



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI PRINCIPI ED IMPIANTI DI INGEGNERIA CHIMICA "I. SORGATO"

**TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA CHIMICA  
PER LO SVILUPPO SOSTENIBILE**

**INTEGRAZIONE DI BIOSENSORI MICRO STRUTTURATI IN  
PIATTAFORME MICROFLUIDICHE PER ANALISI IN LINEA DI  
METABOLITI**

*Relatore: Ing. Nicola Elvassore*  
*Correlatore: Dott. Francesco Lamberti*

*Laureanda: Francesca Longinotti*

ANNO ACCADEMICO 2010 – 2011



# Sommario

Il presente lavoro di tesi tratta l'integrazione di biosensori microstrutturati all'interno di dispositivi microfluidici, allo scopo di rilevare con continuità la concentrazione di composti biologici d'interesse in un mezzo fluido.

L'accoppiamento ottimale è stato attuato tenendo conto dei vincoli fondamentali emersi nell'approccio allo studio al sistema: la geometria del circuito microfluidico è stata progettata in maniera tale da consentire un buon controllo di immersione degli elettrodi, per garantire l'accertamento di un sufficiente livello di immersione dell'estremità attiva del biosensore.

Il dispositivo microfluidico è stato pensato inoltre per assicurare una buona tenuta idraulica in diverse condizioni di flusso. Un ulteriore requisito imprescindibile è stata la necessità di conseguire un regime fluidodinamico tale da evitare la formazione di volumi morti nel canale.

La caratterizzazione del sistema è stata condotta con tecniche elettroanalitiche, che forniscono una risposta in corrente direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione.

Con i medesime metodi è stato indagato il ruolo delle variabili che giocano un ruolo chiave nell'analisi del sistema in flusso, quali la portata ed il tempo di risposta del sistema.



# Indice

<b>INTRODUZIONE</b>	1
<b>CAPITOLO 1: Stato dell'arte</b>	3
1.1 Biosensori elettrochimici	3
1.2 Biosensori e microfluidica	5
1.3 Motivazioni e obiettivo della tesi	7
<b>CAPITOLO 2: Materiali e metodi</b>	9
2.1 Misura di glucosio: biosensore amperometrico	9
2.2 Tecniche elettroanalitiche	12
2.2.1 Trasporto di materia in sistemi elettrochimici	14
2.2.2 Cronoamperometria	15
2.3 Sistema di acquisizione dei dati	16
2.3.1 Potenziosato-galvanostato	16
2.4 Tecniche di microfabbricazione	18
2.4.1 Fotolitografia	18
2.4.1.1 Realizzazione della fotomaschera	19
2.4.1.2 Pretrattamento del wafer	19
2.4.1.3 Deposizione del polimero	20
2.4.1.4 Preriscaldamento ed esposizione	20
2.4.1.5 Riscaldamento e sviluppo	21
2.4.2 Soft litografia	22
2.4.3 Adesione tramite Plasma	24
2.5 Sistema di regolazione delle portate	25
2.6 Preparazione dell'apparato sperimentale	26
2.7 Procedura sperimentale ottimale per le prove in flusso	27
<b>CAPITOLO 3: Validazione e risultati preliminari</b>	31
3.1 Cronoamperometria in statica	31
3.2 Taratura del biosensore	33

3.3 Accoppiamento biosensore piattaforma-microfluidica	35
3.3.1 Vincoli progettuali	35
3.3.2 Prove di tenuta	37
3.4 Prove preliminari in flusso	38
<b>CAPITOLO 4: Risultati</b>	43
4.1 Effetto della portata sulla corrente	43
4.1.1 Prove in flusso con soluzioni di glucosio e acqua ossigenata	43
4.2 Tempi di risposta del sistema	49
<b>CONCLUSIONI</b>	51
<b>APPENDICE A</b>	51
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	53
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	55

# Introduzione

L'evoluzione delle metodologie per il monitoraggio del glucosio è stato il target primario di molti gruppi di ricerca, in modo particolare in ambito clinico, per lo sviluppo di terapie per la cura del diabete mellito, ed in ambito diagnostico, per lo sviluppo e lo screening di farmaci.

L'accertamento del livello di glucosio basato su campionamenti discreti non garantisce però un controllo sufficientemente stretto, in quanto in generale il campionamento è infrequente se confrontato con la scala temporale delle fluttuazioni del valore di glucosio nel sangue. Sarebbe quindi auspicabile l'osservazione di tale parametro con continuità. Per la rilevazione continua del glucosio, e simultaneamente di altri parametri fisiologici, si è posta quindi la necessità di sviluppare sistemi di biosensori stabili e molto accurati in grado di garantire la rilevazione in linea dei composti d'interesse.

Le tecnologie microfluidiche offrono da questo punto di vista le migliori opportunità, grazie agli innumerevoli vantaggi che offrono.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quindi quello di realizzare un dispositivo microfluidico integrato con biosensori microstrutturati per la rilevazione in linea di parametri biologici fondamentali.

Per la messa in opera del chip miniaturizzato sono state adottate tecniche di micro fabbricazione. La caratterizzazione del sistema è stata fatta con l'ausilio di metodi elettroanalitici, in quanto presentano i privilegi di un' agevole miniaturizzazione ed una buona adattabilità a i sistemi micro fabbricati più avanzati.

Le prove sperimentali effettuate in statica ed in dinamica sono servite per mettere a fuoco le variabili cruciali del sistema in esame.

Nel primo capitolo è presente una breve panoramica dello stato della tecnica per quanto concerne la biosensoristica, in particolare i biosensori elettrochimici amperometrici e l'unione di questi strumenti con dispositivi microfluidici.

Il capitolo 2 descrive nel dettaglio i materiali ed i metodi utilizzati per la messa a punto della piattaforma. Viene fornita una descrizione dettagliata della struttura e del principio di funzionamento del biosensore amperometrico utilizzato, cui fa seguito una rassegna particolareggiata delle tecnologie di microscala impiegate per la realizzazione del chip, della strumentazione ausiliaria e delle procedure di cui ci si è serviti per l'allestimento della parte sperimentale.

Il capitolo 3 introduce alle prove sperimentali preliminari per l'individuazione delle problematiche connesse al passaggio da un sistema statico ad uno dinamico. Con tali

esperimenti sono state messe a fuoco le variabili che assumono un ruolo chiave nella caratterizzazione del sistema.

E' inoltre descritta la progettazione del circuito microfluidico ed il successivo accoppiamento con i biosensori.

Nell'ultimo capitolo vengono esposti e discussi i risultati finali, relativamente all'effetto della portata, che dalle valutazioni precedenti è risultata la variabile controllante per la rilevazione del glucosio. Vengono inoltre citate le problematiche associate alla dilatazione dei tempi di risposta del sistema.

