



Silvia Voci, Ph.D.  
Postdoctor fellow  
Department of Chemistry  
The University of North Carolina at Chapel Hill  
Chapel Hill, North Carolina, 27599  
silvi@email.unc.edu

# ELETTROCHEMILUMINESCENZA SU SCALE DIFFERENTI

***L'elettrochemiluminescenza (ECL) è applicata a sistemi chimici su diversi livelli dimensionali. Su scala molecolare, per la prima volta, è stato possibile registrare gli spettri di ECL circolarmente polarizzata per due enantiomeri di un sistema organico. Un'amplificazione dell'ECL via annichilazione è stata ottenuta in un dispositivo nano-fluidico. Infine, si riporta la descrizione di una microscopia ECL, applicata alla visualizzazione della membrana cellulare.***

Negli ultimi decenni, l'elettrochemiluminescenza (ECL) si è evoluta da semplice fenomeno di fotoemissione limitato ai laboratori di ricerca a potente strategia analitica, in particolare nell'ambito della bio-analisi. Il successo dell'ECL è da imputare alla sua duplice natura di evento fotochimico ed elettrochimico. I vantaggi forniti dalle classiche tecniche diagnostiche basate sulla fotoluminescenza, come elevata sensibilità e risoluzione spaziale, sono amplificati dalla peculiare modalità di generazione dello stato eccitato del luminoforo. L'elettro-generazione di intermedi altamente reattivi attraverso l'applicazione di un potenziale all'elettrodo offre un aumento della risoluzione temporale, spaziale, della sensibilità e una diminuzione di fotoemissioni indesiderate di fondo, come il fenomeno di autofluorescenza nei sistemi biologici. Successivamente, una serie di reazioni di trasferimento elettronico conduce dalle specie elettro-generate alla produzione dello stato eccitato, che decade per via radiativa.

È possibile distinguere due meccanismi principali: per annichilazione e mediante l'impiego di un co-reagente. Nel meccanismo di ECL per annichilazione, la generazione dello stato eccitato avviene mediante l'applicazione alternata di un potenziale di riduzione e di ossidazione, con la conseguente formazione del radical anione e del radical catione del luminoforo. La successiva reazione di annichilazione di tali specie altamente reattive conduce alla generazione dello stato eccitato e, quindi, all'emissione ECL.

Il fenomeno di fotoemissione ECL può essere indotto dall'applicazione di un singolo step di potenziale tramite l'impiego di un co-reagente, una specie che, mediante ossidazione o riduzione, genera un radicale altamente riducente o ossidante che reagisce con il luminoforo, rispettivamente ossidato o ridotto, con la conseguente produzione dello stato eccitato del luminoforo, che decade emettendo ECL.

Il meccanismo ECL per annichilazione necessita generalmente di un ambiente chimico altamente inerte, che riduca la possibilità di reazioni tra radical anione e catione del luminoforo con altre specie quali l'ossigeno, che comporterebbero uno spegnimento della fotoemissione. L'utilizzo di un co-reagente generalmente semplifica il meccanismo di fotoemissione, che può verificarsi efficientemente anche in soluzioni acquose e rappresenta il meccanismo principale nelle applicazioni bio-analitiche [1].

Le potenzialità dell'ECL come tecnica analitica hanno permesso la sua applicazione in un ampio intervallo dimensionale di sistemi chimici, dalla caratterizzazione di proprietà molecolari, all'analisi elettrochimica di singole entità (molecole, nanoparticelle, cellule etc.) alla microscopia di superficie. Nel 2019, per la prima volta è stato possibile distinguere l'emissione ECL di due enantiomeri in un sistema organico, registrando la polarizzazione circolare dell'ECL per entrambi gli enantiomeri di un sistema supramolecolare chirale (Fig. 1a). L'emissione dell'eccimeri del pirene ( $\lambda_{\max} = 500$  nm), un processo di decadimento radiativo bimolecolare favorito ad alte concentrazioni

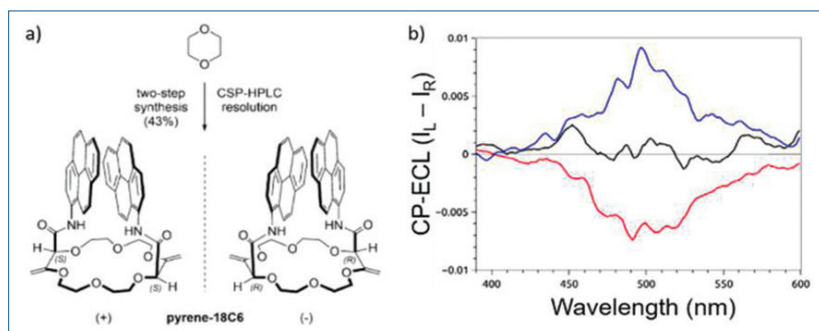


Fig. 1 - a) Struttura chimica del sistema supramolecolare [18]-C-6bispirene; b) ECL circolarmente polarizzata (CP-ECL, dove  $I_L$  e  $I_R$  corrispondono rispettivamente alle componenti sinistra e destra dell'emissione circolarmente polarizzata) dell'enantiomero (+)-[18]-C-6bispirene (linea rossa), (-)-[18]-C-6bispirene (linea blu) e della miscela racemica (linea nera). Gli spettri sono stati registrati in una soluzione [18]-C-6bispirene 0,7 mM/BPO 10 mM/TBAPF<sub>6</sub> 0,1M in acetonitrile. L'emissione ECL è stata ottenuta mediante l'applicazione di un potenziale di -2,45 V vs Ag per 240 s su un elettrodo di carbone vetroso. Da [2]

