

INDICE

RIASSUNTO	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Il Diabete Mellito (DM)	6
<i>1.1.1 Un po' di storia</i>	6
<i>1.1.2 Fisiopatologia</i>	7
<i>1.1.3 Epidemiologia</i>	12
<i>1.1.4 Le complicanze del diabete</i>	13
2. LE ANALISI DI LABORATORIO	15
3. IL MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA	23
<i>3.1 L'importanza del monitoraggio della glicemia</i>	23
<i>3.2 Il monitoraggio attraverso i dispositivi pungidito</i>	28
<i>3.3 Metodi per il continuous glucose monitoring (CGH)</i>	31
4. TECNOLOGIE INNOVATIVE PER IL MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA	34
<i>4.1 Metodi di rilevazione non invasivi</i>	34
<i>4.2 Tecnologie di monitoraggio del glucosio non invasive</i>	35
4.3 Sviluppo recenti dei sensori di glucosio su diversi fluidi biologici.....	41
5. CONCLUSIONI	53
BIBLIOGRAFIA	56
<i>Sitografia</i>	68

RIASSUNTO

Il diabete mellito è una condizione caratterizzata da alti livelli di glucosio nel sangue, e sta diventando una delle principali cause di morte nel mondo. Sebbene, non esista ancora una cura o prevenzione, se monitorato e trattato con la corretta terapia, le complicanze possono essere contrastate e attenuate migliorando le condizioni di vita dei soggetti affetti da questa patologia. Nell'ultimo decennio, gli studiosi stanno vagliando la possibilità di sostituire al sangue nuovi biofluidi, come, sudore, urina, fluidi interstiziali, lacrime e saliva oltre che al respiro, per il dosaggio dei livelli di glucosio. Inoltre, risulta in crescita un enorme interesse verso nuove tecnologie che sfruttano l'utilizzo di biosensori in grado di operare una rilevazione continua del livello di glucosio attraverso metodi non invasivi affinché quest'analisi risulti meno impegnativa per il paziente mantenendo allo stesso tempo le medesime prestazioni a livello di sicurezza, attendibilità e accuratezza dei glucometri tradizionali. I biosensori, infatti, hanno potenzialmente rivoluzionato il campo biomedico; la loro portabilità, economicità e facilità d'uso hanno fatto crescere rapidamente la ricerca e lo sviluppo per questi dispositivi. Nonostante gli enormi passi avanti, sono ancora necessari numerosi studi clinici per raggiungere l'obiettivo.

1.INTRODUZIONE

Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 2016 il diabete è stata la settima causa di morte a livello mondiale. Purtroppo, le morti premature dovute al diabete sono in costante aumento. Nel 2019 il numero totale di decessi a livello globale ha raggiunto circa 1,6 milioni. L'OMS ha anche sottolineato che il diabete è alla base di numerose complicanze a livello salutare, come cecità, insufficienza renale, infarti, ictus e intorpidimento. L'incidenza del diabete a livello globale è aumentata costantemente, passando da 12 milioni a 20 milioni in un arco di 20 anni. Tale aumento ha determinato il raddoppiamento del numero di morti globali, passando da 0,8 milioni (nel 2000) a 1,6 milioni (nel 2019) negli ultimi due decenni (Figura 1). Inoltre, è stato riscontrato che scelte di vita poco salutari e problematiche ereditarie hanno un impatto diretto sull'insorgenza del diabete. Infatti, siccome l'incidenza globale, la prevalenza, i decessi e gli anni di vita aggiustati per disabilità associati al diabete erano rispettivamente 22,9 milioni, 476,0 milioni, 1,37 milioni e 67,9 milioni nel 2017, si prevede che raggiungeranno rispettivamente 26,6 milioni, 570,9 milioni, 1,59 milioni e 79,3 milioni entro il 2025.

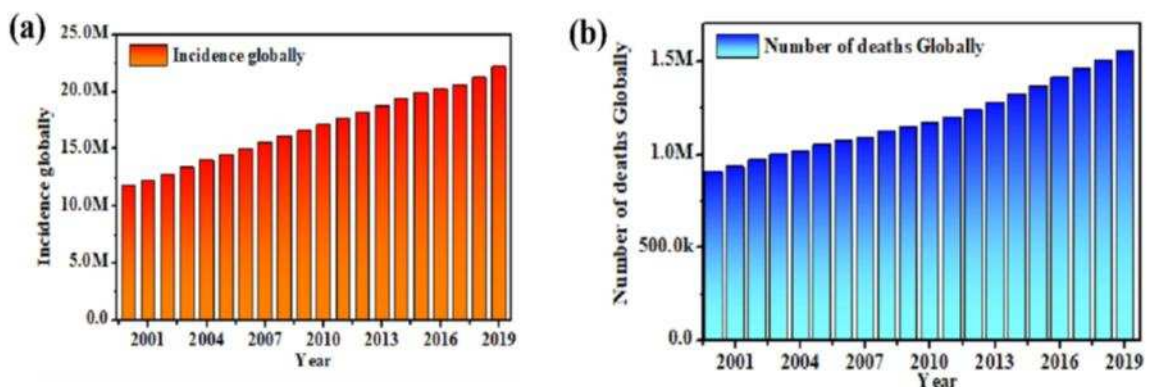


figura 1. incidenza (a) e mortalità globale (b) dal 2000 (Vundrala S.R., et al. 2022)

L'Asia è l'area più gravemente colpita, rappresentando il 58,72% dell'incidenza globale totale, seguita dall'America con il 18,16%, quindi Europa e Africa con rispettivamente il 13,29% e il 9,84% (Figura 2).

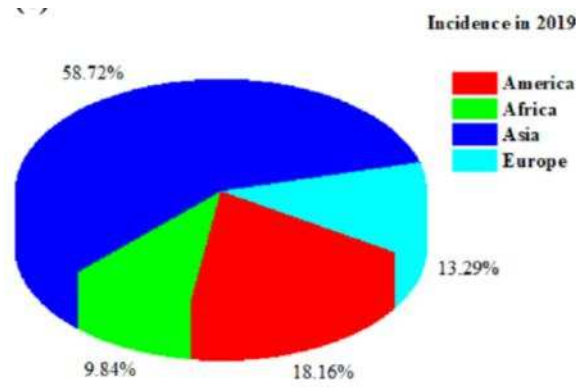


figura 2. distribuzione dell'incidenza del diabete per continente nel 2019(Vundrala S.R., et al. 2022)

L'Italia rispecchia l'andamento globale del diabete: in base ai dati ISTAT del 2022 si stima una prevalenza del diabete pari al 6% (oltre i 3,5 milioni di persone), con un trend in lento aumento negli ultimi anni (Figura 3).

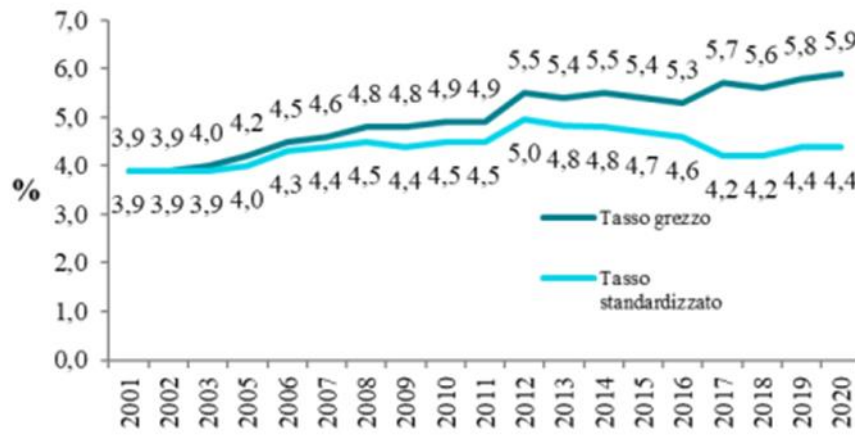


figura 3. prevalenza del diabete in Italia dal 2001 al 2020 (www.epicentro.iss.it)

Il diabete ha un elevato impatto economico, sia a livello statale che individuale. In Italia comporta una spesa totale di circa 20 miliardi di euro tra costi diretti e indiretti. Per il singolo paziente le spese mediche ammontano a circa 2700 euro all'anno per ospedalizzazioni e complicanze, ma possono

superare i 6000 euro includendo visite specialistiche, assistenza e farmaci. Complessivamente, il diabete assorbe l'11% della spesa sanitaria nazionale e incide per il 15-20% sul reddito annuo di una persona. Malgrado i progressi tecnologici, questi costi sono rimasti immutati negli ultimi 15 anni.

(www.who.int; Lin X, et al. 2020; ghdx.healthdata.org; www.marketdataforecast.com; Hoyer A, et al. 2018; Ballotari P, et al. 2017; Grimaccia F, et al. 2014; Bonora E, et al.2021; www.epicentro.iss.it; www.salute.gov.it)

1.1 Il Diabete Mellito (DM)

1.1.1 Un po' di storia

Il termine diabete fu coniato per la prima volta dal medico Areteo di Cappadocia, vissuto ad Alessandria nel I secolo d.C. In greco antico il verbo *διαβαίνειν* significa “attraversare”, alludendo al fluire dell’acqua, poiché il sintomo più evidente è l’eccessiva produzione di urina. Nel Medioevo la parola fu “latinizzata” in *diabētēs*, il cui significato è sifone. Il termine mellito (dal latino *mel*: miele, dolce) è stato aggiunto dall’inglese Thomas Willis nel 1675 per il fatto che il sangue e le urine dei pazienti diabetici avevano un sapore dolce, caratteristica peraltro conosciuta da lungo tempo dagli Indiani, Greci, Cinesi ed Egiziani. Nel Medioevo in tutta Europa i medici facevano infatti diagnosi di DM assaggiando letteralmente le urine dei pazienti. Il chimico e fisico inglese William Hyde Wollaston nel 1811 lavorò ad un progetto che prevedeva di dimostrare la presenza di glucosio nel siero sanguigno dei diabetici. Tuttavia, a causa dei mezzi limitati di rilevamento a sua disposizione, l’esperimento non riuscì e bisognerà aspettare il 1957, anno in cui si inizia la sperimentazione del Destrotest AMES (prima striscia reattiva per la determinazione del glucosio su sangue capillare). Fino ad allora il dosaggio del glucosio avveniva su urina (glicosuria) sfruttando metodi principalmente colorimetrici. Nel 1967 viene realizzato il primo strumento per la determinazione della glicemia su una goccia di sangue capillare. È la premessa per l’avvio dell’autocontrollo glicemico domiciliare. (www.diabete.net; www.siditalia.it; www.epicentro.iss.it)

1.1.2 Fisiopatologia

Il diabete mellito non è una singola malattia ma piuttosto un gruppo di disordini metabolici accumulati dal dato clinico dell'iperglicemia (concentrazione di glucosio nel sangue superiore a 200 mg/dl in un prelievo eseguito random). Attualmente colpisce oltre 400 milioni di persone in tutto il mondo ed è causa di elevata mortalità. Si manifesta quando il pancreas endocrino non produce abbastanza insulina o quando l'organismo non riesce ad utilizzare efficientemente l'insulina prodotta o nella maggior parte dei casi entrambi. L'iperglicemia cronica e la conseguente disregolazione metabolica possono essere associate ad alterazioni secondarie a carico soprattutto di reni, occhi, nervi e vasi sanguigni. Il metabolismo del glucosio risulta da tre meccanismi perfettamente interconnessi: produzione del glucosio nel fegato (gluconeogenesi); captazione e utilizzazione del glucosio da parte dei tessuti periferici; regolazione dei livelli di glucosio da parte dell'insulina e di ormoni controregolatori, come il glucagone. Sull'omeostasi del glucosio, infatti, insulina e glucagone, prodotti entrambi dal pancreas endocrino (rispettivamente dalle cellule β e cellule α delle isole del Langerhans), hanno effetti regolatori opposti. Durante una condizione di digiuno breve, tipo quello notturno, i livelli bassi dell'insulina ed elevati del glucagone, favoriscono la gluconeogenesi e la glicogenolisi (degradazione del glicogeno) epatica, riducendo la sintesi di glicogeno e di conseguenza impedendo l'ipoglicemia. Il glucagone svolge quindi un'azione iperglicemizzante. In questo modo, i livelli di glucosio nel plasma a digiuno sono stabiliti essenzialmente dalla produzione di glucosio epatico. Nel digiuno prolungato, invece, esso deriva sì dal fegato, ma in parte anche dal rene (dove si attiva la gluconeogenesi). Dopo un pasto, i livelli di insulina si innalzano e quelli del glucagone scendono, in risposta al carico di glucosio. L'aumento dei livelli di glucosio nel sangue (glicemia), infatti, stimola le cellule β pancreatiche a rilasciare subito insulina per poi aumentarne la produzione. La secrezione di insulina è bifasica: inizialmente si verifica un picco precoce, dovuto alla secrezione dell'insulina preformata e a seguire un picco tardivo, dovuto alla sintesi ex novo dell'ormone. L'insulina favorisce la captazione e l'utilizzo del glucosio nei tessuti periferici, garantendo così una

maggior fonte di energia grazie alla sua azione ipoglicemizzante. La captazione del glucosio circolante da parte dei vari tessuti è mediata da recettori di membrana (*GLUT-GLucose Transporter*) che ne permettono la diffusione facilitata. Esistono varie isoforme di questi trasportatori, indicate con numeri crescenti (*GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4, ecc.*), che differiscono in base al tessuto interessato, affinità per il glucosio e funzioni specifiche. I più importanti sono il *GLUT-2*, che funge da “sensore della glicemia” nelle cellule β del pancreas che sintetizzano e secernono insulina, e il *GLUT-4* (Figura 4), espresso nelle cellule dei tessuti insulino-dipendenti (tessuto adiposo e muscolare). In condizioni normali, questo carrier si trova in sede citoplasmatica e la sua traslocazione sulla membrana cellulare viene stimolata dal legame dell'insulina con il recettore di membrana. Questo processo facilita lo spostamento del glucosio dal liquido interstiziale all'interno della cellula. Quando la concentrazione ematica del glucosio si normalizza e l'insulina viene eliminata, le molecole di *GLUT-4* vengono lentamente rimosse dalla membrana plasmatica e sequestrate per endocitosi in vescicole intracellulari. La captazione del glucosio in altri tessuti periferici, soprattutto a livello del sistema nervoso, è invece insulino-indipendente.

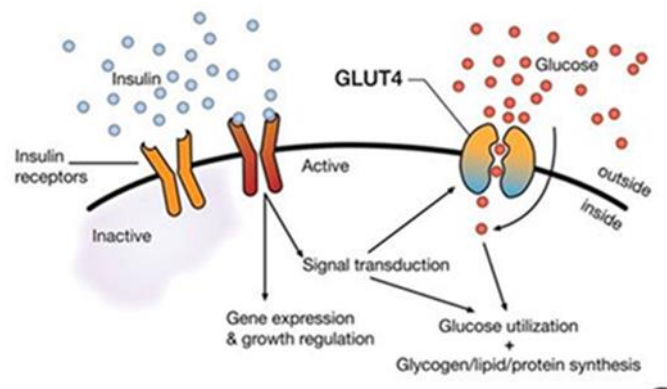


Figura 4. Ricaptazione del glucosio mediata dalla GLUT-4 insulina-dipendente (www.traininglab-italia.com)

Oltre all'insulina e al glucagone è importante ricordare che all'omeostasi glicemica partecipano anche altre tipologie di ormoni ad azione iperglicemizzante: l'ormone della crescita (GH), l'adrenalina e i glucocorticoidi. Il GH promuove la lipolisi e la liberazione di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo e inibisce l'assunzione di glucosio da parte delle cellule e la sintesi di acidi grassi a partire da carboidrati. In situazioni di stress si ha invece la secrezione di adrenalina (midollare del surrene) e di cortisolo (corticale del surrene) che stimolano l'aumento della glicemia. Nonostante tutte le varianti del diabete mellito condividano l'elevato livello di glucosio nel sangue, i processi patogenetici che sono alla base dello sviluppo dell'iperglicemia differiscono tra loro in modo significativo. La maggior parte dei casi di diabete rientra in una delle seguenti ampie classi:

Il Diabete di tipo 1

È una malattia autoimmune caratterizzata dalla distruzione delle isole del Langerhans mediata da cellule effettrici immunitarie che producono autoanticorpi che reagiscono contro gli antigeni endogeni delle cellule β (generalmente anti-insulina, ICA, ma anche anticorpi diretti contro l'acido glutammico decarbossilasi, anti-GAD, l'insulina e la tirosin fosfatasi IA-2), a cui consegue un'insulino-deficienza assoluta. In genere compare nell'infanzia, si esplicita nella pubertà ed evolve con l'età, ma la malattia in realtà può svilupparsi a qualunque età, compresa quella adulta; pertanto, la definizione di "diabete giovanile" è considerata obsoleta. Tramite la ricerca degli autoanticorpi verso gli antigeni beta-cellulari in soggetti adulti considerati colpiti dal diabete di tipo 2, infatti, è possibile determinare che in realtà sono affetti da diabete di tipo 1. Questo tipo di diabete viene qualche volta definito diabete autoimmune latente dell'adulto (*Latent Autoimmune Diabetes in Adult, LADA*). La maggior parte dei pazienti affetti da diabete di tipo 1 dipende dall'insulina per la sopravvivenza; senza insulina possono sviluppare gravi conseguenze metaboliche come la chetoacidosi e il coma. Come per quasi tutte le malattie autoimmuni, la patogenesi del diabete di tipo

1 deriva da una combinazione di suscettibilità genetica legata a loci HLA e non HLA e fattori ambientali come le infezioni virali.