In conclusione si fa cenno alle prospettive future ipotizzate per ottimizzare il funzionamento della piattaforma microfluidica.

# Capitolo 1

## Stato dell'arte

Il presente capitolo fornisce un approccio orientativo al settore dei biosensori elettrochimici, con particolare riguardo ai biosensori enzimatici, ovvero quelli che sfruttano le proprietà redox degli enzimi come molecole biologiche di riconoscimento. A questo fa seguito un paragrafo che descrive lo stato della tecnica per quanto riguarda l'interfacciamento dei biosensori con dispositivi microfluidici.

Il capitolo si chiude poi con la spiegazione delle motivazioni che ci hanno condotto ad investigare tale ambito e gli obiettivi che abbiamo individuato quali target finali dello studio.

### 1.1 Biosensori elettrochimici

Tra i metodi di trasduzione sviluppati nella tecnologia dei biosensori, i principali sono sicuramente gli ottici, gli elettrochimici ed i piezoelettrici.

I biosensori ottici si fondano su metodi di rilevamento quali la spettroscopia di fluorescenza, la chemiluminescenza o ancora sulla misura dell'indice di rifrazione e della riflettanza e sono spesso accoppiati con reazioni catalitiche enzimatiche per la rilevazione di substrati di interesse clinico.

Essi garantiscono un'elevata sensibilità, una buona facilità di operazioni e offrono come vantaggio grandi accuratezza e capacità di rilevamento.

Il funzionamento dei biosensori piezoelettrici si basa sull'impiego di materiali che vibrano sotto l'influenza di un campo elettrico esterno alternato, tipicamente i cristalli di quarzo. La frequenza di risonanza varia in modo direttamente proporzionale al variare della massa del materiale a seguito di fenomeni di adsorbimento o disadsorbimento superficiali. I principali ostacoli all'uso di questo tipo di biosensori sono l'interferenza dell'umidità atmosferica e la difficoltà nello studio di materiali in soluzione. Tuttavia sono economici, piccoli e molto solidi ed in grado di fornire una risposta in tempi piuttosto rapidi.

Un biosensore elettrochimico è un dispositivo completo e integrato capace di fornire informazioni analitiche specifiche, quantitative o semiquantitative, usando un elemento di riconoscimento biologico in diretto contatto spaziale con un trasduttore elettrochimico (*Thevenot D. R. et al., 2001*).

I biosensori basati su trasduttori elettrochimici sono quelli più comunemente usati per le analisi chimiche ed anche i più frequentemente citati in letteratura (*Heller A. et al., 1996* e *Meadows D., 1996*), grazie all' elevata specificità, al basso LOD (Limit of Detection) e alla libertà da interferenze con la matrice; le opportunità della ricerca in quest'ambito includono prestazioni elevate la possibilità di sviluppi produttivi di diverse metodologie (*Conroy P. J. et al., 2009*).

I biosensori di tipo elettrochimico inoltre sono quelli che esibiscono una migliore predisposizione ad essere miniaturizzati ed integrati in sistemi microfluidici.

Il principio di funzionamento di un sensore elettrochimico è il seguente: una specie chimica, non elettroattiva, reagisce con l'elemento biologico sensibile immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo. Il prodotto di questa reazione è un elemento o composto elettroattivo che diffonde sulla superficie elettrodica e genera un segnale elettrico che viene rilevato da uno strumento e messo in relazione alla concentrazione del metabolita in esame. I biosensori elettrochimici si basano sulla rilevazione delle variazioni di proprietà elettrochimiche; in particolare trovano largo impiego i sensori amperometrici, potenziometrici e conduttometrici.

Nei biosensori potenziometrici l'elettrodo indicatore, generalmente un elettrodo ionoselettivo, sviluppa un potenziale variabile a seconda dell'attività o della concentrazione di uno specifico analita in soluzione.

Anche le variazioni della conduttività della soluzione è una proprietà adottata nel meccanismo di trasduzione in molti biosensori. Questi strumenti prevedono l'applicazione di un potenziale alternato tra due elettrodi inerti, e la successiva rilevazione della capacità degli ioni in soluzioni di trasportare la corrente. Molte reazioni enzimatiche che inducono una variazione della forza ionica del campione possono essere monitorate con dispositivi conduttometrici.

L'amperometria è forse però il metodo più comune di trasduzione utilizzato nello sviluppo di biosensori, in ragione della grande specificità e dell'ampio range di linearità che esibiscono. La maggior parte dei biosensori amperometrici utilizzano enzimi come elemento di riconoscimento biologico e si può senz'altro affermare che il sensore enzimatico del glucosio domina l'industria dei biosensori, grazie al settore in continua evoluzione del *self-testing* e del monitoraggio continuo del glucosio (*Toghill K. E. e Compton R.G., 2010*). Esso generalmente utilizza la glucosidasi come interfaccia biocatalitica ancorata alla superficie solida.

Ad oggi esistono tre differenti approcci alla realizzazione di un sensore enzimatico per il glucosio. I sensori di prima generazione dipendono dalla presenza dell'ossigeno come co-substrato per la rigenerazione della glucosidasi. I sensori di seconda generazione, introducono l'uso di co-substrati sintetici quali mediatori elettron-accettori che facilitano il trasferimento elettronico. Un numero vastissimo di mediatori non fisiologici è riportato

in letteratura, compresi derivati del ferricianuro (*Mulchandani A. e Pan S., 1999*) e complessi formati da metalli di transizione (*Taylor C. e al., 1995*). Tuttavia esiste il rischio che l'ossigeno entri in competizione con il mediatore nella reazione e che questo causi un accumulo di perossido di idrogeno, la specie elettroattiva che si scarica in all'elettrodo inoltre c'è il rischio che il mediatore reagisca con altre specie interferenti aggiungendo un ulteriore grado di incertezza nella misura. Negli ultimi anni, il sensore enzimatico di glucosio più innovativo che sia stato sviluppato è quello proposto da Heller (*Heller A. e Feldman B., 2010*), che utilizza la glucodeidrogenasi in opposizione alla glucosidasi ed un mediatore redox a base di osmio.

I sensori enzimatici di glucosio di terza generazione invece coinvolgono il trasferimento diretto degli elettroni tra enzima ed elettrodo, senza la necessità di mediatori naturali o sintetici.

L'utilizzo di sensori elettrochimici non enzimatici sembra tuttavia essere un potenziale candidato per una verosimile quarta generazione di sensori per l'ossidazione del glucosio a scopo analitico; questa tipologia di sensori si prefigge l'ossidazione diretta dell'analita nel campione.

