelera notevolmente la sua velocità.
 - La maggior parte delle reazioni biologiche catalizzate da enzimi hanno una velocità superiore di milioni di volte rispetto alla velocità che avrebbero senza alcun catalizzatore. Come per tutti i catalizzatori, gli enzimi **non sono consumati** dalla reazione che catalizzano.
 - La differenza principale degli enzimi dagli altri catalizzatori chimici è la loro **estrema specificità di substrato**. Essi infatti sono in grado di catalizzare solo una reazione o pochissime reazioni simili, poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo stereospecifico (è sensibile anche a piccolissime differenze della struttura tridimensionale).

Biosensori Catalitici

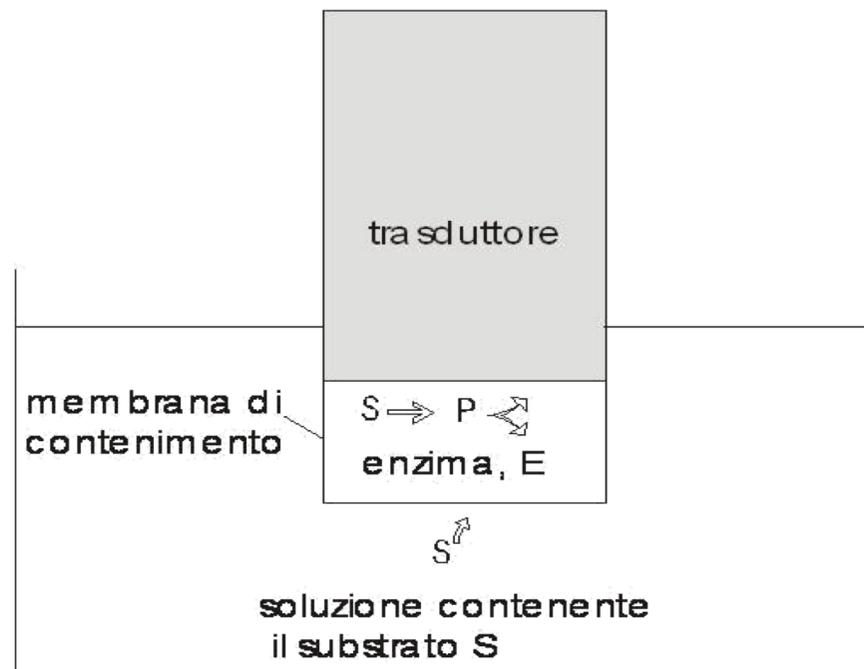


K_i : costanti di
velocità di reazione

- Si misura $[P]$ e si risale a $[S]$ tramite la conoscenza del modello $[S]=f([P])$
 - In generale avremo relazioni fortemente non lineari
 - La presenza dell'enzima garantisce la specificità del sensore
 - In altre parole essendo E specifico per S avrò un incremento del prodotto solo e soltanto in presenza della specie S

Biosensori Catalitici

- La superficie del trasduttore è in contatto con uno strato enzimatico trattenuto da una membrana, ed il tutto viene immerso nella soluzione da analizzare. Il substrato diffonde attraverso la membrana e reagisce con l'enzima. I prodotti della catalisi devono a loro volta diffondere verso il trasduttore per poi essere convertiti in un segnale quantificabile.



Esempio 1: biosensore glucosio

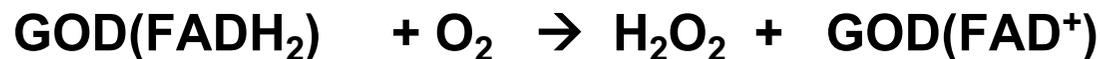
- La maggior parte dei biosensori per il glucosio sono basati sull'ossidazione del glucosio catalizzato dall'enzima glucosio-ossidasi (GOD).

– L'enzima GOD, di solito estratto da funghi, ossida il glucosio secondo la reazione seguente

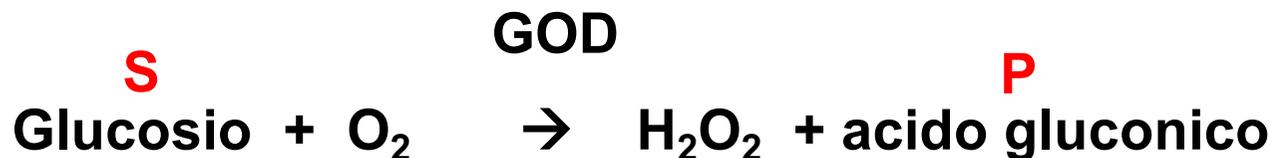


– Dove FAD è una flavina che funziona da cofattore dell'enzima GOD a cui è legato.

