

Università degli Studi di Genova
Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica
Biosensori e Microsistemi
Esercitazione 1: biosensori per il glucosio
Anno Accademico 2004-2005

Mara Scaramozzino
Michele Tavella

1 agosto 2005

Indice

1	Introduzione	4
2	Strumenti e materiali	5
2.1	Glucosio	5
2.2	Biosensore	6
3	Esperienze	8
3.1	Soluzione H ₂ O-glucosio 15mM	9
3.1.1	Calibrazione	9
3.1.2	Risultati	10
3.1.3	Conclusioni	12
3.2	Soluzione H ₂ O-succo di frutta	14
3.2.1	Calibrazione	14
3.2.2	Risultati	15
3.2.3	Conclusioni	15
4	Conclusioni	18

Elenco delle figure

1	Forma lineare del D-Glucosio (sinistra) e del L-Glucosio (destra).	5
2	Forma di Haworth dell' α -D-glucopiranosio (sinistra) e del β -D-glucopiranosio (destra).	5
3	I tre segnali letti ai capi del trasduttore ($[A]=5\text{mM}$, $[B]=10\text{mM}$, $[C]=20\text{mM}$) e la curva di calibrazione ottenuta. Il triangolino sui grafici indica il massimo rilevato sul segnale. I cerchietto indica il punto di presunta stabilità. I punti di presunta stabilità e le rispettive concentrazioni, sono riportati sul grafico della curva di calibrazione.	11
4	Segnale letto ai capi del trasduttore: H_2O -glucosio - 15mM . . .	12
5	I tre segnali letti ai capi del trasduttore ($[A] = \text{succo} + 0\text{mM}$, $[B]= \text{succo} + 10\text{mM}$, $[C] = \text{succo} + 20\text{mM}$) e la curva di calibrazione ottenuta.	16

Elenco delle tabelle

1	Valori caratteristici: calibrazione - H ₂ O-glucosio.	9
2	Valori caratteristici: misura - H ₂ O-glucosio.	12
3	Valori caratteristici: calibrazione - H ₂ O-succo di frutta.	14

1 Introduzione

Questa esercitazione ha come scopo la misurazione della concentrazione di glucosio nelle seguenti due soluzioni:

1. Acqua e glucosio (concentrazione 15mM).
2. Acqua e succo di frutta (concentrazione sconosciuta).

Per ottenere la misura è necessario che il campione sia accostato all'estremità del sensore in modo che esso venga aspirato per capillarità all'interno della camera di reazione. Nelle due parti dell'esercitazione abbiamo ricavato altrettante rette di calibrazione grazie ad uno script Matlab appositamente sviluppato. La conoscenza della concentrazione di glucosio in una soluzione è importante a fini terapeutici, in quanto permette di avere informazioni sulla glicemia ematica in soggetti affetti da diabete; altrettanto fondamentali sono, quindi, gli strumenti che consentono la buona riuscita di tale misurazione.

2 Strumenti e materiali

In questa sezione vengono illustrati gli strumenti utilizzati durante l'esercitazione. Al fine di sottolineare esclusivamente i punti salienti dell'esperienza, si tralascia la descrizione delle operazioni manuali necessarie per la preparazione delle soluzioni. Si esordisce con una breve descrizione della molecola di cui andiamo a misurare la concentrazione, ossia il glucosio. Quindi, viene approfondito il funzionamento dello strumento d'interesse, ossia il biosensore. Si conclude, con una breve spiegazione del protocollo seguito per effettuare l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

2.1 Glucosio

Il glucosio [1] ($C_6H_{12}O_6$) è una molecola a sei atomi di carbonio. Esso si può presentare in due configurazioni: il D-glucosio e L-glucosio¹.

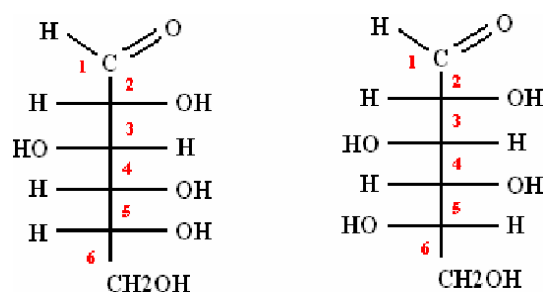


Figura 1: Forma lineare del D-Glucosio (sinistra) e del L-Glucosio (destra).