Tuttavia, nonostante decenni di ricerche nel campo della sensoristica non enzimatica, i problemi connessi con questo tipo di approccio hanno fino ad ora impedito l'applicazione pratica di tali strumenti. Il problema principale è legato alla mancanza di selettività, ma anche le cinetiche piuttosto lente dei processi redox in corrispondenza a superfici puramente metalliche e lo sporcamento dell'elettrodo da parte dei costituenti del campione contribuiscono ad aumentare le complicazioni dell'utilizzo.

Inoltre anche il numero limitato di sistemi applicabili a pH fisiologico potrebbe rappresentare un ostacolo aggiuntivo.

## 1.2 Biosensori e microfluidica

L'accresciuta accessibilità delle tecniche di microfabbricazione e l'arricchita schiera di componenti microfluidici attivi ha incoraggiato lo sviluppo di micro laboratori per *total-analysis* ( $\mu$ -TAS), in particolare per applicazioni bioanalitiche (*Amatore C. et al, 2008*).

Lo scopo finale è quello di sviluppare dei dispositivi di misura per analisi centralizzate e congegni microfluidici stanno trovando crescente applicazione; tuttavia, un corretto funzionamento dei  $\mu$ -TAS è strettamente subordinato alla corretta miniaturizzazione di tutta la strumentazione corrispondente

A tale scopo, il rilevamento con tecniche elettrochimiche offre grandissimi vantaggi, primo fra tutti la facile miniaturizzazione, i bassi costi e consumi, il basso limite inferiore di rilevabilità e la compatibilità con sistemi avanzati di microfabbricazione. (*Pumera M. et al. 2006*), oltre all'elevatissima portabilità.

La combinazione di tecniche microfluidiche e rilevamento elettrochimico fornisce inoltre il vantaggio di una manipolazione precisa di piccoli volumi di campione in canali miniaturizzati, elevata sensibilità e tempi di risposta molto rapidi.

Per questi innumerevoli benefici l'integrazione di sensori elettrochimici con sistemi micrometrici trova applicazione in ambiti piuttosto disparati.

Molti dispositivi microfluidici sono stati messi a punto per processi di elettroforesi capillare, che in condizioni microfluidiche consentono l'utilizzo di volumi di fluidi molto ridotti e tempi di analisi molto brevi. Tuttavia c'è la possibilità che si creino dei problemi per il fatto che potrebbero esserci delle interferenze tra la misura amperometrica ed il campo elettrico applicato. Per ovviare a questi impedimenti è stata scoperta la possibilità di sopprimere il voltaggio senza un significativo allargamento della banda, adottando una geometria che preveda un rapido allargamento della sezione trasversale del canale principale immediatamente in corrispondenza dell'elettrodo rilevatore.

Questo comporta una riduzione della resistenza nel volume di soluzione tra il lavorante e gli elettrodi elettroforetici ed inoltre un piccolo voltaggio residuo all'elettrodo rilevatore (*Kappes T. e Hauser P. C., 2000*).

Un altro modo per limitare il fenomeno è quello di utilizzare il cosiddetto *disaccoppiatore*, vale a dire un materiale poroso attraverso cui la soluzione può entrare in contatto con l'elettrodo elettroforetico superficiale.

Uno dei vantaggi dell'introduzione di tecnologie di microscala è inoltre la possibilità di acquisire simultaneamente una vasta quantità di informazioni attraverso lo sviluppo di esperimenti multiparametrici, che consentono di ottenere un elevato numero di risultati con una singola prova. Quando più sostanze devono essere misurate simultaneamente, ci sono buone possibilità che abbiano luogo fenomeni di cross talk tra elettrodi adiacenti.

Il problema può essere risolto collocando l'elettrodo in un contenitore dedicato (*Perdomo J. et al., 2000*) o adottando un rivestimento a membrana che riduca il cross talk (*Moser I. et al., 2002*). Alternativamente è stato proposto l'impiego di un separatore tra gli elettrodi o ancora l'utilizzo di un regime laminare caratterizzato dai valori bassissimi del numero di Reynolds.

Moltissime tipologie di biosensori integrati in piattaforme microfluidiche prevedono la funzionalizzazione dell'elettrodo all'interno del canale microfluidico quale step intermedio della fase di lavorazione; tale approccio non sembra conveniente in quanto il dispositivo non può essere fabbricato in un singolo step e le fasi di lavorazione successive sono limitate in quanto trattamenti termici potrebbero rovinare l'enzima termosensibile.

Frey ed il suo gruppo hanno proposto l'utilizzo di una sorta di cartuccia per analisi multi-analita in flusso continuo (*Frey O. et al., 2010*). In questo dispositivo la funzionalizzazione dell'elettrodo avviene al termine della fabbricazione del dispositivo. Un ulteriore vantaggio offerto da questo apparecchio è quello di poter controllare

direttamente in flusso il range di risposta lineare attraverso la generazione di uno strato di diffusione dinamica.

Dal punto di vista dei materiali utilizzati, accanto ai dispositivi microfluidici che utilizzano supporti silicati si sono sviluppati sostegni basati su materiali polimerici, primo fra tutti il polidimetilsilossano (PDMS) ma anche polimetilmetacrilato (PMMA) e polietilentereftalato (PET).

I primi esibiscono numerose prerogative, quali stabilità chimica, proprietà superficiali e isolanti ben note mentre i vantaggi associati all'utilizzo di materiali polimerici sono facilità di fabbricazione, che non necessita di tecnologie di microlavorazione troppo avanzate, maggiore resistenza alle sollecitazioni meccaniche rispetto ai materiali vetrosi, economicità e facilità di smaltimento.

### **1.3 Motivazioni e obiettivo della tesi**

L'evoluzione delle metodologie per il monitoraggio del glucosio è stato il target primario per lo sviluppo di terapie per la cura di molte patologie, prima fra tutte del diabete mellito di tipo 2. L'accertamento del livello di glucosio basato su campionamenti discreti non garantisce però un controllo sufficientemente stretto, in quanto in generale il campionamento è infrequente se confrontato con la scala temporale delle fluttuazioni del valore di glucosio nel sangue. Sarebbe quindi auspicabile l'osservazione di tale parametro con continuità; questo consentirebbe da un lato una maggiore efficacia delle terapie già consolidate ed all'altro la possibilità di effettuare screening farmacologici che consentano di osservare la dinamica del glucosio.

Le tecnologie di microscala offrono moltissimi vantaggi da questo punto di vista

Il presente lavoro di tesi si colloca proprio in questo contesto e si pone l'obiettivo di realizzare un sistema di monitoraggio per il glucosio che sia tuttavia applicabile a diversi parametri biologici d'interesse e che si avvalga di tecniche analitiche di tipo elettrochimico.