– Il GOD (FADH₂) è solitamente riossidato tramite reazione con ossigeno



- La sequenza di reazioni enzimatiche può essere riassunta come:



La concentrazione del prodotto può essere determinata con diversi metodi, una dei più utilizzati è quello elettrochimico in cui viene misurato la diminuzione di pH dovuta al prodotto (acido gluconico). Un'altra possibilità è quella di rilevare una riduzione locale della pressione parziale di O₂

Esempio 2: biosensore urea

- Il sensore per urea utilizza l'enzima ureasi, la sequenza delle reazioni è:



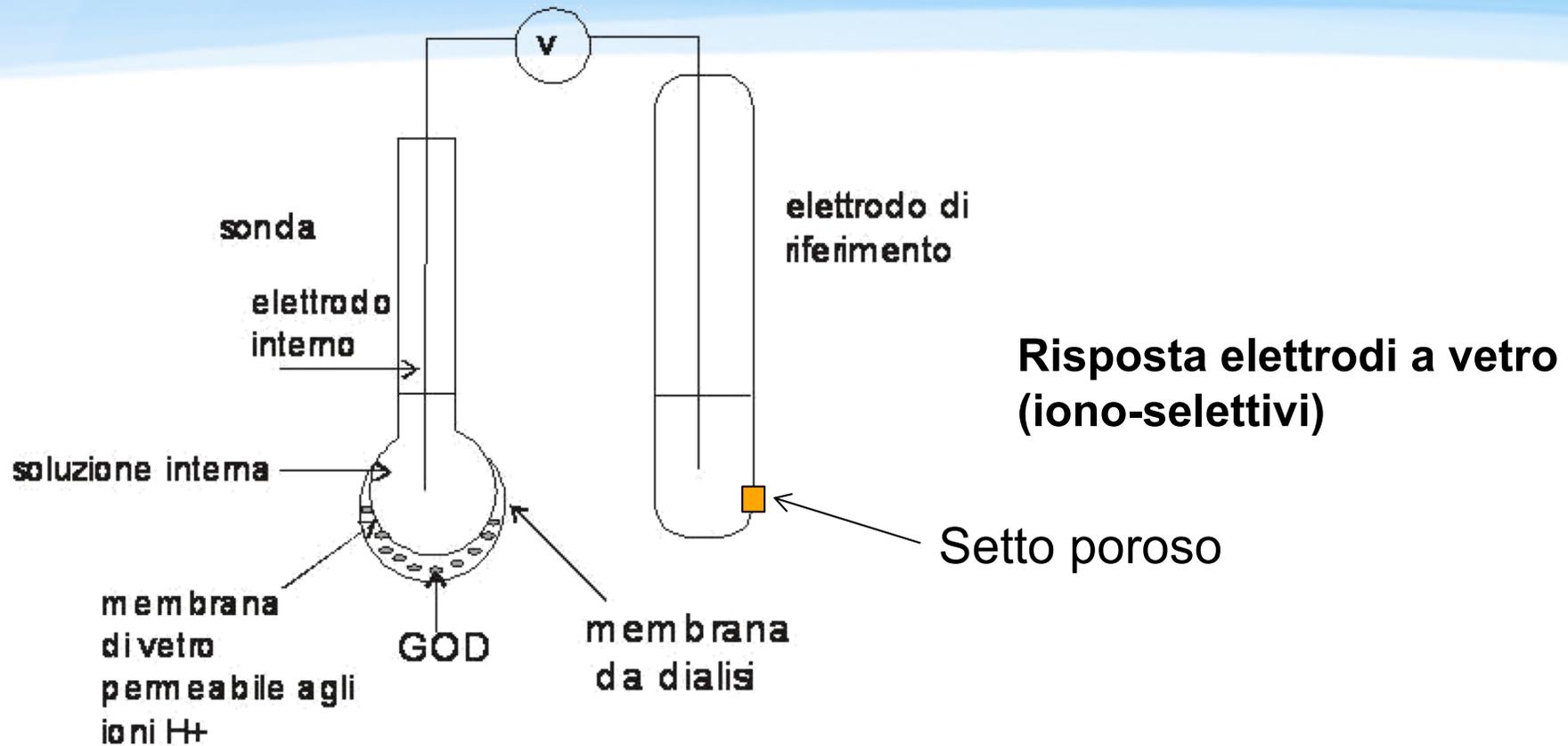
- Quindi l'urea può essere rivelata tramite un sensore di pressione parziale di CO_2 (P_{CO_2} aumenta con la concentrazione di urea)

Biosensore catalitico potenziometrico

- Si tratta di un biosensore catalitico il cui trasduttore associato è di tipo elettrochimico **potenziometrico**
- La componente essenziale di tali sensori consiste in un elettrodo per il pH modificato (elettrodo a vetro, elettrodo antimonio/ossido di antimonio...)
- Come noto la misura potenziometrica è basata sulla determinazione del potenziale fra l'elettrodo di riferimento (esempio AgAgCl) e l'elettrodo di misura. L'elettrodo per il pH fa parte di una cella elettrochimica ed il potenziale fra i due elettrodi viene misurato con un voltmetro.