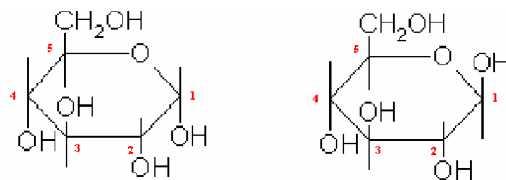


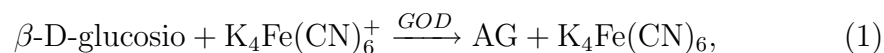
Figura 2: Forma di Haworth dell' α -D-glucopiranosio (sinistra) e del β -D-glucopiranosio (destra).

¹La differenza tra le forme L e D del glucosio è dovuta alla posizione del gruppo ossidrilico sul carbonio 5. L'enantiomero L è speculare rispetto all'enantiomero D.

Tuttavia, solo il D-glucosio è presente in natura e quindi prenderemo in considerazione solo tale configurazione. La molecola del D-glucosio è presente in due forme, che differiscono solo per la configurazione sul carbonio anomero²: α -D-Glucosio e β -D-Glucosio. In soluzione acquosa il D-Glucosio si presenta per il 36% come anomero α e per il restante 64% come anomero β [2]. La forma β sembra essere la più stabile a causa della posizione dei gruppi alcolici. Per completezza, si ritiene corretto specificare che tale zucchero non si trova mai in configurazione lineare o di Fischer (Fig.1), ma soltanto in due forme chiuse, denominate forme di Haworth. I due anomeri, prendono così, il nuovo nome di α -D-glucopiranosio e β -D-glucopiranosio (Fig.2).

2.2 Biosensore

Per ottenere la misura è necessario che il campione sia accostato all'estremità del sensore in modo che esso venga aspirato per capillarità all'interno della camera di reazione, nella quale sono immobilizzati in una matrice polimerica amorfa l'enzima glucosio ossidasi (GOD) e il mediatore³, in questo caso ferrocianuro di potassio. L'enzima GOD catalizza l'ossidazione del glucosio in acido gluconico e riduce il mediatore, che si ossida all'elettrodo:



dove *AG* indica l'acido gluconico. Tale reazione irreversibile avviene nella cella di misura del sensore. L'ossidazione di cui sopra genera una corrente tra gli elettrodi strettamente legata alla concentrazione presunta di glucosio. Questa corrente costituisce l'output del dispositivo. Applicando una differenza di potenziale costante si misurano le variazioni della corrente. In generale, è osservabile un picco di corrente iniziale, tipicamente capacitivo, seguito da un plateau e da una progressiva diminuzione della corrente causata dal progressivo consumo di glucosio. Il passo successivo dell'esercitazione è consistito nell'effettuare le misure utilizzando un'altra soluzione di concentrazione nota (15mM), preparata precedentemente e lasciata riposare. Si è quindi cercato di ricavare la concentrazione (ignota) di glucosio presente in un succo di frutta. Per riassumere:

²Carbonio 1

³Il mediatore è una molecola sintetica (comunemente utilizzata nell'ambito dei biosensori) che rimpiazza l'ossigeno (nella forma O₂).

1. glucosio-H₂O (15mM)
2. succo di frutta-H₂O (concentrazione ignota)

Il biosensore utilizzato è in grado di rilevare concentrazioni di glucosio comprese tra 2mM e 20mM (o tra 70mg/dL e 160mg/dL).

3 Esperienze

In questa sezione sono riportati i metodi di calibrazione, i risultati e le conclusioni relative alla misura della concentrazione di glucosio in una soluzione H₂O-glucosio 15mM e in una soluzione H₂O-succo di frutta, nella quale la concentrazione dell'analita è ignota. È importante specificare che il sensore è selettivo per il β -D-glucosio⁴. Tuttavia, le soluzioni analizzate conterranno entrambe le configurazioni α e β . I risultati ottenuti sono quindi riferiti alla concentrazione della configurazione β , in cui i gruppi ossidrilici appaiono alternati.

⁴Nel sangue non vi è traccia di α -D-glucosio

3.1 Soluzione H₂O-glucosio 15mM

3.1.1 Calibrazione

Nella prima parte dell'esercitazione abbiamo costruito una retta di calibrazione effettuando tre misure a concentrazioni di glucosio note, ovvero 5, 10 e 20mM. A questo scopo è stata diluita una soluzione a 100mM con acqua deionizzata in giuste proporzioni al fine di ottenere tre campioni da 20mL ciascuno:

1. 20mM: 16ml di acqua e 4ml di glucosio 100mM
2. 10mM: 18ml di acqua e 2ml di glucosio 100mM
3. 5mM: 19ml di acqua e 1ml di glucosio 100mM.