Il target finale è la realizzazione di una piattaforma microfluidica integrata con i biosensori, con la difficoltà di accoppiare un dispositivo di misura sviluppato per sistemi statici ad un apparato in flusso.

Queste esigenze si traducono, da un lato, nel realizzare un supporto polimerico che assicuri la buona perfusione dell'estremità attiva del biosensore e che contemporaneamente garantisca una buona tenuta idraulica e resistenza meccanica agli elettrodi; dall'altro nell'indagare dal punto di vista elettrochimico il comportamento del sistema al fine di individuare le condizioni di esercizio ottimali.



# Capitolo 2

## Materiali e metodi

Il seguente capitolo offre una panoramica dei materiali e delle tecnologie impiegate nel presente lavoro di tesi. In primo luogo si ha una descrizione in dettaglio del biosensore, di come esso venga realizzato e degli accorgimenti da utilizzare in fase di trasporto e per una corretta conservazione.

L'apparecchiatura utilizzata per l'acquisizione dei dati è un potenziostato-galvanostato, di cui verrà esposto concisamente il principio di funzionamento, mentre la tecnica elettroanalitica sfruttata nell'esecuzione delle misure sperimentali è la cronoamperometria, che sarà illustrata in breve.

Per quanto concerne l'aspetto di microfabbricazione, saranno presentate le tecniche a cui si è ricorsi per la messa a punto della piattaforma microfluidica nelle diverse fasi della sua realizzazione.

L'ottenimento del master rigido è avvenuto attraverso fotolitografia, tecnica che consente di imprimere una geometria desiderata su un wafer di silicio mediante deposizione su di esso di un polimero fotosensibile. La realizzazione del chip finale è stata effettuata con la tecnica della soft litografia, che prevede la modellazione di una resina siliconica sul suddetto stampo.

### 2.1 Misura di glucosio: biosensore amperometrico

I biosensori usati nel presente lavoro di tesi sono progettati e realizzati dal gruppo di ricerca del Prof. P.A.Serra dell'Università di Sassari. Per una trattazione più approfondita si rimanda alla letteratura specifica (P. A. Serra e al., 2006).

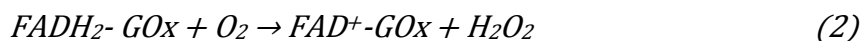
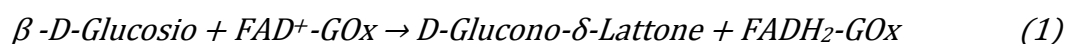
Il biosensore amperometrico per la rilevazione del glucosio è un microelettrodo di forma cilindrica, costituito da un filo di platino/iridio (90%/10%) della lunghezza di 40 mm e del diametro di 0,125 mm e dotato di un rivestimento esterno di Teflon®. L'elemento sensibile dell'elettrodo è la parte terminale del filo metallico, che è ricoperta da uno strato sottile di politerimmide (PEI) nel quale viene fissato l'enzima glucosidasi (GOx), e sulla quale viene poi depositato un ulteriore film poliuretano.

La glucosidasi è legata covalentemente al flavina-adenina-dinucleotide (FAD) ed è estremamente affidabile grazie alla sua ottima sensibilità al substrato. L'immobilizzazione dell'ossidoreduttasi avviene con una serie di trattamenti che

prevedono la rimozione del rivestimento di politetrafluoroetilene con uno scalpello, lasciando esposta la superficie metallica per una lunghezza pari ad 1 mm.

Tale parte di filo viene immersa per 5 minuti in una soluzione contenente l'enzima per consentirne l'assorbimento sul metallo. Dopo essiccazione all'aria, l'estremità attiva viene nuovamente trattata con una soluzione di phosphate buffered saline (PBS) contenente o-fenilendiammina che, in seguito ad un processo di elettropolimerizzazione, forma una sottile membrana porosa selettivamente permeabile sulla superficie elettrodica. La deposizione del film polimerico favorisce il fissaggio dell'enzima munendolo inoltre di una barriera contro lo sporco ed accrescendone la stabilità.

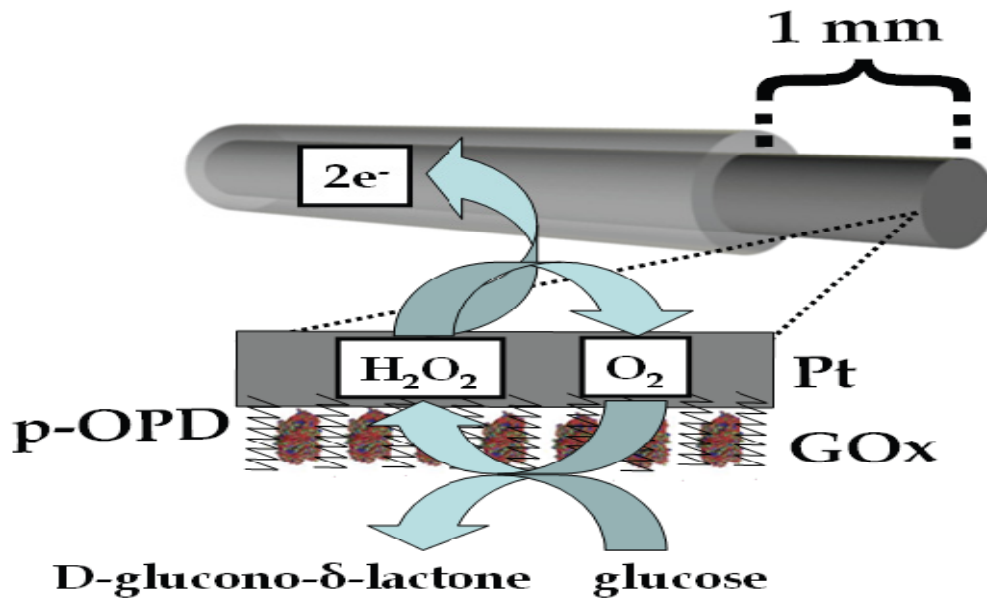
La rilevazione del glucosio basata sulla reazione enzimatica avviene secondo lo schema:



L'applicazione del potenziale positivo all'elettrodo genera una corrente proporzionale alla concentrazione di acqua ossigenata, che si ossida secondo la reazione:



Si noti come il flusso di elettroni è innescato dalla reazione di scarica del perossido di idrogeno ed è quindi funzione della concentrazione di quest'ultimo; tuttavia, l'acqua ossigenata si produce in quantità stechiometrica rispetto al glucosio reagente nel primo stadio del processo e la corrente prodotta risulta proporzionale alla concentrazione di glucosio nell'analita. Fondamentale perchè avvenga la reazione redox tra enzima e substrato è che il pH della soluzione si mantenga sempre intorno al valore di 7.4