Nei biosensori catalitici potenziometrici, l'elettrodo di pH viene modificato intrappolando molecole di enzima (GOD per il glucosio) tra l'elettrodo di vetro e la soluzione da analizzare. Tale sistema misura la variazione del pH dovuta al prodotto della reazione catalizzata dall'enzima. Nel caso del glucosio si misura la diminuzione del pH locale dovuta alla produzione di acido gluconico generata dall'ossidazione del glucosio.

Biosensore catalitico potenziometrico



$$V = \frac{RT}{F} \ln(a_{H^+})$$
$$V = -0.059 \text{ pH} \quad (@25^\circ C)$$

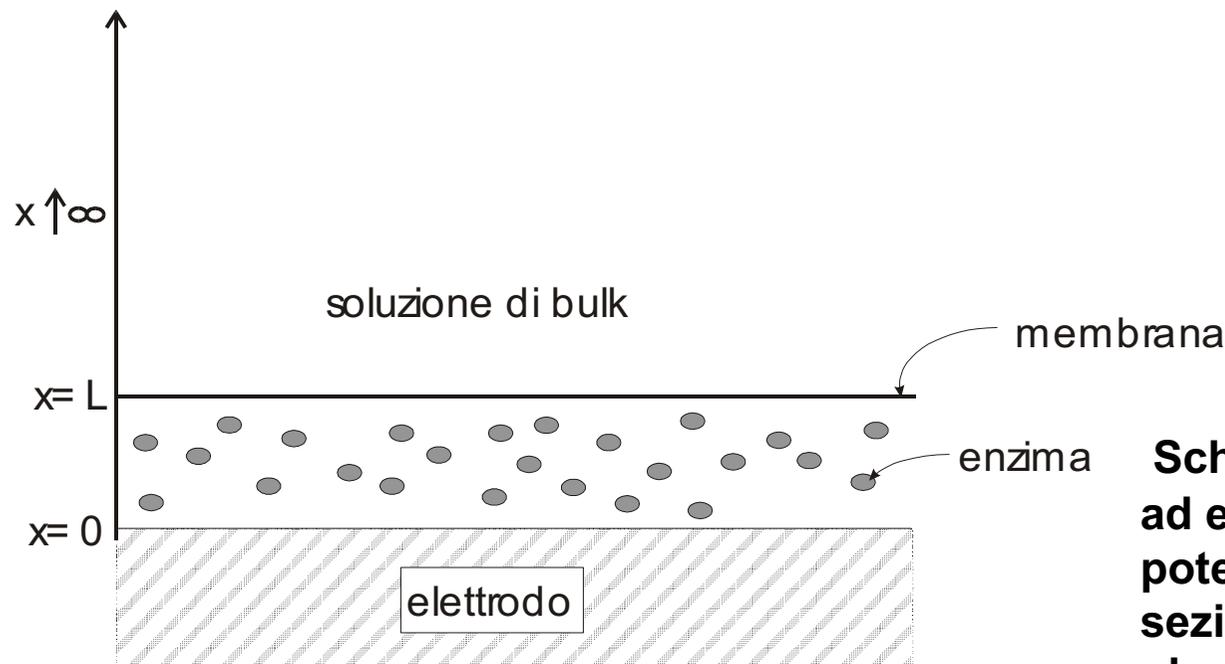
Misuro pH (P), ma come faccio a risalire a S?

Svantaggi del sensore potenziometrico

- Necessita di un elettrodo di riferimento molto stabile, che risulta difficilmente realizzabile in presenza di fluidi biologici come nel caso di impiego del sensore in vivo.
- Lo svantaggio che riguarda tutti sensori basati sull'uso dell'enzima GOD, è quello del consumo di ossigeno. Infatti nei fluidi corporei è presente una certa concentrazione di ossigeno che però può diminuire localmente a causa della ossidazione del glucosio e questo può portare a risultati falsati.

Cinetica dell'elettrodo ad enzima potenziometrico

- La modellazione del comportamento di un biosensore enzimatico è un problema di carattere bio-ingegneristico
- Come risalire alla concentrazione dell'analita (S) attraverso la misura del prodotto?



Schema semplificato biosensore ad enzima con lettura potenziometrica riportato in sezione. Si considera un sistema planare, con elettrodo posto a $x=0$ e la membrana che contiene l'enzima a $x=L$. La soluzione si estende fino a $x=\infty$.

Cinetica dell'elettrodo ad enzima potenziometrico

▪ Un elettrodo a enzima opera un processo a 5 passi:

1. Trasporto del substrato verso la membrana
2. Diffusione del substrato attraverso la membrana
3. Reazione di generazione di P
4. Trasporto del prodotto verso l'elettrodo
5. Reazioni di scambio elettronico all'elettrodo

Attraverso la misura del potenziale di elettrodo rispetto ad un elettrodo di riferimento (metodo potenziometrico) sarà possibile risalire alla concentrazione del prodotto.