Il Diabete di tipo 2

È determinato dall'associazione tra una resistenza periferica all'azione dell'insulina e un'inadeguata risposta secretoria da parte delle cellule β del pancreas ("deficit relativo di insulina"). Si tratta di una malattia complessa, multifattoriale, dove i fattori ambientali, come la vita sedentaria e le abitudini scorrette, rivestono chiaramente un ruolo importante nella patogenesi della malattia, così come quelli genetici. Infatti, persone con un genitore affetto da diabete hanno un rischio del 38% di sviluppare la malattia nel corso della vita, che sale al 60% se ad avere il diabete risultano entrambi. La probabilità di sviluppare il diabete di tipo 2 aumenta con l'età (solitamente dopo i 30-40 anni), in presenza di obesità (circa l'80% delle persone affette da tipo 2 sono obese) e in mancanza di un'attività fisica regolare. Il diabete di tipo 2 rappresenta decisamente la forma di diabete più comune, con oltre l'80% di tutti i casi, ed è caratterizzato da gradi variabili di insulino-deficienza e insulino-resistenza. In genere nelle prime fasi la malattia è asintomatica o paucisintomatica, ostacolando di conseguenza l'identificazione dell'esordio, per cui in molti casi la diagnosi giunge tardivamente. Alcune volte risulta complicato riconoscere il diabete di tipo 1 dal diabete di tipo 2, soprattutto se quest'ultimo mostra dei caratteri atipici. Di fatto, molti pazienti affetti da questa forma di diabete perdono nel tempo la funzionalità delle cellule β e ciò comporta la necessità di una terapia insulinica per controllare i livelli di glucosio nel sangue. Il bisogno di una terapia insulinica di supporto, infatti, non rappresenta una discriminante tra le due forme. Anche il verificarsi di una condizione di chetoacidosi non costituisce un criterio inequivocabile a supporto della diagnosi di diabete di tipo 1. Pazienti con diabete di tipo 1 possono mostrare elementi fisiopatologici tipici del diabete di tipo 2, come manifestare sovrappeso e sviluppare un'insulino-resistenza, soprattutto coloro che presentano una storia familiare positiva per il tipo 2. Pertanto, quando in base ai soli criteri clinici la diagnosi di tipo

1 e tipo 2 è incerta, può invece essere decisiva la ricerca degli autoanticorpi verso gli antigeni beta-cellulari.

Il Diabete gestazionale

Consiste in una condizione “transitoria” di alterata tolleranza al glucosio, di grado e severità variabili, che si manifesta tipicamente durante il terzo trimestre di gravidanza e regredisce in genere dopo il parto. In questa fase il pancreas diviene incapace di sostenere l’insulino-resistenza creata dagli ormoni contro insulari maggiormente di origine placentare (estrogeni, prolattina, somatotropina corionica umana, cortisolo e progesterone) per effetto dell’aumento di consumo di substrati fondamentale per nutrire la madre e il feto. L’iperglicemia materna determina una stimolazione continua delle cellule β del pancreas endocrino, creando un effetto di iperinsulinismo nel feto. Alla nascita l’iperinsulinismo non è più compensato dalla iperglicemia materna e può essere responsabile di ipoglicemie anche molto gravi con possibili sequele neurologiche. Inoltre, l’iperinsulinemia provoca una deposizione di tessuto adiposo a livello dell’addome del bambino e per questo la circonferenza addominale del bambino misurata durante le ecografie sarà molto maggiore rispetto alla media. Un bambino grande, soprattutto se è un primo figlio, può rendere necessario ricorrere al parto cesareo o all’induzione del parto prima del termine della gravidanza, solitamente intorno alle 38 settimane.

(Pinhas-Hamiel O, et al. 2007; Herman MA, et al.2006; Youngren JF, et al. 2007; Jones EY, et al.2006; Park Y, et al.2007; Chistiakov, et al. 2008; Hviid A, et al.2004; Knip M, et al.2008; Taplin CE, et al.2008; Frayling TM, et al. 2007; Zeggini E, et al. 2008; Michael MD, et al.2000; Muoio DM et al.2008; Khan SE, et al.2006; Lyssenko V, et al. 2007; Castorino K, et al. 2011; ADA standard of Medical care in Diabetes 2018; Ahlqvist E, et al.2011; www.dri.hsr.it; www.issalute.it; www.traininglab-italia.com)

1.1.3 Epidemiologia

Il diabete è riscontrabile nelle gran parti delle popolazioni del mondo. Sebbene il diabete di tipo 1 contribuisca marginalmente alla prevalenza del diabete, la sua incidenza aumenta sia nei paesi più ricchi che quelli in via di sviluppo economico. Nei paesi ad elevato sviluppo economico equivale alla forma della malattia maggiormente riscontrata nella fascia più giovane della popolazione. Il diabete di tipo 2 rappresenta circa l'85-90% di tutte le forme di diabete nei paesi ricchi e presumibilmente queste cifre risultano maggiori nei paesi più poveri. Ad oggi il diabete di tipo 2 rappresenta un problema molto grave di salute pubblica. Attualmente la fascia 40-59 anni di età è quella che racchiude il maggior numero di persone colpite, contando ben 132 milioni di individui affetti. Ben oltre il 75% di questi vive in paesi a basso e medio reddito pro-capite. Inoltre, le ultime proiezioni preventivano che entro il 2030 ci saranno ben 188 milioni di soggetti colpiti nella fascia 40-59, più dell'80% dei quali nei paesi in via di sviluppo o recentemente sviluppati e che gli abitanti più colpiti saranno quelli delle aree urbane rispetto coloro che vivono nelle aree rurali. Infatti, numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato che senza un adeguato piano di prevenzione l'incidenza del diabete in entrambe le forme è destinata ad aumentare (Tabella 1).

Tabella 1. Diabete e intolleranza al glucosio: prevalenza e proiezioni 2010-2030

	2010	2030
Popolazione mondiale (miliardi)	7.0	8.4
Popolazione adulta (20-79 anni, miliardi)	4.3	5.6
Diabete ed intolleranza (20-79 anni)		
<i>Diabete</i>	6.6	7.8
Prevalenza globale %	285	472
Numero di soggetti con diabete (milioni)		
<i>Intolleranza</i>	7.9	8.4
Prevalenza globale %	344	472
Numero di soggetti con diabete (milioni)		

(www.salute.gov.it; www.dri.hsr.it; www.diabete.net; www.siditalia.it; www.epicentro.iss.it)

1.1.4 Le complicanze del diabete

Si possono suddividere in quelle a breve termine (o acute) e quelle croniche a lungo termine. Nel primo caso si fa riferimento alla chetoacidosi diabetica, grave complicanza del diabete di tipo 1 che tuttavia può insorgere anche in quello di tipo 2 anche se non così frequentemente e non in modo così marcato. In questi pazienti permane una ben accentuata insufficienza insulinica. L'azione dell'adrenalina inibisce ogni azione residua dell'insulina e stimola la secrezione di glucagone. Quindi la carenza di insulina, unita ad un eccesso di glucagone, da una parte riduce l'utilizzo del glucosio periferico e aumenta la gluconeogenesi, andando a peggiorare in definitiva l'iperglicemia, che può arrivare a 500-700 mg/dl e causare, inoltre, diuresi osmotica, generando disidratazione caratteristica della patologia. Dall'altra, la carenza di insulina combinata ad un eccesso di glucagone, stimola l'attivazione del meccanismo chetogenico caratterizzato da un'umentata mobilizzazione degli acidi grassi dal tessuto adiposo che, convertiti in acetil-CoA nel fegato, porta ad una rapida formazione dei corpi chetonici, che tendono ad accumularsi nei tessuti periferici i quali non riescono in definitiva a smaltirli. Ciò causa una condizione di chetonemia e chetonuria. Infine, la disidratazione compromette la loro escrezione urinaria causando così una chetoacidosi metabolica sistemica che, insieme alla severa deplezione del volume plasmatico, possono causare una compromissione del sistema nervoso centrale. I sintomi principali della chetoacidosi sono rappresentati da: poliuria, polidipsia, stanchezza, debolezza e affaticamento ingiustificati, respiro pesante, difficoltoso e ansimante, possibile perdita di peso. L'instaurarsi di tale situazione può portare al coma e quindi alla morte se non viene attuato un tempestivo trattamento. Nonostante i differenti meccanismi patogenetici tra le due forme di diabete, sono le complicanze a lungo termine, piuttosto che quelle acute, le responsabili degli elevati tassi di morbilità e di mortalità. Nella maggior parte dei casi queste complicanze compaiono circa 15-20 anni dopo l'esordio della iperglicemia. Complicanze cardiovascolari come l'infarto del miocardio, l'insufficienza renale (la nefropatia diabetica) così come la neuropatia diabetica rappresentano le cause più comuni di mortalità nei diabetici di vecchia data. Inoltre, questi pazienti sono gravati da

una aumentata suscettibilità alle infezioni della cute, alla tubercolosi alla polmonite e alla pleionefrite. Negli ultimi anni l'aumentata sedentarietà e le cattive abitudini alimentari hanno collaborato al fine di favorire l'ascesa concomitante del diabete e dell'obesità nel mondo. Purtroppo, questa "epidemia" di diabete ha coinvolto anche l'infanzia a causa del "cibo spazzatura" e della scarsa abitudine all'attività fisica.

(Pinhas-Hamiel O, et al. 2007; Michael MD et al.2000; Kahn SE, et al. 2006; Agostini M, et al. 2006; Yamamoto Y, et al.2001; Clarke M, et al. 2007; Tomlinson DR, et al. 2008; Boyle Pj, et al. 2007; Zimmet P, et al. 2001; Despres JP, et al. 2006; Pi-Sunyer X, et al. 2007; www.salute.gov.it; www.dri.hsr.it; www.diabete.net; www.siditalia.it; www.epicentro.iss.it)

2. LE ANALISI DI LABORATORIO

La diagnosi preliminare di diabete mellito implica l'esecuzione di tre test di laboratorio: valutazione della glicemia a digiuno (IFG), test da carico orale di glucosio (*Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) e dosaggio dell'emoglobina glicata (HbA1c). In conformità con le più aggiornate evidenze scientifiche e linee guida approvate a livello internazionale, i criteri diagnostici alla base sono:

- sintomi clinici compatibili con il diabete (polidipsia, poliuria, perdita di peso e disturbi del visus) e una glicemia casuale ≥ 200 mg/dl;
- glicemia a digiuno (assenza di assunzione calorica nelle ultime 8 ore) ≥ 126 mg/dl che suggerisce il sospetto di Alterata glicemia a digiuno (IFG);
- glicemia dopo due ore dalla curva da carico >200 mg/dl;
- HbA1c $\geq 6,5\%$;

In assenza di una indubbia iperglicemia, questi criteri devono essere rivalutati ripetendo i test nei giorni successivi. I valori del glucosio ematico sono normalmente mantenuti in un range molto contenuto, di solito tra i 70 e i 120 mg/dl, e in genere hanno una distribuzione continua. Individui con glicemia a digiuno inferiore a 110 mg/dl o a 140 mg/dl dopo un'OGTT, sono considerati euglicemici. Tuttavia, chi ha una glicemia a digiuno maggiore di 110 mg/dl ma inferiore a 126 mg/dl o valori di OGTT superiori a 140 mg/dl ma inferiori a 200 mg/dl, mostra una ridotta tolleranza al glucosio ovvero un "prediabete". Questi soggetti hanno un rischio elevato di sviluppare nel tempo il diabete conclamato e un 5-10% per anno sfocia in un diabete mellito.

La misurazione della glicemia

Si tratta di un tipo di indagine molto richiesta in laboratorio che tuttavia presenta delle criticità. Il glucosio è considerato una molecola semplice ma non lo è altrettanto quando si parla della sua quantificazione. Infatti, si stima che circa il 40% degli strumenti impiegati per questo tipo di analisi presentino una “distorsione” della valutazione dei dati rispetto al metodo di riferimento, che causa una potenziale non corretta classificazione del 12% dei pazienti. Questo perché la gestione preanalitica del campione necessita di particolari accortezze. Ogni ora nel sangue intero la glicemia si riduce di circa 10 mg/dl per via della glicolisi. Quindi il campione deve essere raccolto in provette contenenti fluoruro di sodio (NaF) che, oltre a fungere da anticoagulante, agisce da antiglicolitico, stabilizzando i livelli di glucosio. Inoltre, è importante che il siero o il plasma siano separati il prima possibile (entro 1 ora) dalle cellule. In genere il glucosio si dosa con metodi enzimatici su plasma o siero, principalmente attraverso questi due saggi spettrofotometrici.

Nel *METODO DELLA GLUCOSIO OSSIDASI-PEROSSIDASI*, il glucosio viene ossidato dall'enzima glucosio ossidasi (GOD), in presenza di ossigeno ed acqua, ad acido gluconico e acqua ossigenata, che viene poi determinata quantitativamente mediante l'aggiunta di perossidasi (POD) e di un cromogeno che nel corso della reazione viene ossidato, con formazione di un composto colorato la cui quantità è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nel campione (Figura 5). Ad esempio, la O-dianisidina ossidata assorbe la luce a 540 nm (piena regione visibile) quindi l'*assorbanza* a 540 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nel campione. Si tratta di un saggio ottico accoppiato, dove alla reazione “primaria” segue una seconda reazione detta “indicatrice” che utilizza uno dei prodotti della prima.

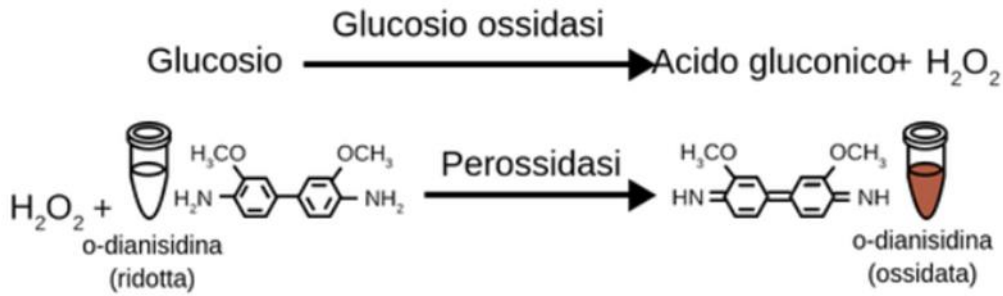


figura 5. metodo della glucosio-ossidasi / perossidasi per il dosaggio del glucosio (www.theory.labster.com)

Nel METODO DELLA ESOCINASI-GUCOSIO 6-FOSFATO DEIDROGENASI, invece, il glucosio viene fosforilato e deidrogenato per mezzo di due reazioni accoppiate. Durante l'ossidazione il NAD(P)⁺ viene ridotto a NAD(P)H, con aumento di assorbanza a 340 nm (Figura 6).

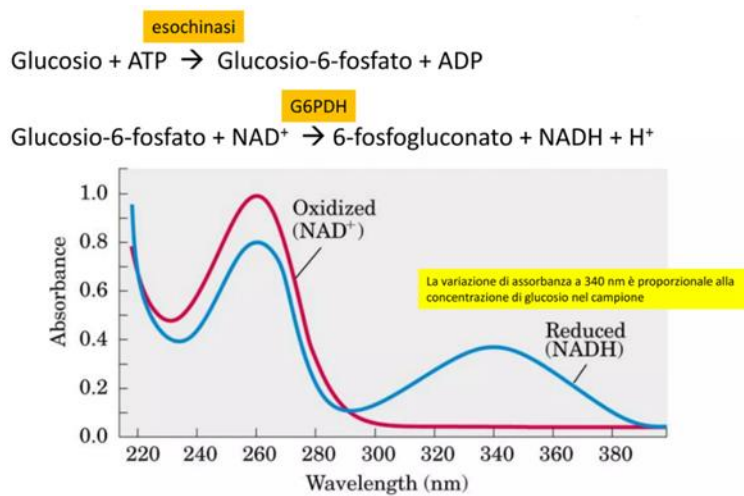


Figura 6. Metodo della esochinasi-G6PDH per il dosaggio del glucosio nel sangue (Lehninger Principle of Biochemistry, 2008)

Tale aumento è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente in soluzione.

In entrambe le metodiche, per ottenere informazioni relative alla quantità di glucosio presente nel campione, si applica la *legge di Lambert-Beer*, che descrive i fenomeni di assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche. Si tratta di una relazione empirica che correla la quantità di luce assorbita (*assorbanza*, A) da un materiale, alla concentrazione del materiale che viene attraversato dalla stessa. L'assorbanza è correlata alla frazione di energia radiante assorbita dal campione mediante la formula:

$$A = \epsilon \times d \times C$$

dove ϵ è il coefficiente di estinzione molare ($\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), d è il cammino ottico della soluzione (cm) e la C è la concentrazione del soluto (mM).

La procedura prevede che, attraverso l'utilizzo di concentrazioni note della sostanza in esame, ovvero del glucosio (standard), si allestisca una *retta di taratura*. Le misure del segnale degli standards (A) vengono diagrammate per produrre una retta di calibrazione del segnale in funzione della concentrazione nota dell'analita (C) (Figura 7). È importante che gli standard vengano scelti in modo che la concentrazione incognita cada nell'intervallo di concentrazione degli standard utilizzati.