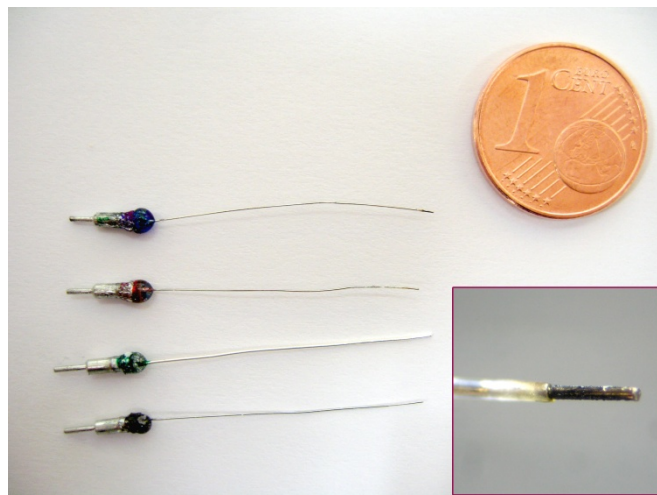
**Figura 2.1:** Biosensore amperometrico per la rilevazione del glucosio e rappresentazione grafica della reazione di ossidazione in due stadi

La parte funzionale del microelettrodo è molto delicata perché la GOx è facilmente deperibile.

Di conseguenza l'esposizione prolungata a temperatura ambiente e le sollecitazioni meccaniche tendono a ridurre in misura significativa la vita utile del biosensore.

Per minimizzare la perdita di attività catalitica dovuta a questi due fattori, la corretta conservazione degli elettrodi nei momenti di inutilizzo prevede che siano mantenuti alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ , all'interno dei sostegni in plastica per evitare che l'estremità enzimatica tocchi le pareti dei contenitori dove viene conservato.

Una volta accoppiati irreversibilmente con la piattaforma, l'intera struttura, se non in uso, viene ricollocata all'interno del congelatore.



**Figura 2.2:** Biosensore di lattato (blu), biosensore di glucosio (rosso), microelettrodo di riferimento e microelettrodo ausiliario; nel riquadro particolare dell'estremità sensibile del biosensore, contenente l'enzima.

## 2.2 Tecniche elettroanalitiche

I metodi elettrochimici si basano sulla misura della risposta elettrica fornita dal campione e ne consentono la correlazione con la concentrazione dell'analita presente in soluzione.

In sostanza si tratta di monitorare il trasferimento di elettroni in corrispondenza all'interfaccia elettrodo-soluzione durante il processo di ossido-riduzione che coinvolge l'analita, secondo la reazione:



dove  $O$  ed  $R$  costituiscono rispettivamente le forme ossidate e ridotte della coppia redox.

Il trasferimento elettronico ha luogo solamente se il potenziale applicato all'elettrodo è contenuto in una finestra tale per cui il processo redox è termodinamicamente e cineticamente favorito.

Se ciò si verifica, la concentrazione della forma ossidata e di quella ridotta della specie elettroattiva possono essere ricavate grazie alla legge di Nernst:

$$E = E^\circ + \frac{2.3RT}{nF} \log \frac{CO(0,t)}{CR(0,t)} \quad (5)$$

Dove  $E^\circ$  è il potenziale standard della coppia redox,  $R$  la costante universale dei gas perfetti,  $T$  la temperatura in gradi Kelvin,  $n$  il numero di elettroni trasferiti nella reazione ed  $F$  la costante di Faraday.

Applicando valori di potenziali inferiori al potenziale standard è cineticamente favorita la formazione della specie ridotta.

La corrente dovuta alla riduzione della forma ossidata obbedisce alla legge di Faraday, secondo cui la massa di sostanza prodotta all'elettrodo durante un processo elettrochimico è proporzionale alla quantità di carica passata, ovvero 96485 C causano la formazione di un equivalente di prodotto.

La corrente associata alla semireazione di riduzione viene detta corrente faradica ed è quella che viene normalmente indagata nello studio dei processi elettrochimici.

Ad questi si contrappongono i processi non-faradici, che hanno luogo quando una definita interfaccia elettrodo-soluzione esibisce un certo intervallo di potenziale in cui non si verificano reazioni di trasferimento di carica, perché cineticamente o termodinamicamente sfavorite. Tali processi sono processi di assorbimento o disassorbimento che modificano la struttura dell'interfaccia elettrodo-soluzione, a fronte di variazioni di potenziale o variazioni della concentrazione della soluzione.

Il processo di scarica della specie ossidata è inoltre governato da due diversi fattori cinetici: la velocità di trasferimento dell'analita dal bulk all'interfaccia elettrodo/soluzione e lo spostamento della specie ridotta prodotta nuovamente verso il bulk e la velocità di trasferimento elettronico in corrispondenza alla superficie elettrodica. La velocità globale della semireazione sarà dominata dal più lento di tali step, e il fatto che il meccanismo controllante sia l'uno o l'altro dipende dalla natura del composto e da condizioni sperimentali quali ad esempio il materiale di cui è costituito l'elettrodo ed il mezzo interposto.

Sequenze di reazione più complesse, che coinvolgono processi di dimerizzazione o protonazione o decomposizione catalitica che modificano la superficie elettrodica, possono verificarsi ma per la trattazione di tali argomenti si rimanda alla letteratura più approfondita (esulano dagli scopi di questo lavoro di tesi).

Nel caso in cui il trasferimento della specie dal bulk alla superficie elettrodica risulti il passaggio più lento, si parla di corrente limitata dal trasporto di massa.

Vedremo ora in dettaglio quali siano i meccanismi principali di trasporto di materia in sistemi elettrochimici.

### 2.2.1 Trasporto di materia in sistemi elettrochimici

In un sistema elettrochimico, il trasferimento di materia avviene principalmente attraverso tre meccanismi fondamentali:

- **Convezione:** è il trasporto di specie dovuto al moto macroscopico del fluido, sia esso forzato o indotto da un gradiente di densità, nel qual caso si parla di convezione naturale;
- **Diffusione:** è il movimento spontaneo della specie da una regione più concentrata ad una più diluita, sotto l'influenza di un gradiente di potenziale chimico ovvero di concentrazione;
- **Migrazione:** è il movimento che si crea sotto l'influenza di un gradiente di potenziale elettrico, indotto dal campo elettrico generato dall'elettrodo nei confronti degli ioni.