Ognuno di questi cinque passi necessita di un certo tempo e contribuisce alla cinetica in maniera più o meno rilevante. Il punto 1 è dipendente fortemente dall'agitazione della soluzione, agitando opportunamente il substrato si ottiene un trasporto rapido non limitato dalla cinetica diffusoriale (punto 1 trascurabile). Usando una membrana molto sottile rispetto allo spessore dello strato enzimatico (punto 2 trascurabile). Inoltre, possiamo considerare la reazione come processo molto veloce (punto 5 trascurabile).

Cinetica dell'elettrodo ad enzima potenziometrico

- In generale all'interno dello strato enzimatico avremo sia S che P che avranno dei profili di concentrazione che variano con la distanza dall'elettrodo (x)
- L'obiettivo è quello di relazionare la concentrazione di P sulla superficie dell'elettrodo ($x=0$) con la concentrazione del substrato S nel bulk ($x \gg L$, $X = L$ considerando la soluzione agitata in modo opportuno)
- Considerando trascurabili i punti 1-2 (slide precedente) andremo a considerare gli effetti del trasporto di S e P (legge di Fick) e della velocità della reazione enzimatica (cinetica di Michaelis e Menten)
- Ci riferiremo sempre ad un caso **stazionario** (tutti i transitori sono esauriti e le reazioni hanno raggiunto il loro equilibrio)
 - caso stazionario -> concentrazioni delle specie in gioco sono costanti

Cinetica di Michaelis-Menten

- La cinetica di Michaelis-Menten (MM) descrive l'aumento della velocità delle reazioni catalizzate da enzimi al variare della concentrazione di substrato
 - In particolare, anche per bassi incrementi della concentrazione del substrato disponibile, la velocità di reazione aumenta in modo considerevole fino ad arrivare ad un valore massimo V_{max}
 - in condizioni di massima velocità il substrato satura l'enzima in soluzione e non resta enzima libero.
 - Nota: la concentrazione totale dell'enzima è costante

Cinetica di Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad V_{\max} = K_2 [E]_0$$

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

Costante di Michaelis-Menten

K_m rappresenta la concentrazione di substrato per cui la velocità è la metà della massima possibile

K_m indica l'affinità di un enzima ad un certo substrato. K_m basso: con minor substrato arrivo alla metà della massima velocità di reazione

Cinetica di Michaelis-Menten: dimostrazione



velocità di formazione del prodotto
dovuta alla reazione catalizzata da
enzima

STATO STAZIONARIO $[ES] = \text{cost}$

V FORMAZIONE ES $k_1 [E][S]$

V DISSOCIAZIONE ES $k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$ } = TRA LORO
IN CASO
STAZIONARIO

$$k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad \text{CONC. TOTALE ENZIMA} \quad [E] = [E]_0 - [ES]$$

$$k_1 [E]_0 [S] - k_1 [ES][S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E]_0 [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} = \frac{[E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$V = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