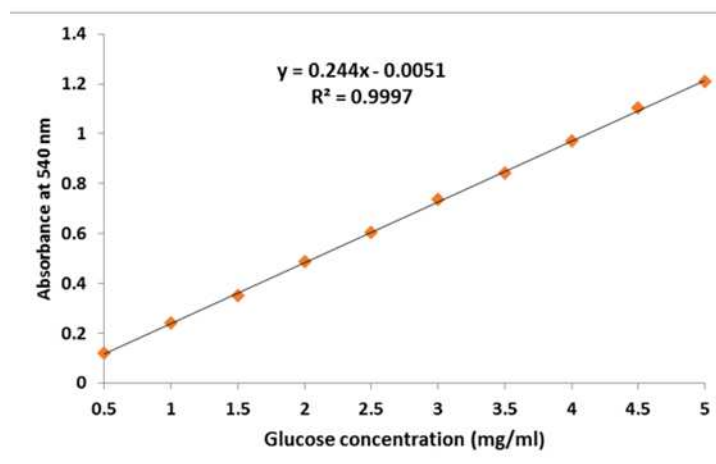


Figura 7. Esempio di retta di taratura (www.researchgate.net)

Allestita la retta di taratura, si procede con la misura dell'assorbanza del campione in esame e, attraverso l'interpolazione con la retta di taratura, si risale alla sua concentrazione (Figura 8).

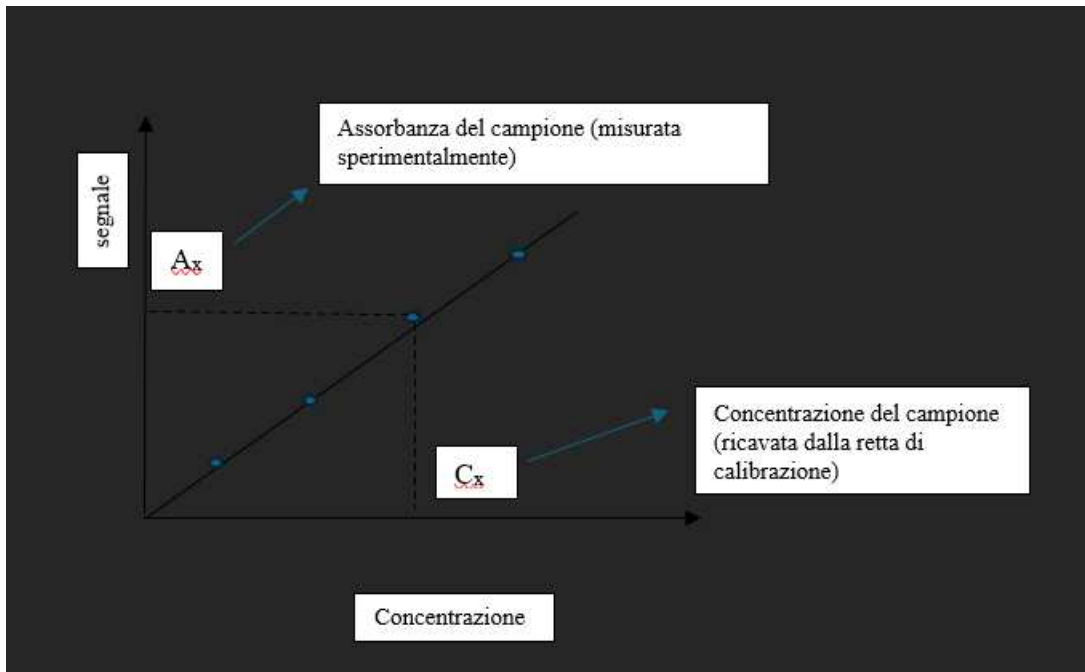


Figura 8. Utilizzo retta di taratura per risalire alla concentrazione del campione

L' OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*)

Se il disturbo è troppo lieve o in fase iniziale non è rivelabile con la semplice determinazione della glicemia a digiuno, quindi si valuta il comportamento del tasso di glucosio ematico sotto particolari stimoli (Curva glicemica) che mettano in evidenza eventuali limitazioni funzionali dei meccanismi della regolazione glicemica. Si tratta di un fisiologico e semplice test da un punto di vista strumentale, che permette di misurare le variazioni nel tempo della glicemia dopo la somministrazione di glucosio per via orale. Il paziente deve presentarsi a digiuno e senza aver fumato. Durante lo svolgimento del test deve rimanere seduto e non deve fumare nè mangiare. Nei tre giorni antecedenti la prova deve

aver seguito una dieta normale. L'esame consiste nel prelevamento di un campione di sangue a digiuno (glicemia basale) seguito dalla somministrazione di 75 g di glucosio (si parla infatti di OGTT-75) disciolti in 300 ml di acqua. I campioni di sangue vengono prelevati dopo 30, 60 e 120 minuti e su di essi si esegue la determinazione della glicemia (e della insulinemia). Dopo 2 ore, si analizzano anche le urine per valutare la presenza di glicosuria.

Il dosaggio dell'emoglobina glicata (HbA1c)

La misura della percentuale (rispetto al totale) di HbA1c consente di effettuare una stima della quantità di glucosio presente nel sangue (glicemia) negli ultimi 2-3 mesi. L'emoglobina è una proteina deputata al trasporto dell'ossigeno presente all'interno dei globuli rossi (RBC). Ne esistono vari tipi, ma la forma predominante, circa il 95-98%, è l'emoglobina A. Il glucosio, circolando nel sangue, in parte si lega spontaneamente all'emoglobina A. Le molecole di emoglobina legate al glucosio prendono il nome di emoglobine glicate (Figura 9). Se l'iperglicemia persiste, la reazione diventa irreversibile e l'emoglobina resta "glicata" sino alla morte del globulo rosso (120 giorni). La forma prevalente di emoglobina glicata è definita come HbA1c. L'HbA1c è prodotta quotidianamente ed è eliminata lentamente dal sangue man mano che i globuli rossi più vecchi muoiono e vengono rimpiazzati da quelli più giovani che ne contengono pochissima.

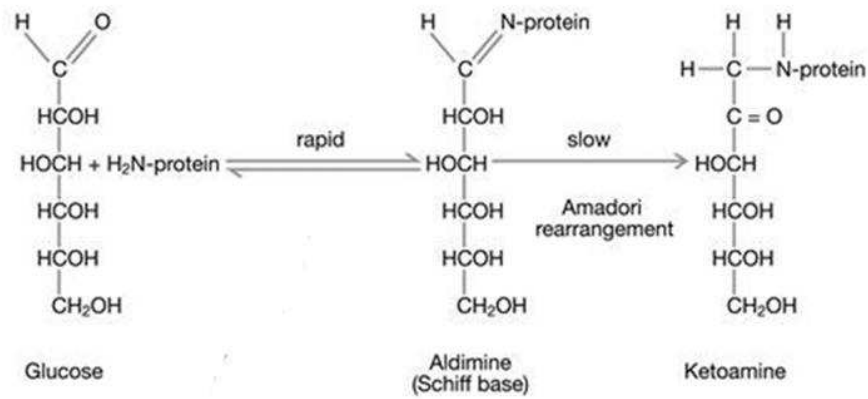


Figura 9. L'emoglobina glicata è il prodotto di una reazione non enzimatica di condensazione tra il gruppo aldeidico del glucosio e il gruppo amminico n-terminale delle catene β della Hb. l'entità della glicazione è proporzionale alla concentrazione di glucosio ed al tempo di contatto. (Rolf Hinzmann, et al. 2012)

Se da una parte il dosaggio dell'HbA1c non risenta di condizioni acute (stress, malattie) che interferiscono sui livelli glicemici, presenti una maggiore stabilità pre-analitica e una variabilità intra- e inter-individuale inferiore, così come un indice maggiormente correlato al rischio di complicanze croniche, dall'altra si tratta di un tipo di analisi più costoso e in caso di anemie emolitiche, emoglobinopatie, ecc. potrebbe rappresentare un indice non affidabile.

Per dosare l'emoglobina glicata in generale si utilizzano o la cromatografia o metodi immunochimici. Ad esempio, si utilizza una *Cromatografia a scambio ionico*, che impiega scambiatori cationici debolmente acidi su cui viene fatto adsorbire il campione di sangue emolisato (Figura 10).

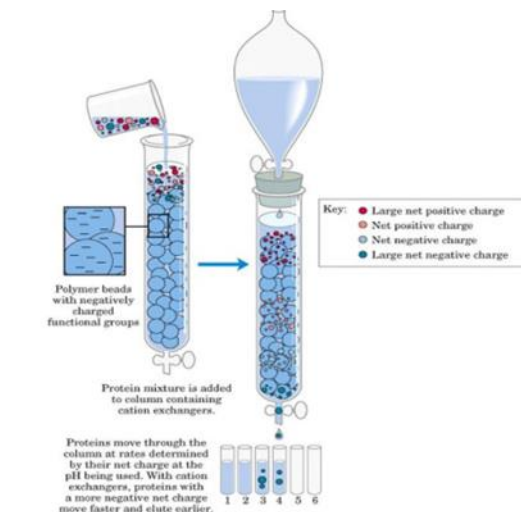


figura 10. Cromatografia a scambio ionico, che impiega scambiatori cationici debolmente acidi su cui viene fatto adsorbire il campione (Lehninger Principle of Biochemistry, 2004).

A completamento dell'indagine diagnostica si esegue anche una valutazione della glicosuria. Tale esame viene eseguito sulle urine con un metodo semiquantitativo. Tuttavia, non tutti i pazienti con glicosuria hanno il diabete. In gravidanza, infatti, si può avere un aumento della filtrazione glomerulare e il glucosio filtrato può non venire completamente riassorbito a livello del tubulo renale. Inoltre, la glicosuria può essere riscontrata anche in presenza di tubulopatie. Pertanto, un paziente glicosurico deve essere sottoposto ad un test su siero (HbA1c, glicemia a digiuno, glicemia dopo due ore dal carico orale) per la diagnosi di diabete.

(Sacks BE, et al.2011; Ragnar H, et al.2010; Mosca A. et al. 2008; Lehninger, Principle of Biochemistry 2004/8; Diabetes care vol.33, 2010; Diabetes care, 2018;41 sul.1; Rolf Hinzmann, et al. 2012; McCowen K, et al. 2013; www.researchgate.net; www.theory.labster.com)

3 IL MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA

3.1. L'importanza del monitoraggio del glucosio: i sensori di glucosio

Sebbene il diabete non abbia una cura definitiva, il costante e rapido monitoraggio della glicemia, insieme ad una terapia farmacologica appropriata, possono mitigare le complicanze e migliorare la qualità della vita delle persone affette da questa patologia. Il mantenimento del controllo glicemico è una fase chiave nella cura del diabete di tipo 1 e di tipo 2. Circa il 4-5% delle ospedalizzazioni totali riguarda solamente i pazienti diabetici. Si tratta, tuttavia, di una percentuale che negli ultimi anni sta diminuendo costantemente, nonostante il verificarsi di contro di un progressivo aumento di persone diabetiche (Figura 11). Tutto ciò grazie alla ricerca ed ai progressi tecnologici in questo campo, che consentono ai pazienti di monitorare in modo autonomo ed in tempo reale la glicemia e di intervenire, se necessario.

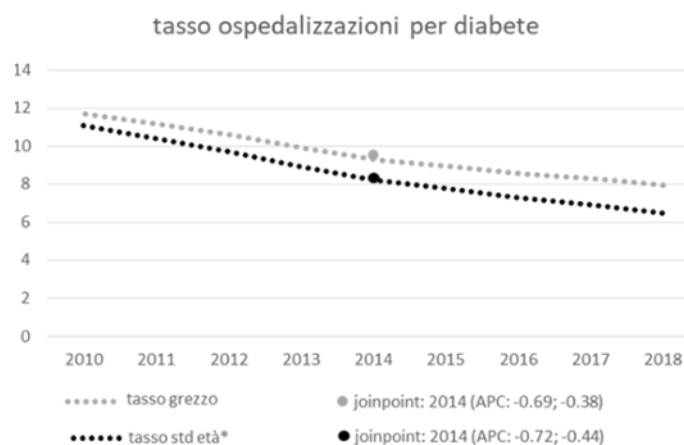


figura 11. Tasso di ospedalizzazione in Italia per diabete (www.epicentro.iss.it)

Il glucosio può essere misurato su una goccia di sangue capillare mediante il glucometro tradizionale o nell'interstizio tramite sistemi per il monitoraggio in continuo del glucosio (Continuous Glucose Monitoring, CGM). In entrambi i casi gli strumenti sfruttano la tecnologia dei biosensori.

Con biosensore si intende un dispositivo analitico che incorpora un elemento sensibile di origine biologica, integrato o accoppiato a un trasduttore fisico-chimico. Di conseguenza, a differenza del "sensore" il biosensore è funzionalizzato sulla sua superficie con molecole specifiche per la rilevazione di una data molecola. Un biosensore di glucosio, infatti, spesso esplicita la propria funzione attraverso l'enzima glucosio ossidasi, un enzima che catalizza le reazioni che coinvolgono il glucosio, necessaria per ricavarne il valore. Un biosensore di glucosio fa parte dei biosensori enzimatici e amperometrici, che sfruttano, cioè, le reazioni enzimatiche altamente specifiche per realizzare il rilevamento. Generalmente questo tipo di sensore è costituito da tre tipologie di elettrodi (Figura 12):

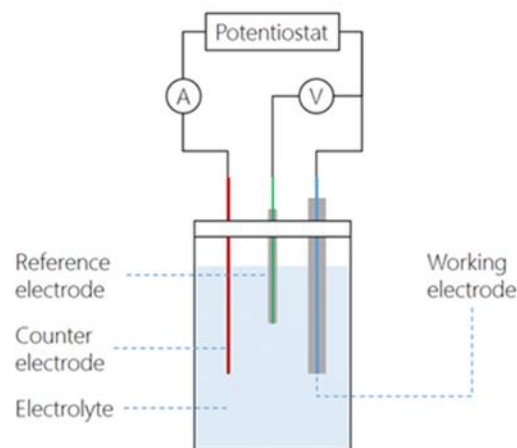


Figura 12. Esempio di biosensore (www.biomedicalcue.it)

1. Working electrode, ovvero l'elettrodo di misura, attivato con l'enzima selezionato e sensibile quindi alla misura. Qui ha luogo la reazione di cella elettrochimica;
2. Reference electrode o elettrodo di riferimento, che comanda il potenziale elettrico in riferimento al quale gli altri potenziali possono essere misurati;
3. Counter electrode cioè il controelettrodo. Il suo unico scopo è quello di garantire il flusso di corrente attraverso la cella. Viene utilizzato per assicurare che la corrente non circoli attraverso l'elettrodo di riferimento in modo da non influenzarne il potenziale.

Il metodo di rilevamento che utilizza l'enzima glucosio-ossidasi garantisce un'ottima specificità per il glucosio rispetto ad altri analiti (marcatori) presenti nei fluidi biologici e rappresenta una tecnologia consolidata, utilizzata da molti anni. Malgrado ciò, presenta delle limitazioni prestazionali come un'elevata sensibilità nei confronti delle concrezioni proteiche che si accumulano sull'elettrodo con conseguente perdita della funzionalità, perdita transitoria della sensibilità al glucosio a causa di una carenza di ossigeno provocata da compressione fisica nel sito di impianto del biosensore che si verifica comunemente durante il sonno; inoltre in alcuni sensori, possono verificarsi interferenze chimiche dovute a composti elettroattivi di uso comune, come la vitamina C (l'acido ascorbico) e il paracetamolo. Un'altra criticità è rappresentata dalla natura stessa dell'enzima, molecola instabile e tendente a degradarsi che rende in questo modo il sensore operativo solo per brevi periodi. Oltre a ciò, molto importanti sono le condizioni ambientali in cui il sensore opera. L'ossigeno ambientale, il pH, la temperatura e l'umidità possono infatti compromettere la funzionalità del biosensore.

Queste problematiche hanno stimolato lo sviluppo di *sensori non enzimatici* (Figura 13) che non utilizzano enzimi nel processo di rilevazione del glucosio.

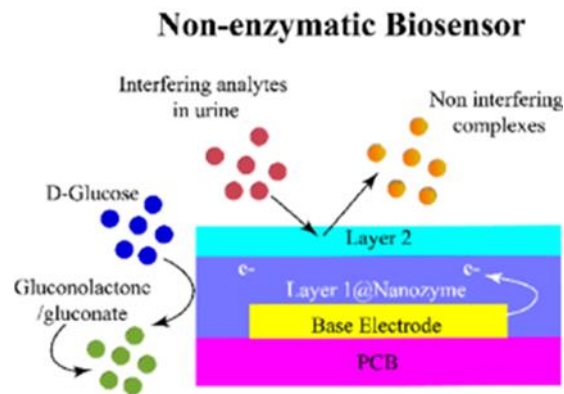
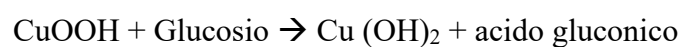
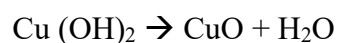
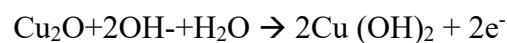


Figura 13. Esempio di funzionamento di un sensore non enzimatico (Vundrala SR, et al. 2022)

In questo caso il meccanismo alla base della selettività è rappresentato, ad esempio, da una nanoparticella di ossido metallico, che funge da elettrocatalizzatore nel trasferimento di elettroni durante la reazione di ossidazione del glucosio.