Per ottenere concentrazioni precise ci siamo serviti di pipette di capacità pari ad 1mL. Il secondo passo è consistito nel posizionare il sensore sulla basetta utilizzando pinzette in modo da non toccarlo con le mani, in modo da non compromettere la misura. Dopo alcune prove di posizionamento il sensore è stato inserito sulla basetta in modo che gli elettrodi planari stampati su di esso fossero bene a contatto con gli elettrodi collegati al potenziostato. Una volta applicata una differenza di potenziale pari a 0.5V ai capi dell'elettrodo è stato possibile seguire l'andamento del segnale in corrente campionato a 2Hz grazie ad un'opportuno software realizzato con LabView. Sono state eseguite le misure per le tre concentrazioni ottenendo curve con uguale andamento ma diverso valore di equilibrio, la cui variazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione. I valori in corrente registrati durante le tre misurazioni sono riportati in Tab. 1.

Concentrazione	Massimo	Stabilità
5mM	14.868 μ A (24s)	1.074 μ A (84s)
10mM	19.284 μ A (10.5s)	3.586 μ A (70.5s)
20mM	18.143 μ A (42.5s)	9.756 μ A (102.5s)

Tabella 1: Valori caratteristici: calibrazione - H₂O-glucosio.

Partendo dai risultati appena riportati si è ottenuto (utilizzando Origin) il fit lineare della retta di calibrazione che ha permesso, secondo il principio di interpolazione lineare, di risalire a concentrazioni di glucosio incognite dal

valore della corrente segnalato dal sensore. Il fit della curva ottenuto tramite quest'ultimo pacchetto software non risultava essere soddisfacente a causa di un'errata rappresentazione dei coefficienti della retta stessa, non concordante con quanto visualizzato graficamente. Si è quindi deciso di implementare uno script per Matlab in grado di eseguire tutte le operazioni di calibrazione richieste. Il funzionamento dello script non viene riportato per esigenze di sintesi. Tuttavia, nella descrizione delle operazioni necessarie al fine di calibrare il biosensore si farà riferimento a *m_fitter.m*. I valori riportati in Tab. 1 sono i tre segnali correlati alle tre differenti concentrazioni di analita utilizzate. Lo script *m_fitter.m* ricerca il massimo valore di corrente ed il punto di presunta stabilità 60s dopo il picco. In Fig. 3 è riportato l'output grafico di *m_fitter.m*. Si notino i punti di massimo, di stabilità ed il fit lineare.

L'equazione della retta di calibrazione ricavata utilizzando *m_fitter* è la seguente:

$$\begin{cases} i(C) = mC + c \\ m = 0.8682 \\ c = -3.8767, \end{cases} \quad (2)$$

dove C è la concentrazione dell'analita ed $i(C)$ è la corrente letta ai capi del trasduttore (funzione della concentrazione). I parametri m e c corrispondono ai coefficienti di ordine uno e zero della curva di regressione.

3.1.2 Risultati

Una volta trovata la curva di calibrazione (2), si procede con il processo di misura su una soluzione a concentrazione di glucosio nota (15mM). Si indica con $\hat{i}(C)$ il valore della corrente (in microAmpere) ottenuto sostituendo $C = 15mM$ in(2):

$$\begin{cases} \hat{i}(C) = mC + c = 9.1463 \\ m = 0.8682 \\ c = -3.8767 \\ C = 15. \end{cases} \quad (3)$$

Se la curva di calibrazione del sensore fosse corretta, il valore della corrente calcolato in (3) deve corrispondere al valore estratto dal segnale letto ai capi del trasduttore⁵. A tal proposito, si faccia riferimento a Fig. 4 ed a Tab. 2.

⁵Anche in questo caso si è utilizzato *m_fitter* per la ricerca del picco e la conseguente estrazione del punto di stabilità 60s dopo il picco stesso.