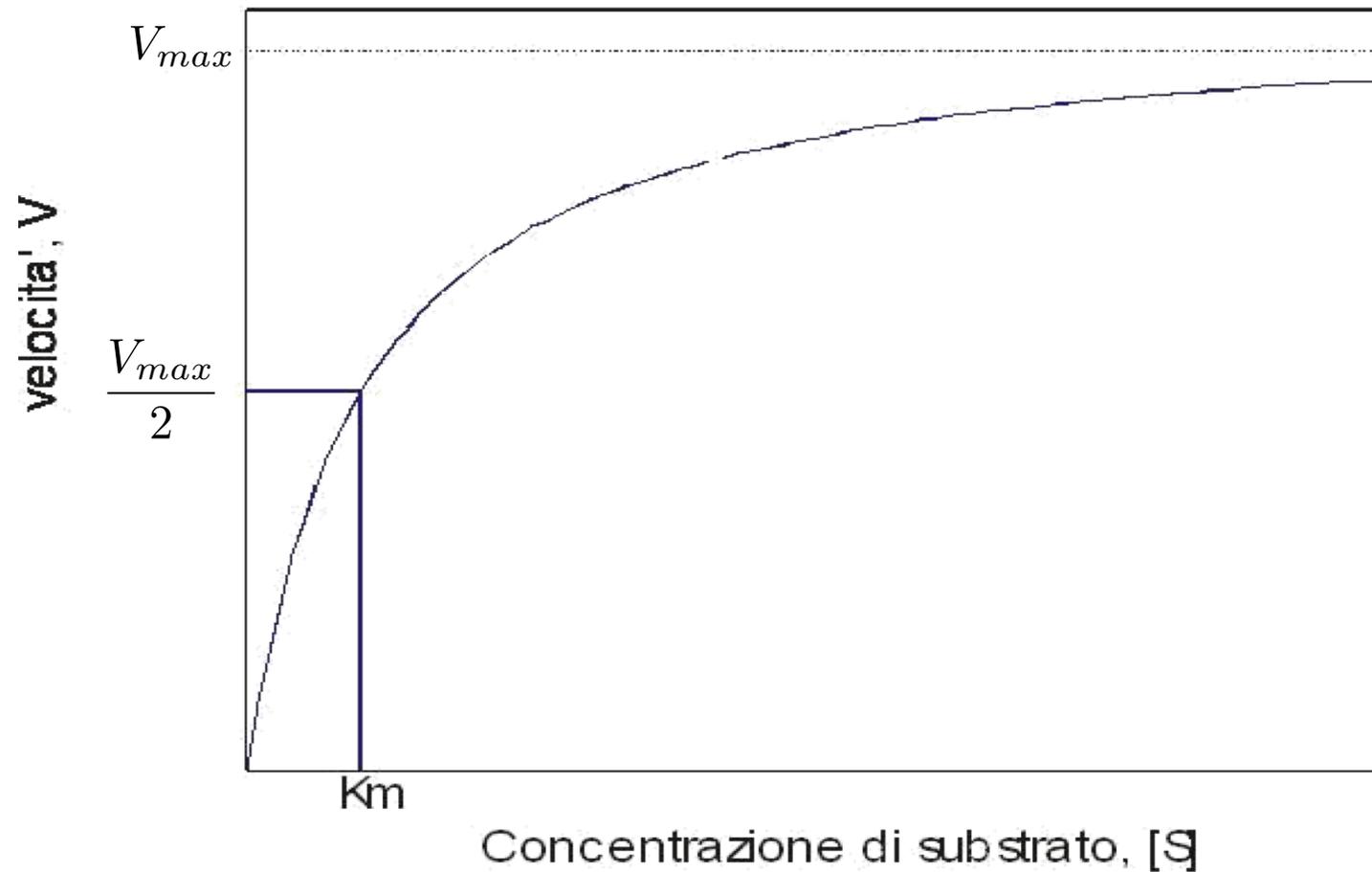
↓
FORMAZIONE
DEL PRODOTTO

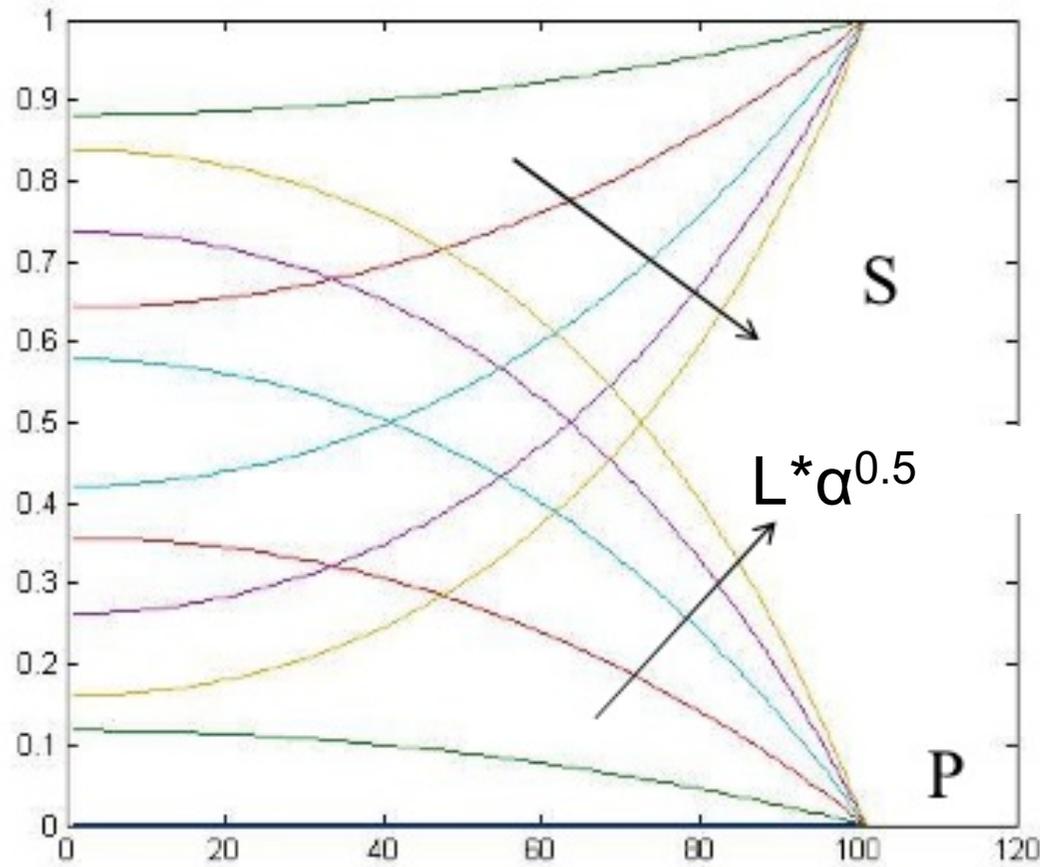
$k_2 [E]_0 \rightarrow V_{MAX}$ MASSIMA VELOCITA'
di FORMAZIONE di P

TUTTO ENZIMA
SATURATO DAL TRASOTTO.