Le nanoparticelle, come Cu₂O, reagiscono con il glucosio trasferendo elettroni secondo le seguenti reazioni:



Il primo passaggio prevede l'ossidazione del Cu (I), nella molecola di Cu₂O, in rame (II) che a sua volta in presenza di una soluzione alcalina, viene ulteriormente ossidato a Cu (III). Al termine di queste trasformazioni (quarta reazione), il glucosio viene ossidato ad acido gluconico in seguito alla riduzione del Cu (II) e Cu (III) che vengono di nuovo ridotti a Cu (I) con Cu (III) che agisce come mediatore del trasferimento elettronico. In questo tipo di sensori la selettività è legata alla specifica reazione di ossidazione del glucosio.

(Wang J, 2008; DeHannis A, et al. 2020; Hima Z. et al. 2022; Hassan M, 2021; Zhou D.-L., et al. 2014; Casella I.G., et al. 1996; Vundrala SR, et al. 2022; www.biomedicalcue.it; www.epicentro.iss.it)

3.2 Il monitoraggio attraverso dispositivi pungidito

I primi glucometri (misuratori di glucosio nel sangue) sono stati introdotti nel 1969. È la premessa per l'avvio dell'autocontrollo glicemico domiciliare. Da quel momento in poi i pazienti sono stati in grado di monitorare i livelli di zucchero nel sangue in modo autonomo. Questi strumenti venivano detti: *Self Monitoring of Blood Glucose* (SMBG). Sono ancora disponibili sul mercato e funzionano mediante un ago pungi-dito, che esegue una piccola puntura capillare per prelevare una goccia di sangue dal polpastrello (Figura 14).



Figura 14. Dispositivo pungidito (Vundrala S, et al. 2022)

Il livello di glicemia viene, quindi, misurato attraverso uno strumento analitico che utilizza delle sonde che sfruttano il metodo enzimatico *Yellow Springs Instrument (YSI)*. Ciascuna sonda è dotata di una membrana a tre strati che contiene un enzima immobilizzato nello strato intermedio (Figura 15).

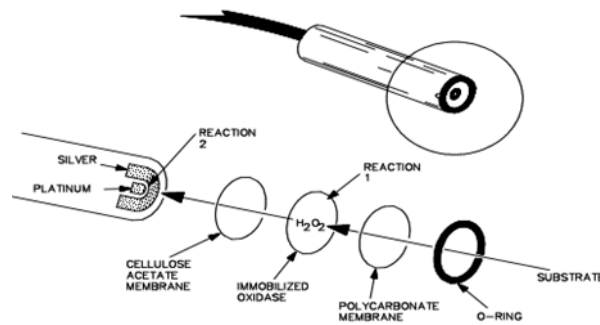
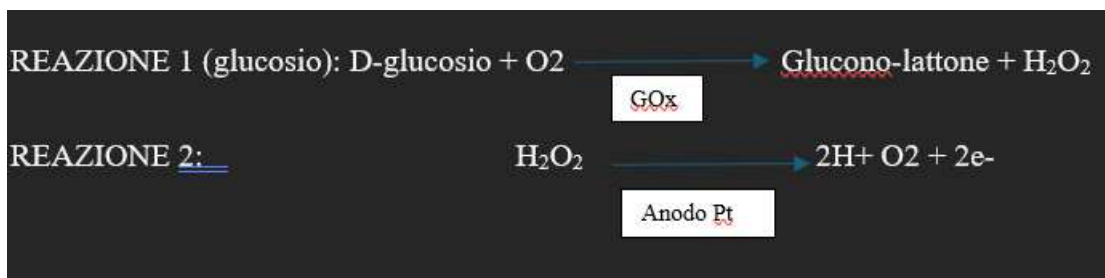


Figura 15. Sensore a membrana con enzima immobilizzato (A. Brix et al. 2011)

La parte anteriore della sonda, coperta dalla membrana, è situata in una camera di misura piena di soluzione di lavaggio nella quale viene iniettato un campione. Parte del substrato si diffonde attraverso la membrana.

Quando entra in contatto con l'enzima glucosio ossidasi (GO_x) immobilizzato, viene ossidato velocemente generando perossido di ossigeno (Reazione 1). Il perossido di idrogeno (H_2O_2) a sua volta, viene ossidato sull'anodo di platino, producendo elettroni (Reazione 2). Il flusso di elettroni è direttamente proporzionale alla concentrazione di H_2O_2 e, quindi, alla concentrazione del substrato.



I glucometri mostrano livelli di accuratezza elevati, grazie ai quali è possibile operare con sicurezza opportune scelte terapeutiche volte all'ottimizzazione del compenso glicemico. Tuttavia, la glicemia capillare presenta una serie di svantaggi, tra cui la necessità di pungersi più volte al giorno, risultando quindi un metodo doloroso, ripetuto più volte nell'arco della giornata, che può facilmente causare infezioni, soprattutto nei pazienti anziani. Manca inoltre di informazioni in una finestra temporale un po' più ampia, non permettendo quindi di calcolare eventi di ipo e iperglicemia. Il valore della glicemia, infatti, non segue un andamento lineare, ma va incontro a significative variazioni nel corso della giornata, condizionato da diversi fattori come l'attività fisica, l'alimentazione e la terapia farmacologica (Figura 16).

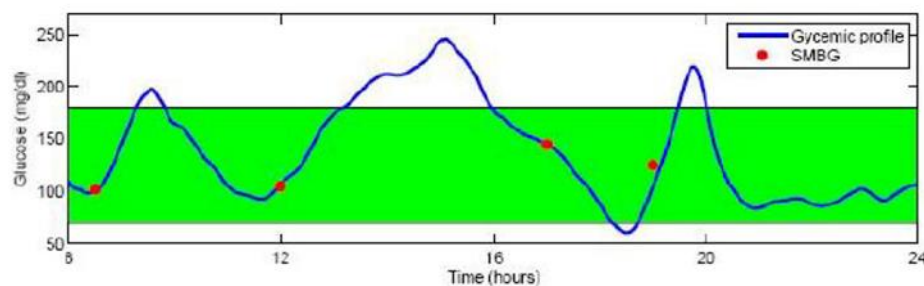


figura 16. Limitazione SMBG. La linea blu descrive l'andamento della glicemia in una persona, la banda verde rappresenta l'intervallo di normalità (70-180mg/dl) e i punti rossi rappresentano le singole misure. appare subito evidente come i tre picchi di iperglicemia (alle 9.30,13,19.30) e quello di ipoglicemia (alle ore 18.30) non siano stati rilevati strumentalmente dal paziente. (www.siditalia.it)

Queste problematiche hanno reso necessario lo sviluppo di sistemi di rilevamento e monitoraggio avanzati e affidabili che fossero capaci quindi di eseguire misurazioni più frequenti (in maniera quasi continua) da un lato, limitando allo stesso tempo l'invasività della procedura.

(Zhao M, et al. 2020; Foxdal P, et al. 1992; Stork A.D.M., et al. 2005; Teymourian H, et al. 2020; Wu P, et al. 2010; Hu. S, et al. 2008; Gao W, et al. 2021; A. Brix et al. 2011; Vundrala S, et al. 2022; www.siditalia.it)

3.3 Metodi per il continuous glucose monitoring (CGM)

I metodi CGM sono caratterizzati, principalmente, dall'utilizzo di biosensori. Sul piano tecnologico si possono distinguere metodi minimamente invasivi e metodi non invasivi. Nel primo caso la glicemia viene dosata non più nel sangue ma nel liquido interstiziale, ovvero quel compartimento ove diffondono tutte le sostanze nutritive, incluso il glucosio, compreso tra il sistema vascolare e la cellula. In condizioni stabili la glicemia interstiziale è in equilibrio con quella plasmatica. Durante le fluttuazioni dinamiche dei livelli glicemici è fondamentale che passi un certo periodo di tempo affinché si raggiunga l'equilibrio tra i due compartimenti. Questo lasso di tempo viene chiamato lag time e può variare dai 5 ai 20 min. È di fondamentale importanza tenerne conto nei momenti di maggior variabilità glicemica. Questi dispositivi sono sostanzialmente costituiti da tre parti funzionali diverse rappresentate da un sensore, un trasmettitore e un ricevitore. Il sensore (Figura 17), localizzato a livello sottocutaneo (braccio o addome), valuta quantitativamente la concentrazione di glucosio attraverso degli elettrodi amperometrici enzimatici in cui avviene la reazione di ossido/riduzione mediata dall'enzima glucosio ossidasi (GO_x), che produce un movimento di elettroni (corrente elettrica), che viene misurato dall'amperometro. La misura di tale corrente è proporzionale alla concentrazione del glucosio presente.

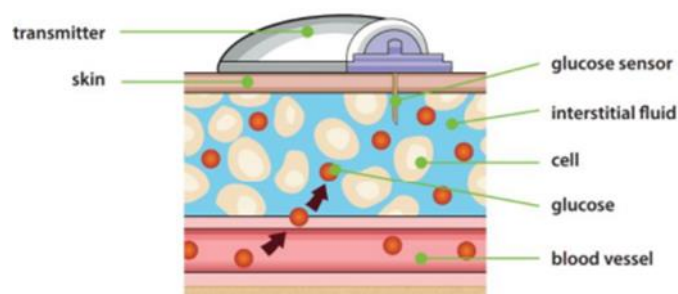


Figura 17. Sensore inserito nel sottocute (www.neosensory.com)

Per quanto riguarda il trasmettitore, questo risulta collegato al sensore ed è in grado di memorizzare e analizzare i dati rilevati da esso e di trasmetterli al ricevitore tramite una tecnologia wireless oppure attraverso un cavo di collegamento USB. Il ricevitore è uno strumento in genere portatile dotato di display (cellulare o smartwatch). In questo modo il paziente può visionare i livelli di glucosio in tempo reale e avere informazioni su direzione, ampiezza, durata, frequenza e cause delle fluttuazioni della glicemia. Tuttavia, l'utilizzo di questi dispositivi non risparmia il paziente dal sottoporsi a prelievo di sangue dal polpastrello. Affinché il dosaggio della glicemia interstiziale rispecchi quello effettuato sul sangue capillare è necessario, infatti, calibrare il dispositivo, introducendo la lettura della glicemia esatta visualizzata sul glucometro. Attraverso il processo di calibrazione viene indicato a quale livello di glicemia corrisponde la corrente misurata; per questo è necessario ripetere l'operazione di calibrazione almeno due volte al giorno, quando la glicemia è stabile da almeno 15-20 min e di conseguenza senza frecce di tendenza (prima di mangiare, prima di andare a dormire, prima di fare sport); inoltre, il sensore deve essere cambiato una volta a settimana. Sebbene quelli di ultima generazione prevedano il cambio di sensore ogni 14 giorni e una riduzione delle calibrazioni, l'attenzione dei ricercatori è rivolta a quelli che vengono definiti “metodi non invasivi di rilevamento della glicemia”, caratterizzati dall'utilizzo dei biofluidi, quali lacrime, urina, saliva e sudore come substrati per il dosaggio glicemico. Tali metodi sono ancora in fase di sviluppo perché, nonostante siano stati già ottenuti dei buoni risultati, necessitano ancora di tempo per la loro messa a punto. Si tratta di dispositivi che utilizzano metodiche differenti a seconda del substrato (biofluido) per il quale sono stati progettati. I fattori più importanti che devono essere ottimizzati l'applicazione sulla popolazione affetta da diabete sono la linearità (cioè, l'intervallo in cui la curva di calibrazione è lineare), la specificità o selettività (per evitare interferenze di altri substrati presenti nel campione), la sensibilità (risposta dell'elettrodo alla concentrazione dell'analita) e il tempo di risposta (tempo per ottenere il 95% della risposta).

(Chen C, et al. 2013; Bruen D, et al. 2017; Hima Z, et al. 2022; Ting S, et al. 2016; Villena G.W., et al. 2019; Fathi E, et al. 2013; Sun M, et al. 2022; Ghosh R, et al. 2020; Laha S. et al. 2022)

4 TECNOLOGIE INNOVATIVE PER IL MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA

4.1 Metodi di rilevazione non invasivi

Le maggiori criticità riscontrate durante l'elaborazione di sensori di glucosio non invasivi, riguardano la misurazione indiretta e la necessità imprescindibile di calibrazione, la semplicità d'uso e l'applicabilità nell'uso quotidiano; tutti fattori che possono compromettere l'accuratezza del dosaggio. Lo sviluppo di queste nuove tecnologie deve risolvere, quindi, numerose problematiche relative alla scarsa specificità e sensibilità al glucosio dovuta alla natura indiretta di questo tipo di approccio non invasivo che causa un ridotto rapporto segnale-rumore in quanto i fattori fisiologici ed elementi esterni possono influenzare la validità dei parametri misurati; ritardo fisiologico tra la glicemia nel sangue e quella tissutale, condizionato dalle peculiarità specifiche di ciascun individuo e dal sito di rilevazione, nonché la calibrazione del dispositivo. Questo passaggio, fondamentale per l'accuratezza dell'analisi, nella gran parte dei dispositivi non invasivi che si stanno studiando è lungo e complesso. È caratterizzato dall'unione di ancora numerose misurazioni invasive/ minimamente invasive, che purtroppo ne riducono la sfruttabilità aumentando di fatto il disagio per il paziente. Un'altra complicazione è rappresentata dalla varietà dell'utenza verso cui sono destinati. La maggior parte delle metodologie non invasive per rilevare indirettamente il glucosio risentono della variabilità legata ai caratteri anatomici dell'individuo. Ciò è riscontrabile particolarmente nelle tecniche ottiche dove la trasmissione della luce a ciascuna lunghezza d'onda è in funzione dello spessore, del colore e della struttura di pelle, ossa e sangue. Non di minor importanza risulta l'applicabilità nell'uso quotidiano individuale. È fondamentale che i dispositivi di monitoraggio siano facili sia da usare che da gestire nella quotidianità, affinché ci sia un utilizzo frequente e corretto da parte dei diversi utenti. (Avner G, et al Laha S, et al. 2022; Golsanamlou Z, et al. 2021; Villena G. W., et al. 2019; Vundrala S.R, et al. 2022)

4.2 Tecniche di monitoraggio del glucosio non invasive

Recentemente, sono stati sviluppati una moltitudine di principi e tecniche per il monitoraggio non invasivo del glucosio sia nel campo della ricerca accademica che in quella industriale. Tra questi, quattro principali metodi sono stati ampiamente studiati e documentati. Ognuno di loro si distingue in base al metodo di rilevamento del glucosio (figura 18)

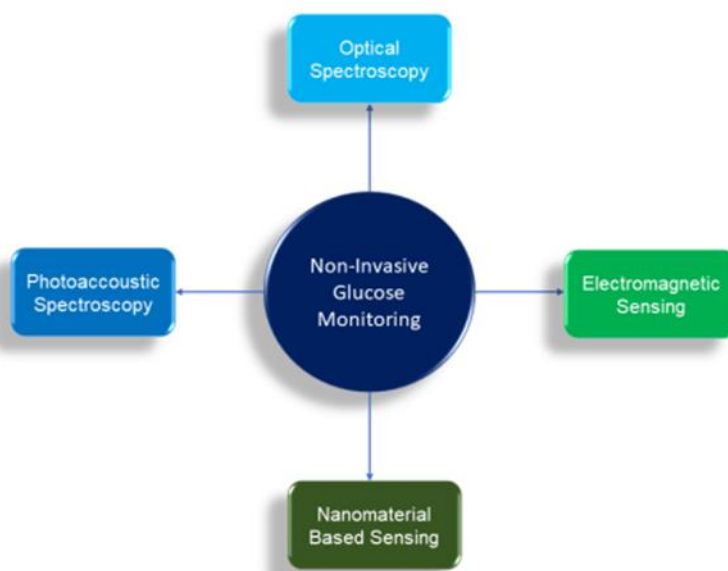


Figura 18. I quattro tipi di tecniche differenti per il monitoraggio del glucosio (Soumyasanta L, et al. 2022)

La modalità ottica

I sistemi di rilevamento ottici si basano sulle proprietà di riflessione, assorbimento e diffusione della luce quando attraversa tessuti e liquidi biologici. Solitamente, i sensori ottici sfruttano la misurazione di una quantità fisica di luce che poi viene successivamente convertita in un segnale elettronico misurabile. Un sensore ottico è costituito, infatti, da una o più sorgenti luminose, un rilevatore e un trasduttore responsabile della conversione. Applicati al monitoraggio glicemico, lo scopo dei metodi ottici è quello di misurare la risposta specifica delle onde elettromagnetiche con diverse lunghezze

d'onda alla diversa concentrazione del glucosio nell'organismo, per stimarne indirettamente il livello nel sangue. Di conseguenza tali metodi sfruttano le proprietà ottiche sia del glucosio che dei tessuti attraversati, a loro volta condizionate dal relativo contenuto di glucosio. Nel momento in cui un fascio di luce attraversa un corpo questo si trova ad interagire con gli atomi delle molecole biologiche che lo costituiscono. Di conseguenza la luce può essere assorbita, trasmessa o diffusa; ciò dipenderà dalla lunghezza d'onda della luce incidente nonché dalla struttura e dalle proprietà ottiche del tessuto (come l'indice di rifrazione relativo, il coefficiente di assorbimento e il coefficiente di diffusione). Le tecniche che sfruttano i metodi ottici lavorano a lunghezze d'onda non dannose per l'organismo (bande dell'infrarosso e dell'visibile dello spettro elettromagnetico) e non necessitano di un contatto diretto con i biofluidi evitando così qualsiasi forma di estrazione e perforazione che potrebbero danneggiare i tessuti risultando a tutti gli effetti tecniche di monitoraggio non invasive. A questa categoria appartengono i sensori a fluorescenza (FRET). Questa tipologia di sensore sfrutta il fenomeno della fluorescenza che si verifica quando una luce incidente, di una lunghezza d'onda compresa tra 200 e 800 nm, viene assorbita da una molecola o una struttura con proprietà fluorescenti, promuovendo un elettrone ad un livello energetico più elevato che ritornando allo stato fondamentale riemette parte della luce assorbita sottoforma di fluorescenza mentre la restante parte viene rilasciata sottoforma di calore o vibrazione. Le molecole fluorescenti chiamate fluorofori, inoltre, sono in grado di rilasciare parte dell'energia ad un fluoroforo adiacente generando un processo di trasferimento di energia da una molecola ad uno stato eccitato ad una allo stato fondamentale che va sotto il nome di Trasferimento di energia di risonanza, *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET). Si tratta di un fenomeno di soppressione della fluorescenza poiché il fluoroforo accettore trattiene l'energia rilasciata da un altro fluoroforo eccitato vicino, limitandone la quantità di luce emessa. I sensori basati sulla fluorescenza sono composti da uno specifico recettore per l'analita rappresentato dal glucosio, un fluoroforo donatore e un fluoroforo accettore posizionati entrambi nelle vicinanze l'uno dell'altro. Il legame del glucosio al recettore induce in quest'ultimo un cambiamento conformazionale tale da causare l'allontanamento dei due fluorofori con conseguente diminuzione degli elettroni trasferiti al

fluoroforo accettore. In questo modo si assiste ad una diminuzione del FRET e al conseguente aumento della luce fluorescente emessa. Al contrario, in mancanza di glucosio, i due fluorofori risultano essere sufficientemente vicini da mantenere una situazione di trasferimento di energia in risonanza caratterizzato da una elevata FRET con assenza di luce fluorescente emessa. Il dosaggio del glucosio avviene attraverso la valutazione quantitativa della variazione della fluorescenza del fluoroforo donatore associato alla molecola del recettore del glucosio (Figura 19).