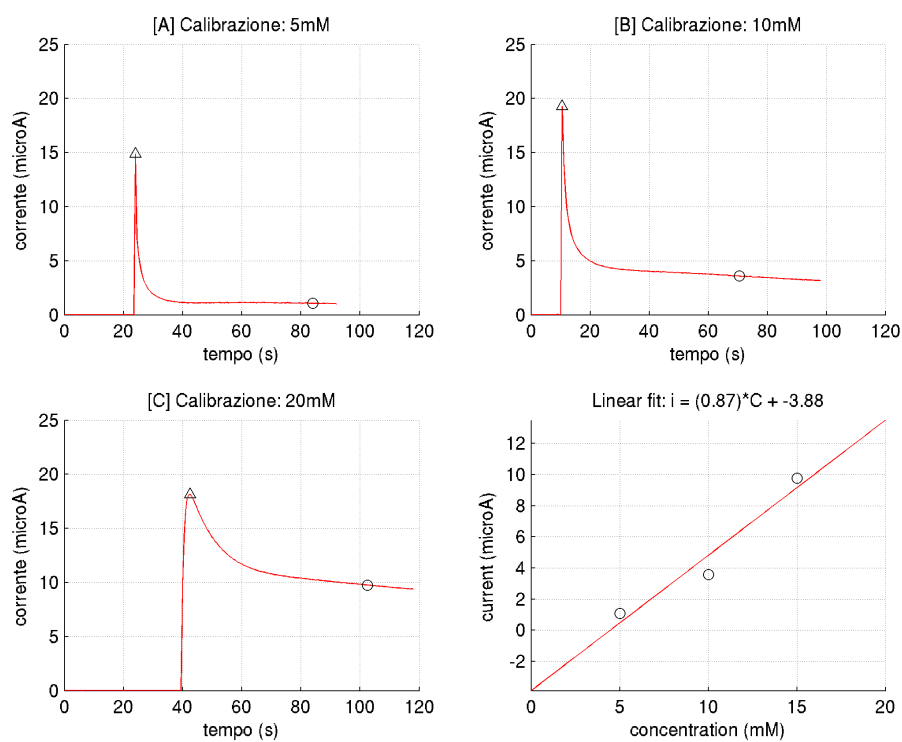


Figura 3: I tre segnali letti ai capi del trasduttore ($[A]=5\text{mM}$, $[B]=10\text{mM}$, $[C]=20\text{mM}$) e la curva di calibrazione ottenuta. Il triangolino sui grafici indica il massimo rilevato sul segnale. I cerchietto indica il punto di presunta stabilità. I punti di presunta stabilità e le rispettive concentrazioni, sono riportati sul grafico della curva di calibrazione.

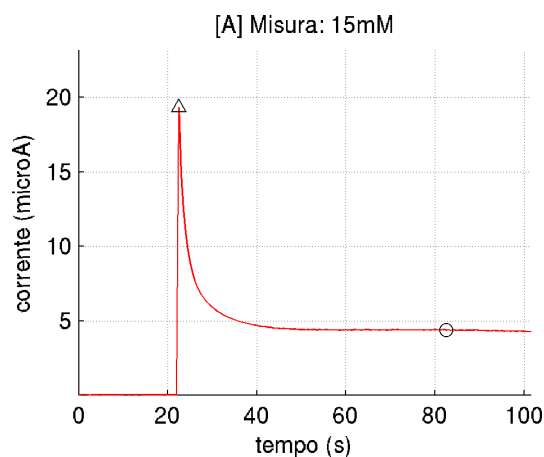


Figura 4: Segnale letto ai capi del trasduttore: H₂O-glucosio - 15mM.

Concentrazione	Massimo	Stabilità
15mM	19.327 μ A (22.5s)	4.370 μ A (82.5s)

Tabella 2: Valori caratteristici: misura - H₂O-glucosio.

Quanto esplicitato in Tab. 2 porta ad una prima considerazione: il valore in corrente rilevato è pari a 4.370 μ A. Tale valore non era tra quelli aspettati poichè non compreso tra quelli corrispondenti alle soluzioni di 10 e 20mM. Questo valore, secondo la retta di calibrazione, dovrebbe corrispondere ad una concentrazione di 9.4986mM.

3.1.3 Conclusioni

I risultati riportati nella precedente sezione non possono essere considerati corretti. In Sez. 3.1.1 sono stati riportati i singoli passi che hanno portato a determinare la curva di calibrazione (2). Trascurando momentaneamente il coefficiente angolare m , consideriamo il valore di c , ovvero la continua. Questo valore è negativo. Il valore in corrente ricavato a concentrazione C pari a zero risulta anch'esso negativo. Quest'ultima considerazione porta a dover ipotizzare un'errore nel processo di misura. Dalle specifiche del sensore utilizzato, ci si aspettava un valore di c poco maggiore a zero. Quanto appena

riportato, giustifica⁶ anche la discrepanza riscontrata in Sez. 3.1.2.