Cinetica di Michaelis-Menten

Velocità di formazione del prodotto





ipotesi

$$[S]_L \ll K_m$$

$$\alpha = \frac{k_2 [E]_0}{D_s K_m}$$

$$[P] = \frac{D_s}{D_p} \cdot [S]_L \cdot \left(1 - \frac{\cosh(x \cdot \sqrt{\alpha})}{\cosh(L \cdot \sqrt{\alpha})} \right)$$

Andamento di $[P]/[S]_L$ e $[S]/[S]_L$ in funzione della distanza (normalizzata) nel caso che sia $[S]_L \ll K_M$. All'aumentare di $L \cdot \alpha^{0.5}$, una maggior percentuale di substrato si trasforma in prodotto sulla superficie dell'elettrodo

Modellazione del problema

- In generale all'interno dello strato enzimatico le concentrazioni di S e di P avranno dipendenza sia da x che dal tempo t
- In generale, per ogni x, la velocità di formazione del substrato dipenderà dalla quantità di S trasportata (Fick, costante di diffusione D_S) sottratta per la velocità di formazione del prodotto (Michaelis e Menten). Viceversa la velocità di formazione del prodotto sarà data dalla somma tra la quantità di P trasportata (Fick, costante di diffusione D_P) e la velocità di formazione del prodotto (Michaelis e Menten).

$$\begin{cases} \frac{\partial [S]}{\partial t} = D_S \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} = D_S \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{K_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \\ \frac{\partial [P]}{\partial t} = D_P \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} + \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} = D_P \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} + \frac{K_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \end{cases}$$

- Ipotesi: in tutto lo strato enzimatico siamo lontani dalla condizione di massima velocità di formazione del prodotto
 - $[S]_L \ll K_M$ ($[S]$ per $x = L$, in L ci aspettiamo la massima concentrazione di S in quanto lo strato enzimatico è appena iniziato, la concentrazione di S è trascurabile rispetto a K_m in tutto lo strato enzimatico)

Cinetica biosensore catalitico potenziometrico: dimostrazione (1)

$$\frac{d[S]}{dt} = D_s \frac{d^2[S]}{dx^2} - \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

CASO STAZIONARIO $\rightarrow \frac{d[S]}{dt} = 0$

$$D_s \frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

$[S] \ll K_M$ ($[S]_{x=L} \ll K_M$)
 \rightarrow valore max

$$\frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{V_{MAX} [S]}{D_s K_M} = \alpha [S]$$

$$\alpha = \frac{V_{MAX}}{D_s K_M} = \frac{k_2 [E]_0}{D_s K_M}$$

$$[S] = A e^{x\sqrt{\alpha}} + B e^{-x\sqrt{\alpha}}$$

$[S] \rightarrow$ non differenziale $\Rightarrow \left. \frac{d[S]}{dx} \right|_0 = 0$
NELLE CONDIZIONI

$$\Rightarrow A \sqrt{\alpha} e^0 - B \sqrt{\alpha} e^0 = 0 \Rightarrow A = B$$

$$[S] = 2A \cosh(x\sqrt{\alpha})$$

$$[S]_{x=L} = [S]_L = 2A \cosh(L\sqrt{\alpha})$$

$$A = \frac{[S]_L}{2 \cdot \cosh(L\sqrt{\alpha})}$$

$$\Rightarrow [S] = \frac{[S]_L \cosh(x\sqrt{\alpha})}{\cosh(L\sqrt{\alpha})}$$

Cinetica biosensore catalitico potenziometrico: dimostrazione (2)

$$0 = D_s \frac{d^2 [S]}{dx^2} - \frac{V_m [S]}{K_M}$$

$$0 = D_p \frac{d^2 [P]}{dx^2} + \frac{V_m [S]}{K_M}$$

$$D_s \frac{d^2 [S]}{dx^2} + D_p \frac{d^2 [P]}{dx^2} = 0$$

INTEGRA: $D_s \frac{d[S]}{dx} + D_p \frac{d[P]}{dx} = \text{costante} = 0$

$\left. \begin{aligned} \frac{d[S]}{dx} &= 0 \\ \frac{d[P]}{dx} &= 0 \end{aligned} \right\} \text{in } x=0$

$$\frac{d[P]}{dx} = -\frac{D_s}{D_p} \frac{d[S]}{dx} \quad [P] = -\frac{D_s}{D_p} [S] + \text{costante}$$

$$x=L \quad [P]_L = 0 = -\frac{D_s}{D_p} [S]_L + \text{costante} \Rightarrow \text{costante} = \frac{D_s}{D_p} [S]_L$$

$$\left. \begin{aligned} [P] &= \frac{D_s}{D_p} \left([S]_L - [S] \right) \\ [S] &= \frac{[S]_L \cosh(x\sqrt{\lambda})}{\cosh(L\sqrt{\lambda})} \end{aligned} \right\} [P] = \frac{D_s}{D_p} [S]_L \left(1 - \frac{\cosh(x\sqrt{\lambda})}{\cosh(L\sqrt{\lambda})} \right)$$