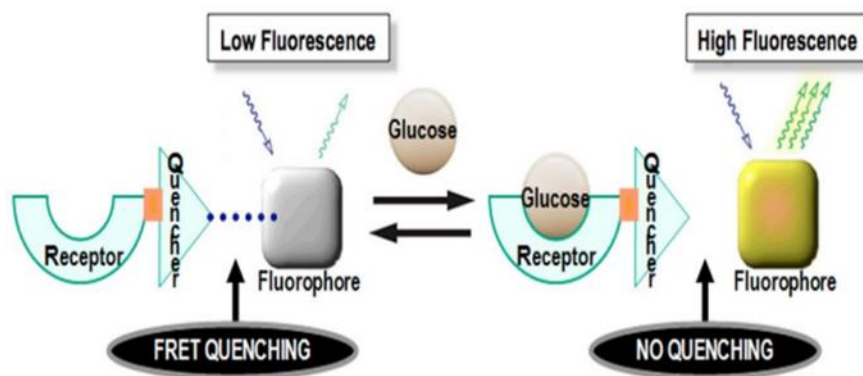


Figura 19. Meccanismo dei sensori a fluorescenza (Paramparambath, S. et al. 2022)

La modalità elettromagnetica

Questo metodo si basa sulla misurazione della permittività relativa (costante dielettrica) mediante diverse tecniche di rilevamento elettromagnetico che operano ad una specifica frequenza di microonde o onde millimetriche. Attraverso l'impiego di queste tecniche viene fornito il valore della concentrazione di glucosio nel sangue sotto forma di potenza elettrica, consentendo un monitoraggio efficace del glucosio nel sangue. Infatti, sappiamo che il sangue umano è composto per il 55% da plasma, e il plasma sanguigno è costituito per circa il 90% da acqua. Poiché l'acqua presenta un'elevata polarizzazione è caratterizzato da un'elevata permittività relativa. Al contrario, il glucosio ha una permittività relativa inferiore, essendo meno polarizzato. Pertanto, un aumento o una

diminuzione della concentrazione di glucosio nello stesso volume di campione di sangue riduce o aumenta rispettivamente la permittività relativa del plasma sanguigno. Il principio comune di misurazione di questi sensori si basa sull'interazione elettromagnetica tra il sensore e il materiale in esame. Vengono misurate le variazioni di ampiezza e/o fase nei parametri di scattering quando le proprietà dielettriche del mezzo cambiano. In altre parole, il rapporto tra le tensioni di ingresso e uscita, o tra le correnti, è proporzionale alla concentrazione di glucosio. È importante notare che le proprietà dielettriche del sangue vengono modificate in misura maggiore dai cambiamenti nei livelli di glucosio rispetto ai cambiamenti degli altri analiti presenti (Figura 20).

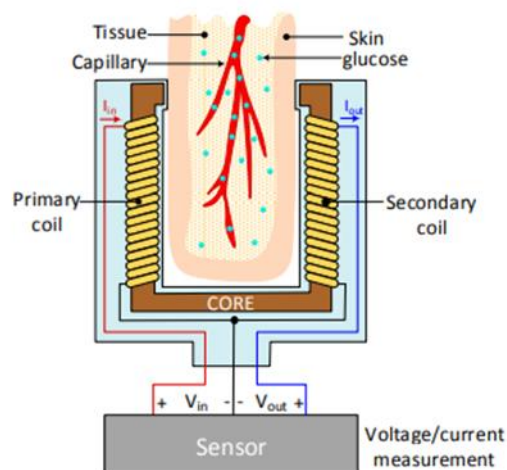


Figura 20. Esempio di sensore applicato al lobo dell'orecchio per la misurazione dei livelli di glucosio nel sangue che sfrutta la modalità elettromagnetica (Wilbert V.G. et al. 2018)

sebbene in questo tipo di metodica l'utilizzo di una singola frequenza, specifica per l'analita, riduce al minimo le interferenze causate da altri materiali, l'attività analitica di questi sensori può essere alterata dalla variazione della temperatura.

La modalità fotoacustica

Il monitoraggio del glucosio tramite la modalità fotoacustica è un approccio ibrido che combina l'eccitazione ottica e la rilevazione acustica per determinare la concentrazione di glucosio. In questo processo, l'energia generata dall'eccitazione mediata da una radiazione luminosa viene convertita in energia acustica attraverso un processo di conversione a più stadi. L'eccitazione delle molecole di glucosio nel sangue (ad esempio grazie all'impiego di un laser) provoca un riscaldamento localizzato del mezzo, che porta a un leggero aumento della temperatura e all'espansione termica volumetrica della regione di interazione ottica. L'impulso di pressione ultrasonica generato viene quindi rilevato da un trasduttore piezoelettrico ultrasonico (convertitore), il quale converte l'energia vibrazionale in segnali elettrici per determinare la concentrazione di glucosio. Tuttavia, la misurazione della glicemia tramite questo metodo è influenzata da fattori come lo spessore, la rugosità, l'umidità e altre condizioni della pelle. Tali elementi alterano l'assorbimento della luce, indebolendo il segnale del glucosio. Inoltre, la presenza di altri analiti nel sangue, come lipidi e proteine, può complicare ulteriormente la rilevazione. Analogamente all'approccio ottico, la calibrazione specifica per ogni persona, l'analisi media dei segnali e l'uso di tecniche avanzate di apprendimento automatico possono aiutare a mitigare questi effetti. Attualmente i dispositivi che sfruttano questa metodica sono ancora in fase di studio.

I nanomateriali

Il rilevamento basato su nanomateriali sfrutta le proprietà uniche di materiali su scala nanometrica per migliorare la sensibilità e l'accuratezza di sensori utilizzati in varie applicazioni, inclusi i dispositivi per il monitoraggio del glucosio. I nanomateriali, come nanoparticelle (0 D), nanotubi di carbonio o fili (1 D), e nanofogli o film (2 D), offrono una superficie maggiore, migliori proprietà elettroniche e una maggiore reattività rispetto ai materiali tradizionali, rendendoli ideali per rilevare basse concentrazioni di analiti come il glucosio nei biofluidi come urina, saliva, sudore e lacrime.

Questi sensori a base di nanomateriali possono essere integrati in tecnologie ottiche, elettrochimiche e fotoacustiche per migliorare la precisione del rilevamento e consentire un monitoraggio più efficiente e meno invasivo (Figura .21).

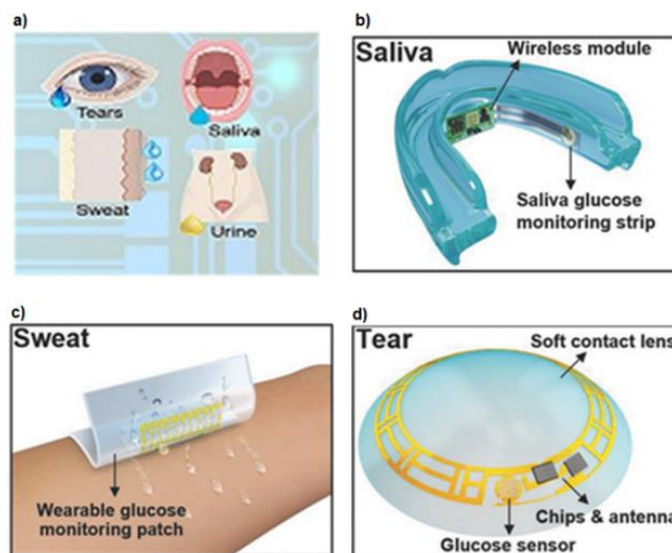


Figura 21. (a) I principali fluidi biologici come lacrime, saliva, sudore e urina sono utilizzati per sviluppare dispositivi di monitoraggio non invasivo del glucosio. i biosensori tipici basati su (b) saliva, (c) sudore e (d) lacrime permettono di rilevare i livelli di glucosio sfruttando la presenza di questo analita in tali fluidi, offrendo un'alternativa meno invasiva rispetto ai tradizionali test ematici. questi biosensori sfruttano varie tecnologie, inclusi nanomateriali e principi elettrochimici, ottici o enzimatici, per monitorare con precisione la concentrazione di glucosio. (Ssoumyasanta I, et al. 2022)

Nanostrutture metalliche, leghe metalliche, ossidi metallici e nanostrutture magnetiche, nanomateriali a base di carbonio e persino le loro strutture ibride o composite sono state ampiamente utilizzate nelle tecnologie di rilevamento non invasivo del glucosio. La maggior parte di questi nanomateriali, in particolare gli ossidi metallici e le nanoparticelle di ferrite, esibiscono un'attività intrinseca simile a quella della perossidasi, che svolge un ruolo catalitico nella rilevazione del glucosio.

(Shokrehodaei M, et al. 2020; Soumyasanta L, et al. 2022; Wilbert V.G. et al. 2019; Paramparambath, S. et al. 2022; Omidniaee A, et al. 2021; Adhikary K, et al. 2016; Lin W.J, et al. 2021; Chung M., et al. 2019; Cheon H.J., 2019; Wang T.-T. 2022)

4.3 Sviluppi recenti dei sensori di glucosio su diversi fluidi biologici

In generale, attraverso l'analisi di specifici biomarcatori presenti nei fluidi biologici è possibile sia rilevare la presenza di una eventuale patologia a carico di un determinato organo o apparato, sia di monitorizzare lo stato di salute di un individuo. Ciò ha reso i biomarcatori oggetto d'interesse e di studio molto approfondito nel campo sia della ricerca scientifica che in quella clinica, per lo screening della salute, la diagnosi, la valutazione delle recidive delle malattie e il monitoraggio terapeutico. Nei pazienti diabetici, i livelli di glucosio in altri fluidi biologici (come urina, saliva, lacrime, sudore e liquidi interstiziali) e nel respiro si possono considerare in una certa misura correlati a quelli del sangue. La facilità di produzione e di raccolta dei biofluidi ha indirizzato la ricerca e lo sviluppo di sensori per il dosaggio del glucosio che permettano un rilevamento in continuo senza tuttavia essere invasivi, risultando più comodi e gestibili per il paziente. Infatti, il sangue ha rappresentato per decenni il biofluido maggiormente utilizzato per il dosaggio della glicemia, tuttavia, con l'aumento dei pazienti affetti da diabete e del disagio che essi affrontano nell'utilizzare metodi di misurazione invasivi, si è manifestata l'esigenza dell'introduzione di metodi sofisticati ma non invasivi. Per affrontare questo problema, molti ricercatori stanno lavorando allo sviluppo di sensori capaci di rilevare il glucosio in altri fluidi biologici come il sudore, la saliva, il fluido oculare e il liquido interstiziale, nonché nel respiro.

Sensori di glucosio basati sull'urina

L'urina è il sottoprodotto liquido del metabolismo umano e per questo contiene molti analiti come urea, acido urico e creatinina rappresentando un ottimo mezzo per monitorare lo stato generale di salute. In genere, in condizioni normali, i campioni di urina non presentano tracce di glucosio. Nel caso dei pazienti affetti da diabete, la concentrazione di glucosio nel filtrato supera il TmG (la capacità massima di trasporto tubulare del glucosio) quindi, il glucosio in eccesso viene eliminato nelle urine

dove può essere rilevato e quantificato. Ciò avviene quando la concentrazione plasmatica di glucosio risulta ≥ 180 mg/dl, valore che rappresenta la soglia renale per il glucosio. Alcuni studiosi hanno dimostrato con successo l'applicazione delle nanoparticelle di $ZnFe_2O_4$ per la rilevazione dei livelli di glucosio nelle urine. Il metodo si basa sul rilevamento colorimetrico mediante l'utilizzo dell'enzima glucosio ossidasi (GO_x). Tuttavia, recentemente, è stato testato un sensore colorimetrico che utilizza nanoparticelle d'oro plasmoniche su nanofogli di nitruro di carbonio grafítico (nanoparticelle di Au @g- C_3N_4) per determinare i livelli di glucosio nelle urine. Inoltre, sono stati impiegati come materiale per elettrodi nanostrutture ibride come Co_3O_4 / nanocompositi di grafene per rilevare la glicosuria. Si tratta di un sensore a base elettrochimica non enzimatica con rilevamento limite di 0,5 mm (Figura 22).

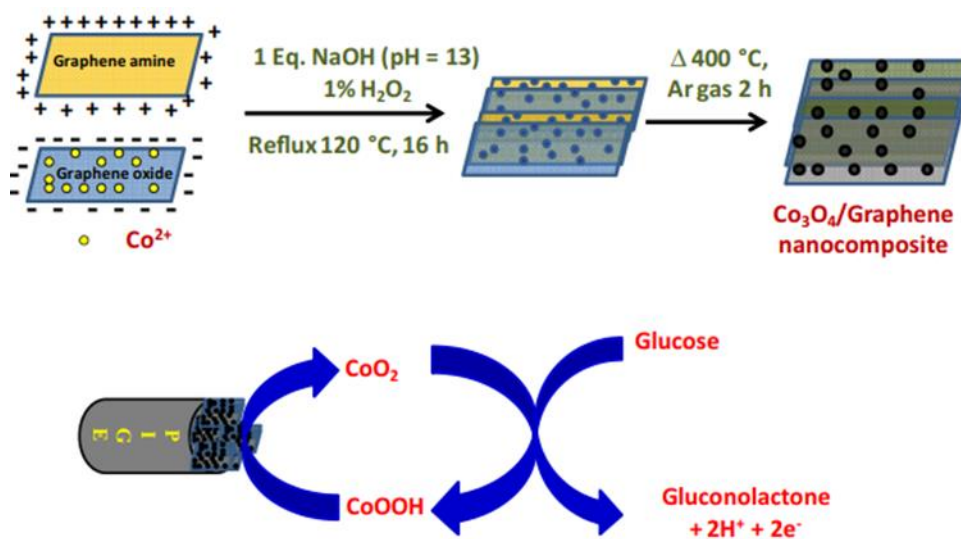


Figura 22. Illustrazione schematica della fabbricazione di co_3o_4 / nanocomposito di grafene e il meccanismo dell'ossidazione elettrocatalitica del glucosio. (Vivekananth R, et al. 2018)

I nanozimi (nanoparticelle che imitano gli enzimi) hanno recentemente guadagnato attenzione per il loro uso in applicazioni di biosensori. Questi enzimi artificiali sono noti per la loro capacità di sostenere un'ampia gamma di temperature e valori di pH. Tra i loro vantaggi rientrano i bassi costi di

fabbricazione e l'attività catalitica impiegabile per numerose reazioni. Tuttavia, l'utilizzo dell'urina come fluido alternativo per il dosaggio del glucosio presenta delle criticità nel momento in cui viene proposta per il suo monitoraggio in continuo. Risulta, infatti, difficoltoso riconoscere i valori limite del glucosio come ipoglicemia o fasi iniziali dell'iperglicemia poiché il glucosio presente in circolo viene riassorbito dai reni. Pertanto, dato che la glicosuria si manifesta quando la capacità di riassorbimento renale viene superata è davvero difficile dimostrare una correlazione tra la glicosuria e possibili picchi significativi nella misurazione del glucosio. Oltre ai dispositivi sopra descritti ultimamente è stata recentemente proposta anche un'alternativa basata sulla spettroscopia Raman. Si tratta di una tecnica di analisi dei materiali basata sul fenomeno di diffusione di una radiazione elettromagnetica monocromatica da parte del campione analizzato. È una tecnica non distruttiva, che dà risposte in tempi brevi, non richiede particolari condizioni per l'esecuzione della misura e può essere effettuata direttamente sul campione senza nessuna preparazione. In un esperimento di scattering Raman il campione da analizzare viene colpito da una radiazione elettromagnetica monocromatica proveniente da una sorgente laser. La radiazione elettromagnetica interagendo con gli elettroni delle molecole induce su di esse un dipolo elettrico oscillante responsabile del processo di diffusione della radiazione incidente. Analizzando la radiazione diffusa si possono distinguere componenti con diverse energie.