Il flusso di specie elettroattiva, che per semplicità viene supposto come monodirezionale lungo la generica coordinata  $x$ , è descritto dall'equazione di Nernst-Planck:

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} - \frac{zFDC}{RT} \frac{\partial \varphi(x, t)}{\partial x} + C(x, t)V(x, t) \quad (6)$$

dove  $D$  è il coefficiente di diffusione ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $(\partial C(x, t))/\partial x$  è il gradiente di concentrazione,  $(\partial \varphi(x, t))/\partial x$  è il gradiente di potenziale,  $z$  è la carica della specie elettroattiva,  $C$  è la concentrazione della specie elettroattiva,  $V(x, t)$  è la velocità del fluido,  $x$  è la generica coordinata spaziale e  $t$  la coordinata temporale.

La corrente prodotta da una reazione redox è direttamente proporzionale al flusso di specie e all'area della superficie elettrodica secondo l'equazione:

$$i = -nFAJ \quad (7)$$

Nelle situazioni in cui il trasporto di materia avviene tramite tutti e tre meccanismi citati, dedurre una correlazione univoca tra la corrente misurata e la concentrazione di analita in soluzione risulta piuttosto complesso; in particolare, solo la diffusione può essere direttamente correlata alla concentrazione della specie chimica d'interesse, in quanto il flusso diffusivo è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione.

Per questa ragione si tendono a moderare gli effetti connessi alla migrazione e alla convezione. L'utilizzo di un eccesso di elettrolita di supporto, ad esempio, favorisce la schermatura del campo elettrico, riducendo al minimo l'attrazione elettrostatica.

L'impiego di un sistema quiescente contribuisce invece ad annullare le conseguenze associate all'instaurarsi di un moto convettivo.

Quando il processo di trasferimento di materia avviene esclusivamente in regime diffusivo l'equazione di Nernst-Planck assume la forma semplificata:

$$i = nFAD \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \quad (8)$$

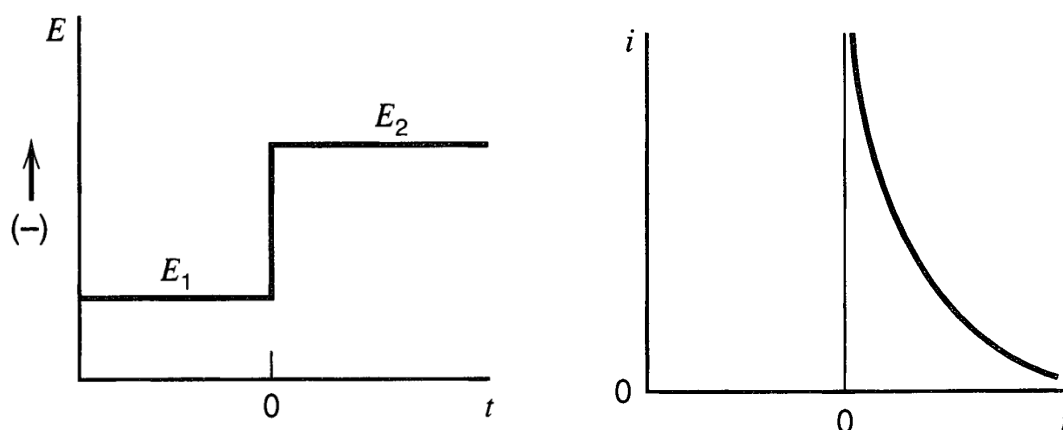
secondo cui l'intensità di corrente è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie elettroattiva.

### 2.2.2 Cronoamperometria

La cronoamperometria fa parte dei metodi elettrochimici cui si fa riferimento come *Potential-step Experiment*, ovvero esperimenti a potenziale fisso, ed è una tecnica elettroanalitica che consente la misura dell'intensità di corrente in funzione del tempo. Nella cronoamperometria la differenza di potenziale tra elettrodo di lavoro e riferimento segue dunque un programma prestabilito, che prevede un gradino di potenziale da un valore  $E_1$ , in cui non si verificano processi faradici, ad un nuovo valore  $E_2$  in cui si ha l'ossidazione della specie elettroattiva. A potenziale pari a  $E_1$  non si rileva alcun passaggio di corrente.

La conversione da un valore di potenziale in cui la specie d'interesse è elettroinattiva ad uno in cui la cinetica della reazione di ossidazione può essere considerata istantanea, induce lo sviluppo di una corrente.

L'impoverimento di specie chimica all'interfaccia elettrodo/soluzione causa l'originarsi di un flusso diffusivo in direzione dell'elettrodo. Così la regione di spazio interessata dall'impoverimento di specie si allarga progressivamente e la pendenza del profilo di concentrazione diminuisce nel tempo. La curva della corrente tende infatti a diventare via via meno ripida.



**Figura 2.3:** Forma d'onda del potenziale in una cronoamperometria, in cui l'analita è elettroinattivo al valore  $E_1$  mentre si riduce al valore  $E_2$ ; andamento della corrente nel tempo

La correlazione tra intensità di corrente e concentrazione di analita elettroattivo si ottiene grazie all'espressione di Cottrell:

$$i = \frac{nFADiC_i}{\sqrt{\pi t}} \quad (9)$$

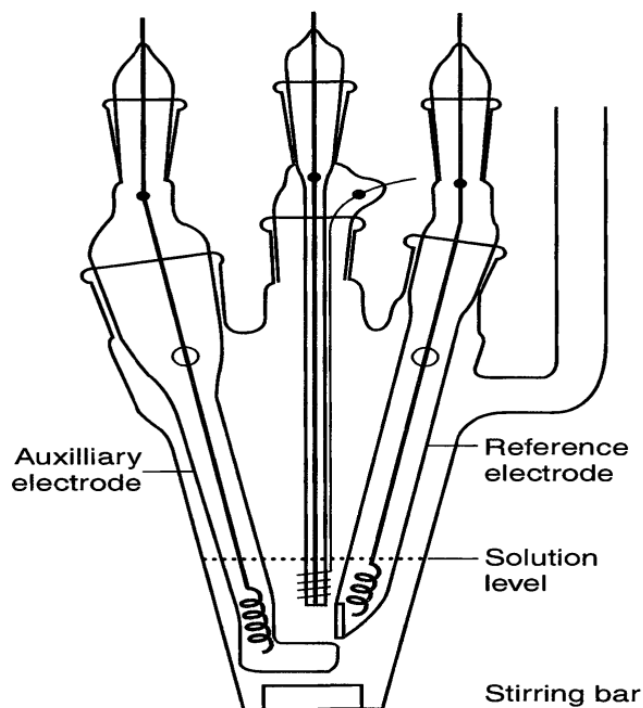
in cui  $i$  è la corrente (A),  $n$  il numero di elettroni coinvolti nella reazione redox,  $F$  la costante di Faraday (96485 C),  $A$  l'area dell'elettrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $c_i$  la concentrazione iniziale della specie  $i$ -esima ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ),  $D_i$  il coefficiente di diffusione della specie  $i$ -esima,  $t$  il tempo (s).