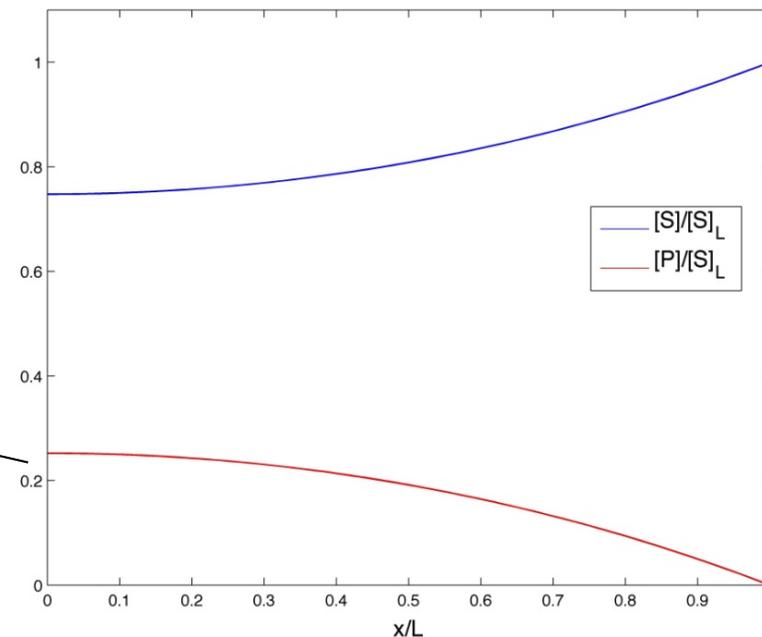
Esempio Sensore di Glucosio Potenzimetrico

- Per progettare un sensore enzimatico è importante poterlo dimensionare per ottenere la risposta desiderata.
- Ad esempio l'enzima GOD estratto da *Aspergillus niger* ha una K_M di 0.1 M. Quindi, nel caso di glucosio nel sangue, che può avere una concentrazione di 1 o 2 mM in condizioni di ipoglicemia, fino a 20 mM in caso di elevata iperglicemia, siamo nelle condizioni $[S]_L \ll K_M$. In un tipico sensore potenziometrico, considerando il rapporto D_s/D_p pari ad 1, per $L=400 \mu\text{m}$, $K_2=1 \text{ s}^{-1}$, $D_s=0.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, $[E]_0$ ordine del 1mg/ml (0.02 mM), risulta che $L^*(\alpha)^{0.5}=0.8$. Quindi dopo che il sistema ha raggiunto l'equilibrio, circa il 25% di glucosio è stato convertito in acido gluconico alla superficie dell'elettrodo

Prodotto sulla
superficie
dell'elettrodo
($x=0$)

Glucosio
bulk $x>L$

$$[P]_0 = 0.25 \cdot [S]_L$$



Esempio Sensore di Glucosio Potenzimetrico

- L'acido gluconico si dissocia in H^+ e $C_6H_{11}O_7^-$
 - ipotesi: si dissocia completamente
- La differenza di potenziale sviluppata all'interfaccia dell'elettrodo è data dall'equazione di tipo-Nernst $E = E_0 + \frac{RT}{F} \ln(a_{H^+})$
- Con una concentrazione di glucosio pari a 5mM e considerando il dimensionamento della slide precedente otteniamo:

$$[P]_0 = 0.25 * [S]_L = 1.25 \text{mM}$$

- $V = E_0 + 0.0256 \ln([P]_0) = E_0 + m \ln([P]_0)$ ($m = 0.0256$)
- In pratica, l'acido gluconico non risulterà completamente dissociato e ci saranno reazioni locali che interferiranno con l'ossidazione
 - risulterà: $m < 0.0256$

NB: l'uscita dipende dalla concentrazione del prodotto sulla superficie dell'elettrodo che dipende a sua volta dalla concentrazione del substrato nel bulk

Biosensore catalitico amperometrico

- Si tratta di un biosensore catalitico il cui trasduttore associato è di tipo elettrochimico **amperometrico**
- La componente essenziale di tali sensori consiste in un elettrodo per la misura della pressione parziale di un gas modificato (elettrodo per ossigeno, elettrodo di Clark)
- Come noto la misura amperometrica è basata sulla misura della corrente che scorre in un elettrodo di Pt polarizzato negativamente rispetto ad un elettrodo di riferimento AgAgCl. **Se la tensione di polarizzazione è opportunamente dimensionata, la corrente è limitata dalla diffusione e la corrente è proporzionale alla pressione parziale del gas**