I sensori di glucosio basati sulla saliva

La saliva rappresenta un importante fluido biologico utilizzato spesso come mezzo di indagine nel campo della tossicologia e della medicina forense, grazie alla sua correlazione con molte condizioni ormonali, immunologiche, metaboliche e nutrizionali del corpo umano. Inoltre, prelevare campioni di saliva è una tecnica molto meno invasiva rispetto al prelievo di sangue e per questo motivo può risultare particolarmente adatta per bambini, anziani o altri soggetti vulnerabili. Secondo alcuni autori sarebbe riscontrabile una buona correlazione tra i livelli di glucosio salivare e la glicemia. Secondo

la letteratura, infatti, una concentrazione di glucosio compresa tra 1,0 mg/dl e 20 mg/dl è associata ad iperglicemia, mentre un intervallo tra 0,5 mg/dl e 1,0 mg/dl indica un individuo sano; livelli inferiori a 0,5 mg/dl sono invece indicativi di ipoglicemia. Nel campo dei sensori di glucosio basati sulla saliva sono state condotte molteplici ricerche su tecniche sia enzimatiche che non enzimatiche. Tra questi ricordiamo uno dei primi sensori per il rilevamento del glucosio salivare che utilizzava un trasduttore enzimatico amperometrico con tre elettrodi; l'elettrodo di lavoro risultava essere in platino ed era ricoperto da una membrana di albumina, sulla quale era immobilizzata una perossidasi. La concentrazione di H_2O_2 determinava la corrente in uscita dal sensore, che veniva rilevata dal circuito amperometrico del sistema di analisi della saliva. Un altro studio ha interessato un sensore colorimetrico bienzimatico (GOx e HRP) su carta, che mostra un cambiamento di colore in presenza di glucosio salivare. Il dispositivo è adatto sia ad una valutazione qualitativa ad occhio nudo, sia, mediante uno scanner, ad un'analisi quantitativa. Il sensore è allestito utilizzando della carta Whatman rivestita di paraffina che viene pressata attraverso una sorta di stampo metallico caldo per formare delle zone di rilevamento all'interno del dispositivo (Figura 23)

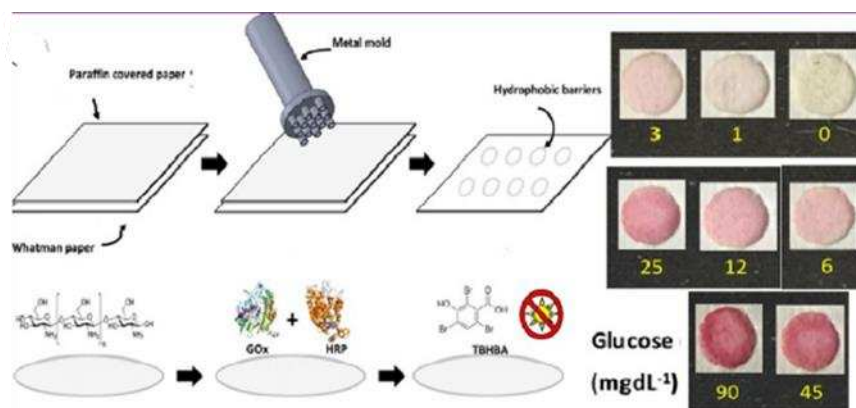


Figura 23. Schema della metodologia di dosaggio salivare tramite sensore colorimetrico. a lato è presente una calibrazione cromatica per la quantificazione della concentrazione del glucosio nel campione (Luis A, et al. 2018).

In ciascuna di queste zone circoscritte viene aggiunta un'aliquota di soluzione tampone contenente una mistura dei due enzimi glucosio ossidasi e perossidasi di rafano (GOx e HRP) e si lascia asciugare

a temperatura ambiente; successivamente si aggiunge la soluzione contenente il cromoforo, facendo attenzione a procedere in assenza di luce diretta (al buio). Una volta terminato di dispensare i reagenti, il foglio viene conservato in frigorifero ad una temperatura di +4 °C. Quindi, rimosso dal frigo, si procede con la dispensazione della saliva negli spot precedentemente allestiti, affinché avvenga l'individuazione del glucosio. Durante il rilevamento il glucosio viene convertito in acido gluconico e H₂O₂ dall'azione dell'enzima GOx. In presenza di HRP il perossido di idrogeno prodotto agisce come agente ossidante nei confronti del cromoforo presente, che da incolore si trasforma in un prodotto colorato la cui intensità di colorazione è proporzionale al contenuto di glucosio. Il dispositivo ha mostrato un limite di rilevazione di 0,37 mg/dl in un intervallo lineare di concentrazione del glucosio da 1 mg/dl a 22,5 mg/dl. Considerata la semplicità d'uso, l'assenza di attrezzature sofisticate, il basso costo, la selettività e la buona sensibilità, questo dispositivo risulta adatto ad un impiego in aree geografiche a basso reddito o prive di strutture mediche e assistenza professionale. Tra i dispositivi più interessanti sviluppati per l'utilizzo della saliva come biofluido alternativo troviamo quello in cui un elettrodo è posto su un supporto fatto di materiale odontoiatrico con una membrana enzimatica. Si tratta di un sensore esternamente invisibile ed integrato con un dispositivo wireless necessario per la rilevazione dei dati. Purtroppo, però, i dispositivi ancorati esternamente ai denti possono risultare scomodi qualora vengano indossati per un lungo periodo di tempo e possono avere effetti negativi sugli elementi dentali stessi (Figura 24).

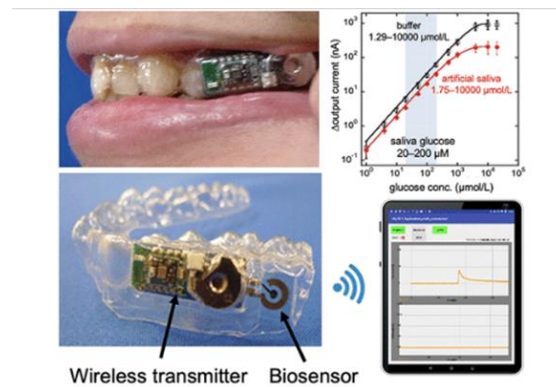


Figura 24. Sensore applicato ad un impianto odontoiatrico integrato con un dispositivo wireless necessario per la rilevazione dei dati (Takahiro A, et al. 2020)

Sensori del glucosio basati sulle lacrime

La superficie corneo-congiuntivale è rivestita da una sottile pellicola trilaterale trasparente che va sotto il nome di film lacrimale o liquido lacrimale. Si tratta di un rivestimento fondamentale per il mantenimento sia della salute che della funzionalità dell'occhio. Grazie alla sua peculiare composizione svolge contemporaneamente diverse funzioni altamente specializzate, come la formazione di una superficie rifrattiva liscia, necessaria per il corretto passaggio della luce (e quindi per una visione chiara), la protezione dell'occhio da lesioni o infezioni (contenendo enzimi e sostanze antimicrobiche) e la lubrificazione e idratazione della superficie oculare, fondamentali per prevenire secchezza e irritazioni. La produzione di liquido lacrimale può essere innescata anche da emozioni intense, come la rabbia, o dal dolore, sia fisico che emotivo. In questo caso le concentrazioni degli ormoni risultano essere maggiori rispetto alla secrezione basale, evidenziando che la natura del liquido lacrimale è suscettibile a variazione a seconda del metodo di raccolta del campione. Durante questa fase, quindi, è molto importante evitare una stimolazione lacrimale o un'irritazione. Le lacrime e il sangue sono separati dalla barriera emato-lacrimale, che determina una composizione molto diversa tra i due fluidi. Tuttavia, il flusso sanguigno diretto al sistema nervoso centrale l'attraversa, provocando il rilascio di analiti come glucosio, lattato, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻ e urea nel liquido lacrimale. Grazie a ciò si instaura una correlazione lineare tra glicemia e concentrazione di glucosio

nelle lacrime, che permette di effettuare il monitoraggio dei livelli di glucosio utilizzando questo liquido alternativo. Numerosi studi condotti sul liquido lacrimale si sono incentrati sull'uso di specifiche lenti a contatto definite "smart" o intelligenti (Figura 25).

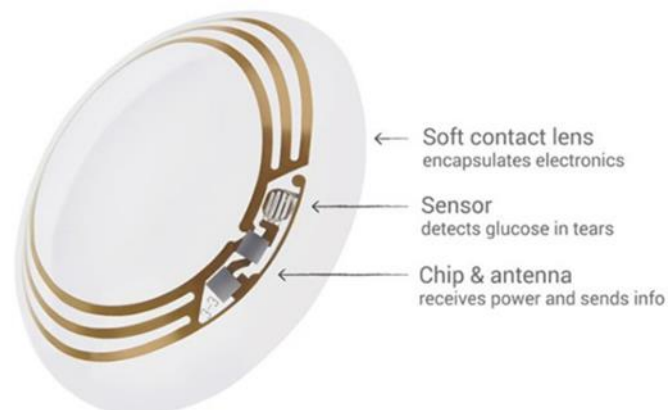


Figura 25. Esempio di lente a contatto smart con sensore integrato (www.neshnugenx.wordpress.com)

Si tratta di lenti a contatto morbide ingegnerizzate mediante sensori specifici per la rilevazione del glucosio. Essendo a contatto diretto con l'occhio, i materiali utilizzati per l'allestimento del sensore devono soddisfare particolari esigenze. Sebbene sia necessario che le lenti risultino morbide, deformabili e confortevoli, è importante che esse mantengano le loro proprietà meccaniche, per resistere ai movimenti oculari; esse, inoltre, non devono essere tossiche, garantendo lo scambio di ossigeno tra occhio e ambiente circostante, e devono permettere il rilascio di liquido lacrimale in modo naturale, non generando in alcun modo irritazioni. I principali materiali impiegati nell'allestimento delle lenti morbide commercializzate sono pertanto il poli-idrossietil metacrilato (HEMA), la poliacrilammide (PA), il polietilene tereftalato (PET), l'alcol polivinilico (PVA) e il polidimetilsilossano (PDMS), che soddisfano tutti i requisiti richiesti. Per la misurazione dei livelli del glucosio nel liquido lacrimale sono stati presi in considerazione diversi principi. Tra le tecniche utilizzate ci sono quelle basate su sensori elettrochimici (in versione aggiornata), la cromatografia, la spettrometria di massa, la fluorescenza e la spettroscopia Raman. Recentemente, si sta lavorando

all'inserimento di un sensore elettrochimico wireless con pixel di visualizzazione in una lente di contatto morbida, attraverso l'utilizzo di nanostrutture trasparenti ed estendibili. Questa tecnologia prevede l'integrazione di un display nelle lenti a contatto "smart", così da eliminare il bisogno di scomode apparecchiature aggiuntive per il rilevamento del segnale (Figura 26).

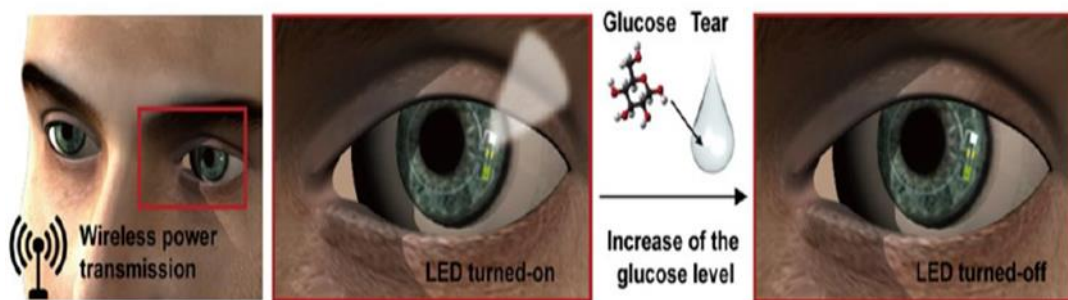


Figura 26. Sensore di glucosio elettrochimico wireless. il sensore di glucosio e il pixel led vengono alimentati grazie all'energia elettrica trasmessa in modalità wireless attraverso un'antenna integrata nella lente a contatto. quando il livello di glucosio nel liquido lacrimale supera la soglia preimpostata, il pixel led si spegne, segnalando la variazione dei livelli di glucosio lacrimale (Ku M, et al.2020)

Sensori di glucosio basati sul sudore

Per il sudore sono stati sviluppati dei sistemi di rilevamento del glucosio epidermico, in grado di effettuare un monitoraggio continuo non invasivo. La quantità di glucosio che diffonde dai vasi sanguigni a questo tipo di biofluido ha una correlazione diretta con la concentrazione di glucosio nel sangue; in particolare, livelli di glucosio nel sudore variabili tra 0,1 e 50 mg/dl sono indicativi di uno stato diabetico. Nel sudore dei soggetti sani il glucosio non è invece rilevabile. Il sudore rappresenta un promettente biofluido per lo sviluppo di sensori, indipendentemente da problemi quali: bassa produzione di sudore da parte di alcuni individui, necessità di personalizzazione, ecc. Per il rilevamento del glucosio epidermico sono state messe a punto delle tecniche non invasive o minimamente invasive, che impiegano vari tipi di sensori e prevedono l'utilizzo di film sottili, nastro adesivo, tatuaggi e cerotti; tali tecniche hanno dalla loro la flessibilità, la facilità di costruzione e di utilizzo e il basso costo. Il sensore elettrochimico su nastro adesivo per il rilevamento del glucosio è

stato preparato riscaldando e stampando inchiostro di grafite di carbonio su nastro adesivo, per sviluppare elettrodi di lavoro e controelettrodi con Ag/AgCl come elettrodo di riferimento. L'elettrodo di lavoro è stato ulteriormente rivestito con un sottile strato di blu di Prussia per migliorare il trasferimento di elettroni e la selettività verso l' H_2O_2 . L'interazione del blu di Prussia con l' H_2O_2 e l'immobilizzazione dell'enzima glucosio ossidasi sull'elettrodo di lavoro controllano la corrente di uscita durante la misurazione. Uno degli svantaggi riscontrati con i sensori per la determinazione del glucosio nel sudore nelle applicazioni nella vita reale è la loro suscettibilità alle variazioni di temperatura atmosferica, umidità e pH. A questo proposito è stato progettato un cerotto indossabile con dispositivo monouso a strisce attraverso la fusione a goccia di GOx-grafene, Nafion e glutaraldeide su un elettrodo di oro (Au) elettrodepositato. Recentemente sono stati sviluppati anche dei sensori touchpad in idrogel. Queste piattaforme offrono la possibilità di raccogliere il sudore umano a riposo. Si tratta di una sorta di patch indossabile il cui funzionamento è basato sui microfluidi, che utilizza un processo di taglio laser roll-to-roll per rilevare elettrochimicamente il contenuto di glucosio, sodio e potassio nel sudore insieme alla velocità di sudorazione. Questo dispositivo consta di due strati, uno contenente gli elettrodi per l'analisi del sudore e l'altro per la raccolta e la conservazione del biofluido con l'aiuto di un canale di flusso microfluidico a spirale. In un altro studio è stato sviluppato un dispositivo integrato elettrochimico microfluidico basato su carta 3D (3D-PMED) con la capacità di rilevare il glucosio nel sudore senza contatto fisico diretto con la pelle. La carta di cellulosa viene trattata mediante serigrafia a cera modificata per creare confini idrofobici. La carta prestampata viene piegata cinque volte in modo da creare una struttura 3D a cinque strati, ognuno con un ruolo specifico: collettore di sudore, canale verticale, canale trasversale, strato contenente elettrodi ed evaporatore di sudore. Il sudore viene trasportato per capillarità dalla pelle allo strato evaporatore, che assicura il continuo rinnovo del campione di biofluido agli elettrodi evitandone l'accumulo. Anche tutti gli elettrodi (grafite di carbonio per elettrodi di lavoro e controelettrodi e Ag/AgCl per elettrodo di riferimento) sono stati preparati con il metodo serigrafico e caricati sullo strato apposito (Figura 27).