## 2.3 Sistema di acquisizione dei dati

### 2.3.1 Potenziostato-galvanostato

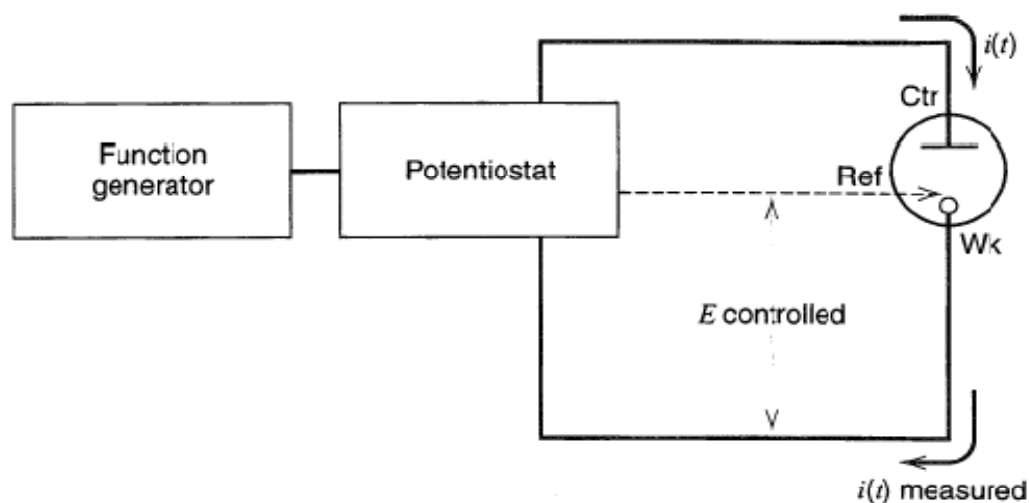
Il potenziostato (Autolab PGSTAT 128N Ecochemie, NL) è uno strumento in grado di controllare il voltaggio attraverso la coppia elettrodo di lavoro-controelettrodo e di aggiustarlo per mantenere la differenza di potenziale imposta tra il lavorante e l'elettrodo di riferimento, secondo un programma definito da un generatore di funzioni. Nelle misurazioni infatti il potenziostato è stato accoppiato con una cella a tre elettrodi, nella quale il riferimento misura e controlla il potenziale dell'elettrodo lavorante mentre l'elettrodo ausiliario fa passare tutte le altre correnti in maniera tale da bilanciare quella che si osserva ancora al lavorante. Con questo arrangiamento la corrente viene fatta passare tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo ausiliario.

Il generatore di funzioni può essere un dispositivo analogico, anche se spesso il segnale desiderato è invece generato in formato digitale con un computer e poi immesso nella potenziostato attraverso un convertitore digitale-analogico (DAC). Spesso il potenziostato può fungere anche da galvanostato per il controllo della corrente attraverso una cella.



**Figura 2.4:** Schema di una cella a tre elettrodi

Il controelettrodo può essere di qualunque materiale, in quanto esso non influenza il comportamento dell'elettrodo d'interesse. In generale però non deve portare, per elettrolisi, alla formazione di sostanze che possano raggiungere la superficie dell'elettrodo di lavoro e causare reazioni che interferiscano con quella principale.



**Figura 2.5:** Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del potenziostato accoppiato ad una cella a tre elettrodi

Il massimo valore di corrente che il sistema è in grado di rilevare è pari a 800 mA ed i range di corrente che è in grado di leggere vanno da 1 A a 10 nA.

Un modulo aggiuntivo permette la misura di correnti dell'ordine dell'ordina del pA: questo può risultare particolarmente utile nel caso di sistemi ultra miniaturizzati.

Il potenziostato si compone inoltre di un sistema di registrazione e di visualizzazione per la misurazione e la presentazione della corrente e del potenziale nel tempo.

Il software di controllo dello strumento è Nova 1.6.

## 2.4 Tecniche di microfabbricazione

### 2.4.1 Fotolitografia

La tecnica della fotolitografia è un processo che consente di trasferire una configurazione geometrica desiderata, impressa su una fotomaschera, ad uno specifico substrato.

Il trasferimento del pattern richiesto si realizza tramite deposizione di un film di photoresist sulla superficie di un wafer di silicio; interponendo tra esso ed una sorgente luminosa la fotomaschera si escludono o si comprendono selettivamente le porzioni della superficie del wafer che si vogliono polimerizzare. Il photoresist utilizzato in tutte le operazioni di micro fabbricazione è l'SU-8 2000 (MicroChem Corp, US), resina epossidica fotosensibile negativa.

Successivamente le zone non polimerizzate vengono rimosse con opportuni solventi lasciando impresso sulla superficie del wafer la geometria voluta. La buona riuscita del processo fotolitografico è subordinata al rispetto stretto di una procedura che prevede numerose fasi, che qui di seguito vengono illustrate nel dettaglio.

#### 2.4.1.1 Realizzazione della fotomaschera

La prima fase per l'ottenimento della fotomaschera consiste nella realizzazione del disegno. La configurazione da trasmettere sul wafer di silicio è stata eseguita con il programma di design AutoCAD 2D 2010 (Autodesk, US). Si ricorda che le tecniche di microfabbricazione di seguito descritte consentono la messa in opera di strutture che presentano rapporti altezza:larghezza non superiori a 5:1 (H:W), pena l'instabilità strutturale della costruzione.

#### 2.4.1.2 Pretrattamento del wafer

Affinché il photoresist aderisca perfettamente alla superficie del wafer, garantendo così la solidità della struttura, è necessario che la superficie di contatto tra il silicio ed il polimero sia asciutta. Il wafer quindi, non appena estratto dal contenitore, viene collocato in un forno a ventilazione forzata (G-Therm, control AG System., IT) alla temperatura di 130°C, per circa mezz'ora, per rimuovere eventuali tracce di umidità presenti e facendo attenzione a mantenerlo il più possibile esente da contaminazioni. Successivamente, il wafer viene sottoposto ad un ulteriore trattamento con plasma cleaner (Harrick Plasma, US&CN).

Il plasma cleaner è dotato di un induttore magnetico che genera un campo elettrico oscillante a radiofrequenze nella regione del gas. A pressioni debolmente inferiori rispetto alla pressione atmosferica, la combinazione dell'accelerazione elettronica indotta dal campo elettrico con gli urti elastici degli elettroni, con atomi neutri o con le linee del campo, causa il riscaldamento degli elettroni stessi.