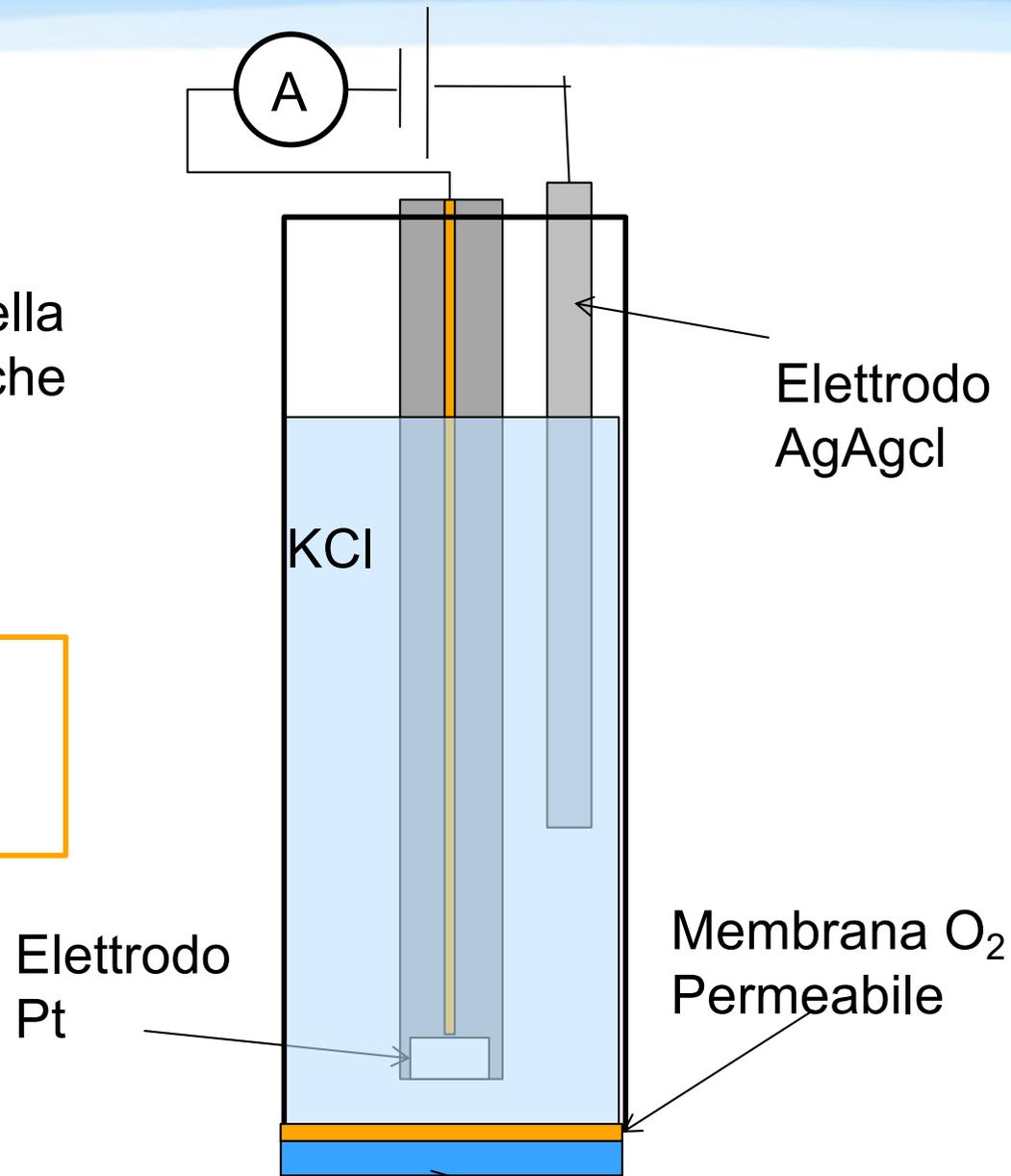
Nei biosensori catalitici amperometrici, l'elettrodo viene modificato intrappolando molecole di enzima (GOD per il glucosio). Tale sistema misura la variazione della pressione parziale di un gas dovuta al prodotto della reazione catalizzata dall'enzima. Nel caso del glucosio si misura la diminuzione della pressione parziale dell'O₂ consumato.

Biosensore catalitico amperometrico

Elettrodo di Clark modificato

Reazione del glucosio provoca una riduzione della pressione parziale di O_2 che viene misurata con l'elettrodo di Clark

Elettrodo Clark: corrente proporzionale alla pressione parziale di O_2



Biosensori catalitici potenziometrici e/o amperometrici

- misuriamo [P]
 - pH (potenziometrico) o riduzione pressione parziale di O₂ (amperometrico)
- vogliamo stimare [S]
 - necessario modello [S]=f([P])
 - potenziometrici -> cinetica dell'elettrodo $[P]_0 = \frac{D_s}{D_p} [S]_L \left(1 - \frac{1}{\cosh(L\sqrt{\alpha})} \right)$
 - Alternativa: **taratura**
 - misurare l'uscita del sensore applicando concentrazioni note di analita e costruire la caratteristica (statica) per punti