⁶L'errore (rispetto ai 15 mM noti) potrebbe essere inoltre causato dal tempo di riposo che non è stato sufficiente al raggiungimento dell'equilibrio. In soluzione, infatti, come sappiamo sono presenti due forme chiuse di glucosio, α e β , in percentuali diverse. All'equilibrio rispettivamente al 36% e 64%. Questa seconda conclusione sembra perdere in significatività essendo errato il procedimento di misura a monte. Sembra quindi inopportuno cercare una giustificazione a valle.

3.2 Soluzione H₂O-succo di frutta

3.2.1 Calibrazione

Nella seconda parte dell'esercitazione abbiamo utilizzato succo di frutta alla pera, contenente sciroppo di glucosio diluito 25 volte per rimanere all'interno del range di misura. Si vuole misurare la concentrazione di glucosio γ_S . A tal scopo sono state preparate tre nuove soluzioni:

1. succo ed H₂O-glucosio 0mM: concentrazione $\frac{1}{2}\gamma_S$
2. succo ed H₂O-glucosio 10mM: concentrazione $\frac{1}{2}\gamma_S + 5\text{mM}$
3. succo ed H₂O-glucosio 20mM: concentrazione $\frac{1}{2}\gamma_S + 10\text{mM}$

Le misure effettuate sulle nuove soluzioni hanno portato ad i risultati riportati in Tab. 3. La curva di calibrazione ottenuta (4) è rappresentata in Fig. 5, mentre i valori significativi sono riportati in Tab. 3.

$$\begin{cases} i(C) = m_S C + c_S \\ m_S = 0.5786 \\ c_S = 1.4027, \end{cases} \quad (4)$$

Concentrazione	Massimo	Stabilità
$\frac{1}{2}\gamma_S$	8.014 μA (22s)	1.550 μA (82s)
$\frac{1}{2}\gamma_S + 5\text{mM}$	19.952 μA (28.5s)	4.001 μA (88.5s)
$\frac{1}{2}\gamma_S + 10\text{mM}$	20.953 μA (27s)	7.336 μA (87s)

Tabella 3: Valori caratteristici: calibrazione - H₂O-succo di frutta.

Le rette (2) e (4) differiscono tra loro, come riportato in (5).

$$\begin{cases} m_S \neq m \\ c_S \neq c. \end{cases} \quad (5)$$

Lo scopo di questa fase consiste nell'evidenziare il fenomeno definito come effetto matrice: a concentrazioni maggiori di glucosio corrisponde una corrente minore o maggiore di quella aspettata. Questo non è dovuto alla presenza

di altri zuccheri poichè l'enzima GOD risulta essere molto selettivo rispetto molecole come la vitamina C che interagiscono con enzima e mediatore, falsando la misura. Imponendo che a concentrazione C pari a zero corrisponda una corrente nulla dovrei ottenere una retta passante per l'origine, ed in contributo dovuto all'effetto matrice dovrebbe portare a quanto formulato in (6).

$$\begin{cases} m_S = m \\ c_S \neq c. \end{cases} \quad (6)$$

Il fatto che i vincoli espressi in (5) non vengono rispettati in (6) porta a pensare che il processo di misura non sia avvenuto in maniera corretta. Si potrebbero trarre conclusioni circa la trascurabilità o meno dell'effetto matrice se quanto espresso in (6) fosse unito alla correttezza della prima curva di calibrazione ottenuta (2).

3.2.2 Risultati

Facendo coincidere la concentrazione incognita con l'origine è possibile ricavare il valore della concentrazione per la quale $i(C)$ si annulla:

$$\begin{cases} i(C) = m_S C + c_S = 0 \text{ quindi } |C| = 2.4243 \\ m_S = 0.5786 \\ c_S = 1.4027. \end{cases} \quad (7)$$

Ottenuto il valore di C , si possono ricavare:

$$\begin{cases} |C| = 2.4243 \\ \gamma_S = 2|C| = 4.8486 \\ \tilde{\gamma}_S = 25\gamma_S = 121.215 \end{cases} \quad (8)$$

Dai punti, distanziati tra loro di 5mM, interpolando si ricava una retta con pendenza 0.5786. Conseguentemente a questa traslazione, l'intercetta della retta con l'asse delle ascisse corrisponde a $-\frac{1}{2}\gamma_S$. La concentrazione nel succo è quindi $\hat{\gamma}_S = 120\text{mM}$. Infine, la quantità di β -D-Glucosio presente in soluzione è pari a 2.16g.