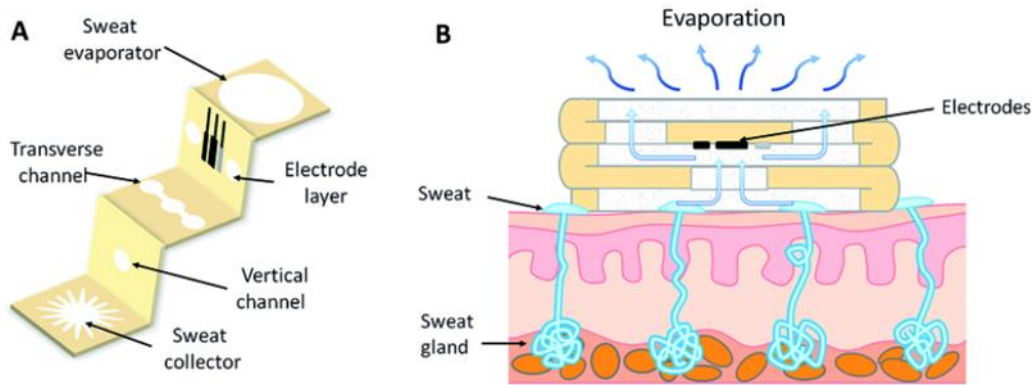


figura 27. schema del dispositivo integrato elettrochimico microfluidico tridimensionale basato su carta (3D-PMED). a) la struttura a strati del dispositivo. 3D-PMED comprende: collettore del sudore, canale verticale, canale trasversale, strato di elettrodi ed evaporatore del sudore. le aree gialle o le aree bianche sul dispositivo erano rispettivamente aree idrofobe formate mediante serigrafia a cera o aree idrofile di carta da filtro. un sensore elettrochimico a tre elettrodi mediante serigrafia è stato fissato sullo strato di elettrodi del dispositivo mediante nastro biadesivo. b) il diagramma schematico del 3D-PMED applicato sulla pelle umana. è stato formato un canale di flusso 3d piegando il dispositivo con la struttura a più livelli, per aiutare il sudore a fluire dalla pelle nel dispositivo e quindi rinfrescare il sudore sotto gli elettrodi (Vundrala S.R., et al.2022)

Seguendo uno schema simile, è stato sviluppato un chip microfluidico a quattro strati con cinque canali microfluidici per condurre misurazioni parallele simultaneamente e garantire una migliore riproducibilità e una maggior precisione (Figura 28).

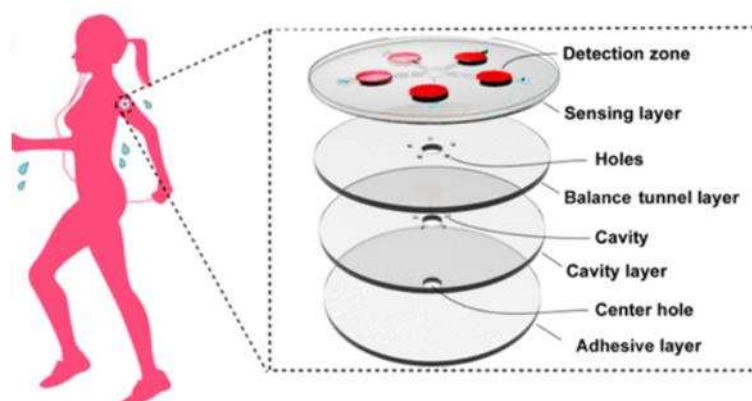


Figura 28. Schema di sensore del glucosio nel sudore indossabile basato su chip microfluidico. il sensore è composto da quattro strati che facilitano il flusso del sudore dalla superficie della pelle alle cinque camere di rilevamento contenenti i reagenti colorimetrici pre-incorporati nello strato superiore (Vundrala S.R., et al.2022).

I cinque micro-canali sono localizzati verso l'esterno in una microcamera e ciascuno di essi è dotato di una valvola di ritegno per impedire il reflusso.

Sensori di glucosio basati sul respiro

Oltre ai liquidi corporei, anche il respiro, espirato dal corpo umano, può essere utilizzato per rilevare il contenuto di glucosio. La composizione del respiro può riflettere qualsiasi cambiamento nel metabolismo corporeo. La presenza di diversi componenti volatili è direttamente correlata al livello di glucosio nel sangue. Il metodo più comunemente utilizzato si basa sul rilevamento dell'acetone, corpo chetonico che si forma nel fegato durante il digiuno. È stato osservato che nei pazienti diabetici il livello di acetone nel respiro è superiore a 1,8 parti per milione di volume (ppmv), mentre un valore di 0,8 ppmv è considerato normale. La raccolta selettiva e l'analisi del condensato dell'aria espirata (EBC) rappresenta un altro metodo promettente per il rilevamento del glucosio. Alcuni studiosi hanno progettato un dispositivo in grado di condensare in 3 minuti più di 130 L di EBC da 15 L di aria espirata. Tale strumento è dotato di un condensatore portatile per raccogliere il respiro in modo selettivo tramite un boccaglio monouso collegato alla porta di aspirazione della valvola (Figura 29).

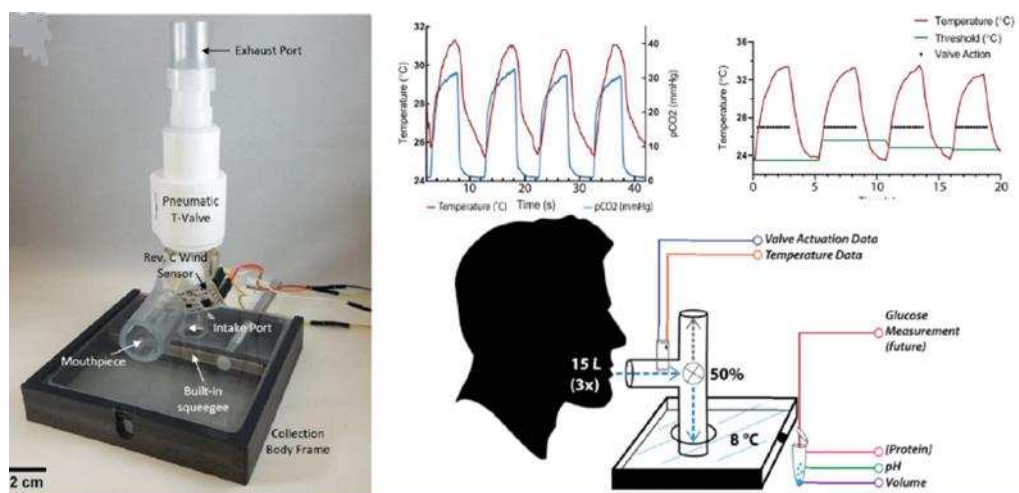


Figura 29. Dispositivo per condensare l'EBC e rilevare in maniera selettiva il glucosio (Vundrala S.R., et al.2022).

All'altro estremo del boccaglio è presente un sensore di temperatura. Questa tecnica richiede ulteriori indagini, poiché persistono ancora molti problemi come l'aria morta, l'affidabilità delle prestazioni e la dipendenza dalla temperatura e dal pH. Un'altra innovazione consiste in un "naso elettronico" che combina l'analisi dei componenti organici volatili e le reti neurali artificiali per il rilevamento di problemi respiratori e di malattie come il diabete e il cancro. Ottenere un buon EBC è però altamente dipendente dalle condizioni sperimentali e da numerosi fattori come l'età, la dieta, l'attività fisica, il momento della raccolta del campione, ecc. Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi che tuttavia non sono stati in grado di trovare con buona approssimazione una correlazione tra il contenuto di acetone e la concentrazione di glucosio nel sangue. La difficoltà nell'ottenere tale correlazione rappresenta un importante ostacolo allo sviluppo futuro in quest'ambito, nonostante si stiano conducendo esperimenti sempre più specifici e mirati.

(Takahiro A, et al. 2020; Vundrala S.R., et al.2022; Ku M, et al.2020; Luis A, et al. 2018; Vivekananth R, et al. 2018; Gururaj R, et al. 2021; Omidniaee, Aet al. 2021; Wang T.-T., et al. 2022; Lin W.J., et al. 2021; Chung M., et al. 2019; Cheon H.J., et al. 2019; Pullano SA, et al. 2022; Arakawa T,et al. 2016; Takahiro A, et al. 2020; Ku M,et al. 2020; Sun M., et al. 2022; Ghosh, R.;et al. 2020; Gualandi I., et al. 2020; Santana-Jiménez L.A., et al. 2017; Jung D.G., et al. 2017; Dyankov G., et al. 2020; Wang J., et al. 2016; Zhang W., et al. 2015; Cowart S.L., et al. 2021; Pezhhan H., et al. 2020; Luo X., et al. 2020; Nyein H.Y.Y., et al. 2021; Nagamine K., et al. 2019; Lin P.-H., et al. 2022; Weatherspoon D., et al. 2019; Saasa V., et al. 2019; www.neshnugenx.wordpress.com)

5. CONCLUSIONI

Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2016, il diabete rappresentava la settima causa di morte a livello mondiale. Ad oggi la mortalità prematura dovuta al diabete è in costante aumento. Anche se per questa patologia non è stata trovata una cura definitiva, il monitoraggio dei livelli di glucosio nel sangue e una terapia farmacologica appropriata possono mitigarne le complicanze e ridurre la gravità. Il trattamento del diabete include generalmente iniezioni di insulina o l'assunzione di farmaci per mantenere i livelli di glucosio nel range fisiologico. Questi trattamenti possono essere resi più efficaci attraverso un monitoraggio continuo della glicemia e dosaggi adeguati dei farmaci specifici. Un sovradosaggio può infatti causare una diminuzione dei livelli di glucosio che, al di sotto di determinati valori, possono portare alla perdita di coscienza o, nei casi più gravi, alla morte. Questi problemi hanno reso necessario lo sviluppo di sistemi di rilevamento e monitoraggio avanzati e affidabili che possano facilitare e migliorare le condizioni di vita dei pazienti diabetici. In questo lavoro di tesi ho descritto lo sviluppo delle nuove tecnologie oggi disponibili, evidenziando i pro e i contro di ogni tecnica. I sensori che eseguono un monitoraggio del glucosio in continuo (CGM), oltre a essere selettivi, sensibili, rapidi, affidabili e accettati dalla maggior parte dei pazienti, rappresentano una componente essenziale per il sistema di gestione e somministrazione dell'insulina, superando a tutti gli effetti il concetto dei vecchi rilevatori pungidito che forniscono delle misurazioni discontinue e poco significative per la gestione della glicemia. Sebbene tali metodiche si avvalgano di strumenti semi-invasivi per il loro funzionamento, permangono delle criticità per quanto riguarda la fase di calibrazione, che purtroppo richiede ancora il prelievo di sangue dal dito, rendendo in definitiva la gestione di tali strumenti non troppo facili per l'utenza. Ciò causa la perdita della funzione intrinseca dello strumento, che non fornisce più una misurazione in continuo. Per rendere più facile, sicuro, preciso e meno doloroso il monitoraggio continuo del glucosio, da alcuni anni si è cominciato a volgere l'attenzione e lo studio verso dei metodi di misurazione completamente non invasivi. Il problema è stato quindi affrontato da due

diverse prospettive. Da una parte studiare e valutare il contenuto di glucosio in mezzi biologici diversi dal sangue (come sudore, urina, lacrime, respiro e saliva), la cui disponibilità non richiede l'utilizzo di mezzi invasivi; dall'altra sviluppare e sperimentare nuovi materiali e nuove metodiche per migliorare la sensibilità e la specificità di sensori già in uso, così da limitare l'invasività delle apparecchiature. Nonostante ci siano stati molti progressi ed enormi sviluppi nell'ultimo decennio, esistono ancora alcuni problemi pratici associati ai metodi basati su biofluidi che riguardano il rilevamento e la quantificazione del glucosio. In particolare, le basse concentrazioni di glucosio in mezzi come saliva, lacrime e sudore rendono difficoltosa la correlazione con i livelli di glucosio nel sangue, compromettendo di conseguenza la sensibilità della metodica, e pongono dei limiti di rilevamento che risultano essere più bassi per questi dispositivi. Per quanto riguarda l'urina, è un biofluido complesso e livelli elevati di glucosio si riscontrano non solo in presenza di iperglicemia, ma anche in soggetti affetti da patologie del tubulo renale o in condizioni fisiologiche come la gravidanza. Tra le metodiche esaminate, sensori elettrochimici integrati in dispositivi come le lenti a contatto intelligenti e altre tecnologie indossabili hanno dimostrato un grande potenziale, ma allo stesso tempo non sono ancora commercialmente praticabili, ad esempio a causa del problema legato alla secchezza oculare, che procurerebbe grandi disagi all'utenza. Per quanto concerne il respiro, nonostante esso rappresenti un mezzo promettente in cui effettuare il monitoraggio del glucosio in modo non invasivo, i sensori impiegati per la determinazione presentano importanti limitazioni relativamente alla selezione di biomarcatori idonei e all'analisi dei dati. D'altro canto, sebbene alcune metodiche, come la spettroscopia o la fluorescenza, siano promettenti, molte devono ancora superare sfide tecniche e di accuratezza prima di essere adottate su larga scala. I sensori elettrochimici wireless, in particolare, offrono buoni risultati ma possono essere influenzati da fattori ambientali o biologici che richiedono ulteriori ottimizzazioni. Con il continuo avanzamento della ricerca e lo sviluppo di tecnologie miniaturizzate e più precise, è probabile che i dispositivi non invasivi diventeranno sempre più diffusi, offrendo un'alternativa valida ai glucometri tradizionali che dosano il glucosio sul sangue

capillare. Tuttavia, affinché ciò avvenga sono necessari ancora ulteriori studi clinici per garantirne l'accuratezza, la sicurezza e l'affidabilità su larga scala.

6. BIBLIOGRAFIA

. Lin, X.; Xu, Y.; Pan, X.; Xu, J.; Ding, Y.; Sun, X.; Song, X.; Ren, Y.; Shan, P.F. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: An analysis from 1990 to 2025. *Sci. Rep.* 2020, 10, 14790. [CrossRef] [PubMed]

. Cleveland Clinic. Hyperglycemia: Causes, Symptoms, Treatments & Prevention. Available online: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/9815-hyperglycemia-high-blood-sugar> (accessed on 31 January 2022).

. Healthline. The Effects of Low Blood Sugar on Your Body. 15 August 2018. Available online: <https://www.healthline.com/health/low-blood-sugar-effects-on-body> (accessed on 31 January 2022).

Zhao, R.; Lu, Z.; Yang, J.; Zhang, L.; Li, Y.; Zhang, X. Drug Delivery System in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8, 880. [CrossRef] [PubMed]

Bruen, D.; Delaney, C.; Florea, L.; Diamond, D. Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments. *Sensors* 2017, 17,1866. [CrossRef] [PubMed]

. Zhao, M.; Leung, P.S. Revisiting the use of biological fluids for noninvasive glucose detection. *Future Med. Chem.* 2020, 12,645–647. [CrossRef] [PubMed]

Teymourian, H.; Barfidokht, A.; Wang, J. Electrochemical glucose sensors in diabetes management: An updated review (2010–2020). *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49, 7671–7709. [CrossRef]

Wu, P.; Shao, Q.; Hu, Y.; Jin, J.; Yin, Y.; Zhang, H.; Cai, C. Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection. *Electrochim. Acta* 2010, 55, 8606–8614. [CrossRef]

Gao, W.; Zhou, X.; Heinig, N.F.; Thomas, J.P.; Zhang, L.; Leung, K.T. Nonenzymatic Saliva-Range Glucose Sensing Using Electrodeposited Cuprous Oxide Nanocubes on a Graphene Strip. *ACS Appl. Nano Mater.* 2021, 4, 4790–4799. [CrossRef]

Hassan, M.; Vyas, C.; Grieve, B.; Bartolo, P. Recent Advances in Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Sensing. *Sensors* 2021, 21, 4672. [CrossRef] [PubMed]

Lee, H.; Hong, Y.J.; Baik, S.; Hyeon, T.; Kim, D.-H. Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device. *Adv. Healthc. Mater.* 2018, 7, 1701150. [CrossRef]

Wang, L.; Jackman, J.A.; Park, J.H.; Tan, E.-L.; Cho, N.-J. A flexible, ultra-sensitive chemical sensor with 3D biomimetic templating for diabetes-related acetone detection. *J. Mater. Chem. B* 2017, 5, 4019–4024. [CrossRef]

Xing, X.; Du, L.; Feng, D.; Wang, C.; Yao, M.; Huang, X.; Zhang, S.; Yang, D. Individual gas sensor detecting dual exhaled biomarkers via a temperature modulated n/p semiconducting transition. *J. Mater. Chem. A* 2020, 8, 26004–26012. [CrossRef]

Ito, N.; Miyashita, M.; Ikeda, S. 1—Portable urine glucose sensor. In *Chemical, Gas, and Biosensors for Internet of Things and Related Applications*; Mitsubayashi, K., Niwa, O., Ueno, Y., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 3–12. [CrossRef]

Mohammadifar, M.; Tahernia, M.; Choi, S. An Equipment-Free, Paper-Based Electrochemical Sensor for Visual Monitoring of Glucose Levels in Urine. *SLAS Technol. Transl. Life Sci. Innov.* 2019, 24, 499–505. [CrossRef]

Kownacka, A.E.; Vegelyte, D.; Joosse, M.; Anton, N.; Toebes, B.J.; Lauko, J.; Buzzacchera, I.; Lipinska, K.; Wilson, D.A.; Geelhoed- Duijvestijn, N.; et al. Clinical Evidence for Use of a Noninvasive Biosensor for Tear Glucose as an Alternative to Painful Finger-Prick for Diabetes Management Utilizing a Biopolymer Coating. *Biomacromolecules* 2018, 19, 4504–4511. [CrossRef]

Park, J.; Kim, J.; Kim, S.-Y.; Cheong, W.H.; Jang, J.; Park, Y.-G.; Na, K.; Kim, Y.-T.; Heo, J.H.; Lee, C.Y.; et al. Soft, smart contact lenses with integrations of wireless circuits, glucose sensors, and displays. *Sci. Adv.* 2018, 4, eaap9841. [CrossRef] [PubMed]

Ribet, F.; Stemme, G.; Roxhed, N. Real-time intradermal continuous glucose monitoring using a minimally invasive microneedlebased system. *Biomed. Microdevices* 2018, 20, 101. [CrossRef] [PubMed]

. Fatoni, A.; Aziz, A.N.; Anggraeni, M.D. Low-cost and real-time color detector developments for glucose biosensor. *Sens. Bio-Sens. Res.* 2020, 28, 100325. [CrossRef]

Xiao, J.; Liu, Y.; Su, L.; Zhao, D.; Zhao, L.; Zhang, X. Microfluidic Chip-Based Wearable Colorimetric Sensor for Simple and Facile Detection of Sweat Glucose. *Anal. Chem.* 2019, 91, 14803–14807. [CrossRef]

OpenWetWare. Glucose Sensors. Available online: https://openwetware.org/wiki/Glucose_Sensors (accessed on 18 May 2021).