ni del luminoforo, è amplificato dalla posizione a cui le due molecole di pirene sono forzate dal legame covalente con l'etere-corona nel sistema supramolecolare. La misurazione di entrambi gli spettri di ECL circolarmente polarizzata (CP-ECL, Fig. 1b) è stata possibile non solo grazie all'aumentata intensità e stabilità temporale della fotoemissione, ma anche ad un caratteristico elevato fattore di dissimetria

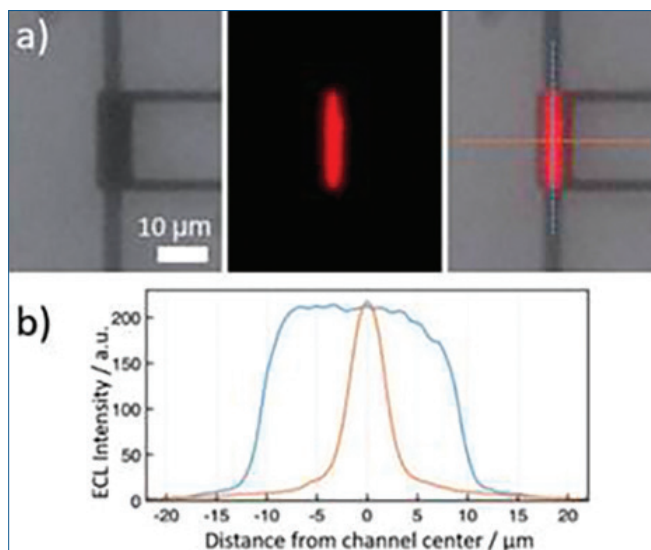


Fig. 2 - a) Da sinistra a destra: immagine ottica del dispositivo nanofluidico, particolare del nanocanale composto dai due elettrodi di platino, immagine ECL, sovrapposizione dell'immagine ottica e ECL (direzioni dei profili di intensità riportati in b); b) profili di intensità ECL parallelo (linea blu) e perpendicolare (linea arancione) all'asse longitudinale del canale nanofluidico. Un potenziale di 2 V vs Ag e di -1,5 V vs Ag sono stati applicati rispettivamente ai due elettrodi, in una soluzione di  $Ru(bpy)_3(PF_6)_2$  10 mM e TBAPF<sub>6</sub> 0,1 M in acetonitrile. Da [4]

(nella spettroscopia di luminescenza circolarmente polarizzata, la differenza delle due componenti della radiazione polarizzata, sinistra e destra, divisa per la media dell'intensità totale dell'emissione) [2]. In seguito, è stata possibile la rilevazione del fattore di dissimetria ECL di entrambi gli enantiomeri di un derivato del complesso  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ , il luminoforo ECL più diffuso nelle applicazioni biologiche, anche a livello commerciale. Questo studio apre la via allo sviluppo di nuovi sistemi analitici, in cui la variazione dell'ambiente chirale, anche all'interno di una singola cellula, potrà essere rilevata mediante ECL, senza il

rischio di degradazione del campione biologico per foto-eccitazione e con una drastica diminuzione della fotoemissione di fondo [3]. Negli ultimi anni, la combinazione dell'emissione ECL con sistemi elettrochimici nano-confinati ha permesso un'amplificazione dell'intensità ECL e, ad esempio, la visualizzazione tramite emissione di una concentrazione attomolare del complesso  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ . La Fig. 2a mostra un dispositivo nano-fluidico, caratterizzato all'interno da due elettrodi di platino disposti parallelamente con una sovrapposizione di 30  $\mu m$  ed una distanza di 100 nm l'uno dall'altro. Attraverso l'applicazione contemporanea ai due elettrodi rispettivamente di un potenziale sufficiente alla riduzione di  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$  a  $[Ru(bpy)_3]^+$  e all'ossidazione di  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$  a  $[Ru(bpy)_3]^{3+}$  l'immagine dell'emissione ECL via annichilazione è stata registrata in condizioni ambientali [4].