3.2.3 Conclusioni

La rette di calibrazione (2) e (4) non soddisfano i vincoli espressi in (5). In Sez. 3.1.3 sono state riportate alcune considerazioni circa gli errori computi

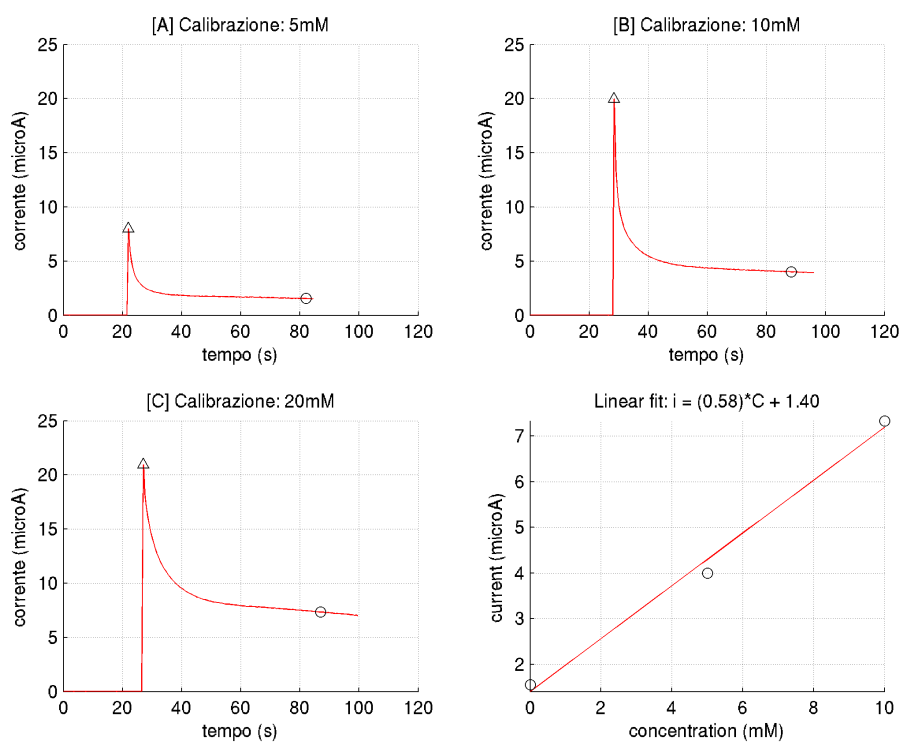


Figura 5: I tre segnali letti ai capi del trasduttore ([A] = succo + 0mM, [B]= succo + 10mM, [C] = succo + 20mM) e la curva di calibrazione ottenuta.

durante il processo di misura. Essendo impossibile determinare a posteriori se la seconda curva di calibrazione risulti corretta o meno, è difficile trarre le opportune conclusioni circa l'efficacia delle misure e soprattutto circa la presenza o meno dell'effetto matrice.

4 Conclusioni

La corrente misurata ai capi del trasduttore durante la misura della soluzione a 15mM differisce da quella prevista. Le conseguenze di tale osservazione sono state precedentemente affrontate in Sez. 3.1.3 e 3.2.3. In questa sede si ritiene utile fornire un'ulteriore motivazione a supporto dell'errore riscontrato. Quest'ultima riguarda l'errore percentuale sulle cifre decimali ritenute significative. Per la soluzione a 15mM sono state utilizzate due cifre decimali per approssimare la quantità di glucosio da diluire in acqua, mentre per la soluzione madre non si sono utilizzate cifre decimali, dal momento in cui la quantità di glucosio diluita è di gran lunga maggiore. Un'ulteriore considerazione merita di essere riportata in quest'ultima Sezione della relazione. In riferimento a Sez. 2.1 e 2.2 si ricorda che l'unico analita considerato durante il processo di misura è il β -D-Glucosio che tuttavia rappresenta il 64% del glucosio presente in soluzione. Per quanto riguarda le misure riguardanti la prima soluzione, è facile risalire alla reale concentrazione di glucosio utilizzando una semplice proporzione. Si assume la precedente considerazione valida anche nel caso del succo di frutta al fine ultimo di non invalidare quanto riportato in questa relazione.

Riferimenti bibliografici

- [1] Wikipedia.org, "*Glucose*". <http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose>, Maggio 2005.
- [2] Nelson, Lehninger, Freeman, "*Principles of Biochemistry*", 4th Edition. W. H. Freeman & Co, 2004.