Lipani, L.; Dupont, B.G.R.; Doungmene, F.; Marken, F.; Tyrrell, R.M.; Guy, R.H.; Ilie, A. Non-invasive, transdermal, path-selective and specific glucose monitoring via a graphene-based platform. *Nat. Nanotechnol.* 2018, 13, 504–511. [CrossRef]

Sun, M.; Pei, X.; Xin, T.; Liu, J.; Ma, C.; Cao, M.; Zhou, M. A Flexible Microfluidic Chip-Based Universal Fully Integrated Nanoelectronic System with Point-of-Care Raw Sweat, Tears, or Saliva Glucose Monitoring for Potential Noninvasive Glucose Management. *Anal. Chem.* 2022, 94, 1890–1900. [CrossRef] [PubMed]

Ghosh, R.; Pin, K.Y.; Reddy, V.S.; Jayathilaka, W.A.D.M.; Ji, D.; Serrano-García, W.; Bhargava, S.K.; Ramakrishna, S.; Chinnappan, A. Micro/nanofiber-based noninvasive devices for health monitoring diagnosis and rehabilitation. *Appl. Phys. Rev.* 2020, 7, 041309. [CrossRef]

Xu, T.; Jin, W.; Wang, Z.; Cheng, H.; Huang, X.; Guo, X.; Ying, Y.; Wu, Y.; Wang, F.; Wen, Y.; et al. Electrospun CuO-Nanoparticles- Modified Polycaprolactone @Polypyrrole Fibers: An Application to Sensing Glucose in Saliva. *Nanomaterials* 2018, 8, 133. [CrossRef] [PubMed]

Nayak, M.T.; Gupta, S.; Sunitha, J.; Dawar, G.; Sinha, N.; Rallan, N.S. Correlation of salivary glucose level with blood glucose level in diabetes mellitus. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2017, 21, 334–339. [CrossRef]

Gug, I.T.; Tertis, M.; Hosu, O.; Cristea, C. Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019, 113, 301–316. [CrossRef]

Torné-Morató, H.; Donati, P.; Pompa, P.P. Nanoplasmonic Strip Test for Salivary Glucose Monitoring. *Nanomaterials* 2021, 12, 105. [CrossRef]

Gualandi, I.; Tessarolo, M.; Mariani, F.; Arcangeli, D.; Possanzini, L.; Tonelli, D.; Fraboni, B.; Scavetta, E. Layered Double Hydroxide-Modified Organic Electrochemical Transistor for Glucose and Lactate Biosensing. *Sensors* 2020, 20, 3453. [CrossRef]

Shende, P.; Sahu, P. Enzyme bioconjugated PAMAM dendrimers for estimation of glucose in saliva. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2021, 70, 469–475. [CrossRef]

Soni, A.; Jha, S.K. Smartphone based non-invasive salivary glucose biosensor. *Anal. Chim. Acta* 2017, 996, 54–63. [CrossRef] [PubMed]

Santana-Jiménez, L.A.; Márquez-Lucero, A.; Osuna, V.; Estrada-Moreno, I.; Dominguez, R.B. Naked-Eye Detection of Glucose in Saliva with Bionzymatic Paper-Based Sensor. *Sensors* 2018, 18, 1071. [CrossRef] [PubMed]

Jung, D.G.; Jung, D.; Kong, S.H. A Lab-on-a-Chip-Based Non-Invasive Optical Sensor for Measuring Glucose in Saliva. *Sensors* 2017, 17, 2607. [CrossRef] [PubMed]

Anderson, K.; Poulter, B.; Dudgeon, J.; Li, S.-E.; Ma, X. A Highly Sensitive Nonenzymatic Glucose Biosensor Based on the Regulatory Effect of Glucose on Electrochemical Behaviors of Colloidal Silver Nanoparticles on MoS₂. *Sensors* 2017, 17, 1807. [CrossRef]

Coyle, V.E.; Kandjani, A.; Field, M.R.; Hartley, P.; Chen, M.; Sabri, Y.M.; Bhargava, S.K. Co₃O₄ needles on Au honeycomb as a non-invasive electrochemical biosensor for glucose in saliva. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 141, 111479. [CrossRef]

Sha, R.; Durai, L.; Badhulika, S. Facile in-situ preparation of few-layered reduced graphene oxide—Niobium pentoxide composite for non-enzymatic glucose monitoring. In Proceedings of the 2018 4th IEEE International Conference on Emerging Electronics (ICEE), Bangalore, India, 16–19 December 2018; pp. 1–4.

Nirala, N.R.; Tiwari, M.; Prakash, R. A nanoporous palladium(II) bridged coordination polymer acting as a peroxidase mimic in a method for visual detection of glucose in tear and saliva. *Mikrochim. Acta* 2018, 185, 245. [CrossRef]

Fakhri, N.; Salehnia, F.; Beigi, S.M.; Aghabalazadeh, S.; Hosseini, M.; Ganjali, M.R. Enhanced peroxidase-like activity of platinum nanoparticles decorated on nickel- and nitrogen-doped graphene nanotubes: Colorimetric detection of glucose. *Mikrochim. Acta* 2019, 186, 385. [CrossRef] [PubMed]

Beigi, S.M.; Mesgari, F.; Hosseini, M.; Aghazadeh, M.; Ganjali, M.R.; Beigi, S. An enhancement of luminol chemiluminescence by cobalt hydroxide decorated porous graphene and its application in glucose analysis. *Anal. Methods* 2019, 11, 1346–1352. [CrossRef]

Yu, L.; Yang, Z.; An, M. Lab on the eye: A review of tear-based wearable devices for medical use and health management. *Biosci. Trends* 2019, 13, 308–313. [CrossRef]

Chen, L.; Tse, W.H.; Chen, Y.; McDonald, M.; Melling, J.; Zhang, J. Nanostructured biosensor for detecting glucose in tear by applying fluorescence resonance energy transfer quenching mechanism. *Biosens. Bioelectron.* 2017, 91, 393–399. [CrossRef]

Xiong, C.; Zhang, T.; Kong, W.; Zhang, Z.; Qu, H.; Chen, W.; Wang, Y.; Luo, L.; Zheng, L. ZIF-67 derived porous Co₃O₄ hollow nanopolyhedron functionalized solution-gated graphene transistors for simultaneous detection of glucose and uric acid in tears. *Biosens. Bioelectron.* 2018, 101, 21–28.

[CrossRef] [PubMed]

Chen, C.; Dong, Z.-Q.; Shen, J.-H.; Chen, H.-W.; Zhu, Y.-H.; Zhu, Z.-G. 2D Photonic Crystal Hydrogel Sensor for Tear Glucose Monitoring. *ACS Omega* 2018, 3, 3211–3217. [CrossRef]

[PubMed]

Tang, W.; Chen, C. Hydrogel-Based Colloidal Photonic Crystal Devices for Glucose Sensing. *Polymers* 2020, 12, 625. [CrossRef] [PubMed]

Ruan, J.-L.; Chen, C.; Shen, J.-H.; Zhao, X.-L.; Qian, S.-H.; Zhu, Z.-G. A Gelated Colloidal Crystal Attached Lens for Noninvasive Continuous Monitoring of Tear Glucose. *Polymers* 2017, 9, 125.

[CrossRef]

Zou, R.; Shan, S.; Huang, L.; Chen, Z.; Lawson, T.; Lin, M.; Yan, L.; Liu, Y. High-Performance Intraocular Biosensors from Chitosan-Functionalized Nitrogen-Containing Graphene for the Detection of Glucose. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020, 6, 673–679. [CrossRef]

Yuan, H.; Ji, W.; Chu, S.; Qian, S.; Wang, F.; Masson, J.-F.; Han, X.; Peng, W. Fiber-optic surface plasmon resonance glucose sensor enhanced with phenylboronic acid modified Au nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 2018, 117, 637–643. [CrossRef]

Zhu, J.; Du, H.-F.; Zhang, Q.; Zhao, J.; Weng, G.-J.; Li, J.-J.; Zhao, J.-W. SERS detection of glucose using graphene-oxide-wrapped gold nanobones with silver coating. *J. Mater. Chem. C* 2019, 7, 3322–3334. [CrossRef]

Aidinis, K.; Goudarzi, K.; Esmaeili, A.H. Optical sensor based on two-dimensional photonic crystals for measuring glucose in urine. *Opt. Eng.* 2020, 59, 057104. [CrossRef]

Inan, H.; Poyraz, M.; Inci, F.; Lifson, M.A.; Baday, M.; Cunningham, B.T.; Demirci, U. Photonic crystals: Emerging biosensors and their promise for point-of-care applications. *Chem. Soc. Rev.* 2017, 46, 366–388. [CrossRef] [PubMed]

Pilot, R.; Signorini, R.; Fabris, L. Surface-enhanced raman spectroscopy: Principles, substrates, and applications. In *Metal Nanoparticles and Clusters: Advances in Synthesis, Properties and Applications*; Deepak, F.L., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 89–164. [CrossRef]

Chen, Q.; Fu, Y.; Zhang, W.; Ye, S.; Zhang, H.; Xie, F.; Gong, L.; Wei, Z.; Jin, H.; Chen, J. Highly sensitive detection of glucose: A quantitative approach employing nanorods assembled plasmonic substrate. *Talanta* 2017, 165, 516–521. [CrossRef] [PubMed]

Go, A.; Kim, H.T.; Park, Y.J.; Park, S.R.; Lee, M.-H. Fabrication of Repeatedly Usable Pt-Electrode Chip Coated With Solidified Glucose Oxidase and Ascorbate Oxidase for the Quantification of Glucose in Urine. *IEEE Sens. Lett.* 2019, 3, 1. [CrossRef]

Pezhhan, H.; Akhond, M.; Shamsipur, M. A novel nanoplatform encapsulating glucose oxidase for spectrophotometric biosensing of hydrogen peroxide and glucose. *Anal. Methods* 2020, 12, 345–357.

[CrossRef]

Sun, Y.; Li, Y.; Wang, N.; Xu, Q.Q.; Xu, L.; Lin, M. Copper-based Metal-organic Framework for Non-enzymatic Electrochemical Detection of Glucose. *Electroanalysis* 2018, 30, 474–478.

[CrossRef]

Kafi, A.; Paul, A.; Vilouras, A.; Hosseini, E.S.; Dahiya, R.S. Chitosan-Graphene Oxide-Based Ultra-Thin and Flexible Sensor for Diabetic Wound Monitoring. *IEEE Sens. J.* 2020, 20, 6794–6801.

[CrossRef]

Xue, Q.; Li, Z.; Wang, Q.; Pan, W.; Chang, Y.; Duan, X. Nanostrip flexible microwave enzymatic biosensor for noninvasive epidermal glucose sensing. *Nanoscale Horizons* 2020, 5, 934–943.

[CrossRef] [PubMed]

Nyein, H.Y.Y.; Bariya, M.; Kivimäki, L.; Uusitalo, S.; Liaw, T.S.; Jansson, E.; Ahn, C.H.; Hangasky, J.A.; Zhao, J.; Lin, Y.; et al. Regional and correlative sweat analysis using high-throughput microfluidic sensing patches toward decoding sweat. *Sci. Adv.* 2019, 5, eaaw9906. [CrossRef]

Saasa, V.; Beukes, M.; Lemmer, Y.; Mwakikunga, B. Blood Ketone Bodies and Breath Acetone Analysis and Their Correlations in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics* 2019, 9, 224. [CrossRef]

Turner, C.; Walton, C.; Hoashi, S.; Evans, M. Breath acetone concentration decreases with blood glucose concentration in type I diabetes mellitus patients during hypoglycaemic clamps. *J. Breath Res.* 2009, 3, 046004. [CrossRef]

Liu, W.; Xu, L.; Sheng, K.; Zhou, X.; Dong, B.; Lu, G.; Song, H. A highly sensitive and moisture-resistant gas sensor for diabetes diagnosis with Pt@In₂O₃ nanowires and a molecular sieve for protection. *NPG Asia Mater.* 2018, 10, 293–308. [CrossRef]

Tankasala, D.; Linnes, J.C. Noninvasive glucose detection in exhaled breath condensate. *Transl. Res.* 2019, 213, 1–22. [CrossRef] [PubMed]

Shokrehodaie, M.; Quinones, S. Review of Non-Invasive Glucose Sensing Techniques: Optical, Electrical and Breath Acetone. *Sensors* 2020, 20, 1251. [CrossRef]

Juska, V.B.; Pemble, M.E. A dual-enzyme, micro-band array biosensor based on the electrodeposition of carbon nanotubes embedded in chitosan and nanostructured Au-foams on microfabricated gold band electrodes. *Analyst* 2020, 145, 402–414. [CrossRef] [PubMed]

A Wearable Cellulose Acetate-Coated Mouthguard Biosensor for In Vivo Salivary Glucose Measurement Takahiro Arakawa, Keisuke Tomoto, Hiroki Nitta, Koji Toma, Shuhei Takeuchi, Toshiaki Sekita, Shunsuke Minakuchi, and Kohji Mitsubayashi *Analytical Chemistry* 2020 92 (18), 12201-12207 DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01201 Chicago/Turabian Style

Santana-Jiménez, Luis A., Alfredo Márquez-Lucero, Velia Osuna, Ivan Estrada-Moreno, and Rocio B. Dominguez. 2018. "Naked-Eye Detection of Glucose in Saliva with Bienzymatic Paper-Based Sensor" *Sensors* 18, no. 4: 1071. <https://doi.org/10.3390/s18041071> Chicago/Turabian Style

Chen, Cheng, Xue-Ling Zhao, Zhan-Hong Li, Zhi-Gang Zhu, Shao-Hong Qian, and Andrew J. Flewitt. 2017. "Current and Emerging Technology for Continuous Glucose Monitoring" *Sensors* 17, no. 1: 182. <https://doi.org/10.3390/s17010182>

Naing C, Mak JW. Salivary glucose in monitoring glycaemia in patients with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. *J Diabetes Metab Disord*. 2017 Jan 21;16:2. doi: 10.1186/s40200-017-0287-5. PMID: 28127542; PMCID: PMC5251294.

Arakawa T, Kuroki Y, Nitta H, Chouhan P, Toma K, Sawada S, Takeuchi S, Sekita T, Akiyoshi K, Minakuchi S, Mitsubayashi K. Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor. *Biosens Bioelectron*. 2016 Oct 15;84:106-11. doi: 10.1016/j.bios.2015.12.014. Epub 2015 Dec 11. PMID: 26725934.

Ku M, Kim J, Won JE, Kang W, Park YG, Park J, Lee JH, Cheon J, Lee HH, Park JU. Smart, soft contact lens for wireless immunosensing of cortisol. *Sci Adv*. 2020 Jul 8;6(28):eabb2891. doi: 10.1126/sciadv.abb2891. PMID: 32923592; PMCID: PMC7455488.

Pullano SA, Greco M, Bianco MG, Foti D, Brunetti A, Fiorillo AS. Glucose biosensors in clinical practice: principles, limits and perspectives of currently used devices. *Theranostics*. 2022 Jan 1;12(2):493-511. doi: 10.7150/thno.64035. PMID: 34976197; PMCID: PMC8692922.

Reddy VS, Agarwal B, Ye Z, Zhang C, Roy K, Chinnappan A, Narayan RJ, Ramakrishna S, Ghosh R. Recent Advancement in Biofluid-Based Glucose Sensors Using Invasive, Minimally Invasive, and Non-Invasive Technologies: A Review. *Nanomaterials (Basel)*. 2022 Mar 25;12(7):1082. doi: 10.3390/nano12071082. PMID: 35407200; PMCID: PMC9000490.

Sitografia

www.marketdataforecast.com;

www.diabete.net;

www.siditalia.it;

www.epicentro.iss.it;

www.salute.gov.it;

www.who.int/health-topics/diabetes;

<http://ghdx.healthdata.org>;

www.neshnugenx.wordpress.com;

www.neosensory.com;

www.theory.labster.com;

www.researchgate.net;

www.biomedicalcue.it;

www.dri.hsr.it;

www.issalute.it;

www.traininglab-italia.com;