Un esempio significativo della potenza analitica dell'ECL e del valore complementare con altre tecniche analitiche applicate all'analisi e alla diagnostica per immagini è fornito dai recenti studi concernenti la visualizzazione della membrana cellulare a livello di singola cellula attraverso emissione ECL. Cellule CHO (Chinese Hamster Ovary cells) sono state incubate sulla superficie di un elettrodo in carbone vetroso e, successivamente alla crescita cellulare, le proteine di membrana sono state marcate con il luminoforo  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ . L'immagine di fotoluminescenza riportata in Fig. 3a dimostra come tutta la superficie della membrana cel-

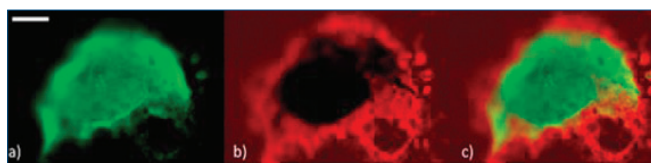


Fig. 3 - a) Immagine di fotoluminescenza; b) ECL e c) sovrapposizione di entrambe le immagini di una cellula CHO, marcata con  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . L'immagine ECL è stata ottenuta in una soluzione di TPA 0,1 M in tampone fosfato (pH=7,4), applicando un potenziale di 1,4 V vs Ag/AgCl, scale bar = 10  $\mu\text{m}$  [5]

lulare sia marcata con  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . Applicando un potenziale anodico in presenza di un eccesso del co-reagente tripropilammina (TPA), è stata possibile la registrazione dell'immagine ECL (Fig. 3b). L'emissione appare ora limitata alle regioni più esterne della membrana cellulare a contatto con l'elettrodo, con un aumento della risoluzione in queste aree. Nel caso in cui il luminoforo ECL sia immobilizzato sulla superficie di un oggetto micrometrico (ad esempio una cellula), l'ossidazione all'elettrodo è limitata alle molecole luminescenti che sono immobilizzate ad una distanza nanometrica dall'elettrodo. Il meccanismo ECL predominante consiste nell'ossidazione all'elettrodo del co-reagente TPA, con la conseguente generazione dei due radicali  $\text{TPA}^+$  e  $\text{TPA}^\cdot$ , entrambi coinvolti nella formazione dello stato eccitato  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ . La limitata stabilità dei due radicali elettro-generati confina l'emissione ECL a pochi micrometri dalla superficie dell'elettrodo, con un massimo ad una distanza di circa 1  $\mu\text{m}$ . Tutti i fotoni emessi in fotoluminescenza al di fuori del piano focale dell'immagine non sono quindi presenti nell'immagine ECL. Il confinamento alla superficie dell'emissione ECL aumenta la risoluzione dell'immagine della membrana cellulare basale, fornendo informazioni complementari all'immagine ottenuta in epifluorescenza. Successivamente, l'introduzione di un passaggio di permeabilizzazione della membrana cellulare ha condotto alla misurazione di un'emissione ECL omogeneamente distribuita a livello dell'intera membrana basale.

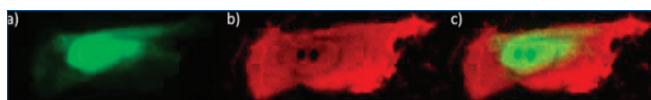


Fig. 4 - a) Immagine di fotoluminescenza; b) ECL e c) sovrapposizione di entrambe le immagini di una cellula CHO permeabilizzata, marcata con  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . L'immagine ECL è stata ottenuta in una soluzione di TPA 0,1 M in tampone fosfato (pH=7,4), applicando un potenziale di 1,4 V vs Ag/AgCl, scale bar = 10  $\mu\text{m}$  [5b]

In Fig. 4, le immagini di fotoluminescenza e ECL di una cellula permeabilizzata dimostrano come tutta la superficie basale della cellula all'interfaccia con l'elettrodo emetta ECL. Le due regioni nere (Fig. 4b) sono riconducibili a zone ad alta densità all'interno del nucleo (nucleoli), che non permettono la diffusione dei radicali del co-reagente, fornendo potenzialmente informazioni sul trasporto passivo di specie al livello cellulare.

Un ulteriore passo verso applicazioni in bio-diagnostica è stato compiuto sostituendo l'elettrodo in carbone vetroso con un dispositivo con un substrato costituito da un vetrino per microscopio e un materiale elettrodico in nanotubi di carbonio. Gli studi qui riportati evidenziano le potenzialità del fenomeno ECL nello studio di processi molecolari fondamentali (elettrochimici e non) nell'analisi di sistemi nano- e microconfinati e ad un livello dimensionale più elevato, nella descrizione e risoluzione di processi biologici a livello di singola cellula.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] a) M.M. Richte, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 3003; b) W. Miao, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2506; c) A.J. Bard, *Electrogenerated Chemiluminescence*, M. Dekker, New York, 2004; d) Z. Liu, W. Qi, G. Xu, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3117.
- [2] F. Zinna, S. Voci *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, **58**, 6952.
- [3] S. Voci, F. Zinna *et al.*, *Chem. Comm.*, 2020, **56**, 5989.
- [4] H. Al-Kutubi, S. Voci *et al.*, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 8946.
- [5] a) G. Valenti, S. Scarabino *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 16830; b) S. Voci, B. Goudeau *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 14753.

## Electrochemiluminescence at Different Scales

Fundamental aspects of electrochemiluminescence (ECL) as well as analytical applications at different scales are treated. At a molecular scale, the first report of circularly polarized ECL for an organic system is exposed. By nano-confinement of an ECL luminophore, annihilation ECL is enhanced by exploiting nanogap amplification. Finally, the first steps in the development of a new ECL-based microscopy, with a peculiar surface-confinement, are presented.