Quando gli elettroni guadagnano energia cinetica, superano il potenziale di prima ionizzazione e, nello scontrarsi con altri atomi neutri, liberano nuovi elettroni.

Il trattamento al plasma con aria induce l'etching degli idrocarburi, lasciando i gruppi silanolo (SiOH) in superficie, rendendola idrofila. Posto in contatto con la superficie vetrosa forma legami a ponti Si-O-Si all'interfaccia tra i due materiali, creando una tenuta irreversibile.

Il trattamento dura per circa per circa due minuti.

In ultima, la superficie del wafer collocato all'interno di un cristallizzatore viene trattata con esadimetilsilazano, un primer per promuovere l'adesione tra il photoresist ed il silicio.

### 2.4.1.3 Deposizione del polimero

Il wafer così pretrattato viene collocato sullo spin coater (WS-650-23, Laurell Technologies Corporation, US) e qui fissato mediante l'applicazione del vuoto. Il polimero viene versato nella regione centrale del wafer fino a ricoprirne circa il 30% e attraverso l'operazione di spinnaggio viene messo in rotazione consentendone la totale copertura da parte del resist e garantendo una distribuzione uniforme su tutta la superficie. Lo strumento prevede la possibilità di scegliere tra differenti programmi di spinnaggio caratterizzati da diversi valori di velocità di rotazione e di accelerazione nel raggiungimento di tale velocità. Agendo su questi parametri è possibile controllare lo spessore finale del film di photoresist e quindi l'altezza della strutture polimeriche che si desidera realizzare, come illustrato in Tabella 2.1.

**Tabella 2.1:** Spessore del film polimerico in funzione della velocità di rotazione dello spin coater

<b>Spessore [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Velocità di spin [rpm]</b>
100 - 150	240 - 260
160 - 225	260 - 350
230 - 270	350 - 370
280 - 550	370 - 600

### 2.4.1.4 Preriscaldamento ed esposizione

Il wafer viene poi posto su una piastra riscaldante con lo scopo di allentare le tensione interne e del materiale e di far evaporare eventuali residui di solvente. La cottura si sviluppa in due fasi successive a due temperature diverse, la prima a 65°C e la seconda a 95°C, ciascuna per un tempo variabile a seconda dello spessore dello strato di photoresist.

**Tabella 2.2:** Tempi di cottura in funzione dello spessore del film polimerico

<b>Spessore [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Tempo a 65°C [min]</b>	<b>Tempo a 95°C [min]</b>
100 - 150	5	20 - 30
160 - 225	5 - 7	30 - 45
230 - 270	7	45 - 60
280 - 550	7 - 10	60 - 120

Il wafer viene poi alloggiato nel vassoio della lampada UV (30 UV Light Source, OAI, USA). Sopra ad esso viene appoggiata la fotomaschera facendo attenzione all'allineamento.

La fase successiva prevede l'esposizione alla sorgente ultravioletta che causa la polimerizzazione del resist ed è sicuramente la fase più delicata dell'intero processo fotolitografico. Il photoresist utilizzato è un resist negativo, per cui la porzione che viene esposta alla luce polimerizza e diventa insolubile allo sviluppo.

L'energia di esposizione viene stabilita in funzione dello spessore della resina e, nota la potenza della lampada, è possibile ricavare il tempo di esposizione adatto.

E' stato rilevato come una sottoesposizione del 20% del tempo consigliato aumenta notevolmente il successo dell'operazione. Generalmente sulla sagoma trasparente della fotomaschera viene appoggiato un vetrino da laboratorio con lo scopo di assicurare un migliore contatto tra fotomaschera e polimero; in questo modo si riduce anche l'intensità luminosa della sorgente incentivando l'effetto di sottoesposizione.

**Tabella 2.3:** *Energia di esposizione alla sorgente UV in funzione dello spessore del film*

<b>Spessore [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Energia di esposizione [<math>\text{mJ}/\text{cm}^2</math>]</b>
100 - 150	240 - 260
160 - 225	260 - 350
230 - 270	350 - 370
280 - 550	370 - 600

#### 2.4.1.5 Riscaldamento e sviluppo

Il riscaldamento post-esposizione viene effettuato tipicamente per consentire il cross-linking selettivo delle porzioni di film esposte alla lampada. Il photoresist impiegato reticola rapidamente e questo causa la formazione di stress elevati del film. Per minimizzare tali effetti e scongiurare la possibilità che il wafer si incrini o che il resist si possa crepare, è fortemente indicato effettuare il post-exposure bake (PEB), in due stadi successivi.

Le due distinte fasi di cottura sono condotte alle temperature di 65°C e 95°C.

I tempi del trattamento sono stabiliti ancora una volta in funzione dello spessore del film. Lo sviluppo si ottiene per immersione del wafer in metossimetacrilato (Sigma, US), che solubilizza la porzione di film esclusa dall'esposizione alla luce UV. E' preferibile che il wafer sia immerso uniformemente nel solvente piuttosto che ricorrere allo spruzzo sulla

superficie, per evitare che sollecitazioni meccaniche danneggino lo stampo. Lo sviluppo può ritenersi completato quando non sono più visibili residui di polimero nella regione non reticolata.

**Tabella 2.4:** *Tempi di cottura post-esposizione in funzione dello spessore del film polimerico*

<b>Spessore [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Tempo a 65°C [min]</b>	<b>Tempo a 95°C [min]</b>
100 - 150	5	10 - 12
160 - 225	5	12 - 15
230 - 270	5	15 - 20
280 - 550	5	20 - 30

**Tabella 2.5:** *Tempi di sviluppo in funzione dello spessore del film polimerico*

<b>Spessore [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Tempo di Sviluppo [min]</b>
100 - 150	10 - 15
160 - 225	15 - 17
230 - 270	17 - 20

### 2.4.2 Soft litografia

La tecnica della soft litografia consente di ottenere lo stampo finale mediante stesura del polidimetilsilossano sulla struttura realizzata con il photoresist.

La prima fase del trattamento prevede la preparazione del polimero silconico, miscelando il prepolimero con un agente reticolante nella proporzione desiderata. La miscela così ottenuta viene sottoposta ad agitazione meccanica e messa in un cristallizzatore dove viene fatto il vuoto tramite una pompa. In questo modo si riescono ad allontanare le bolle d'aria sciolte nella miscela, per un tempo sufficiente alla loro completa scomparsa.

Il ciclo di degasaggio viene eseguito ripetutamente per assicurare l'efficacia del trattamento.

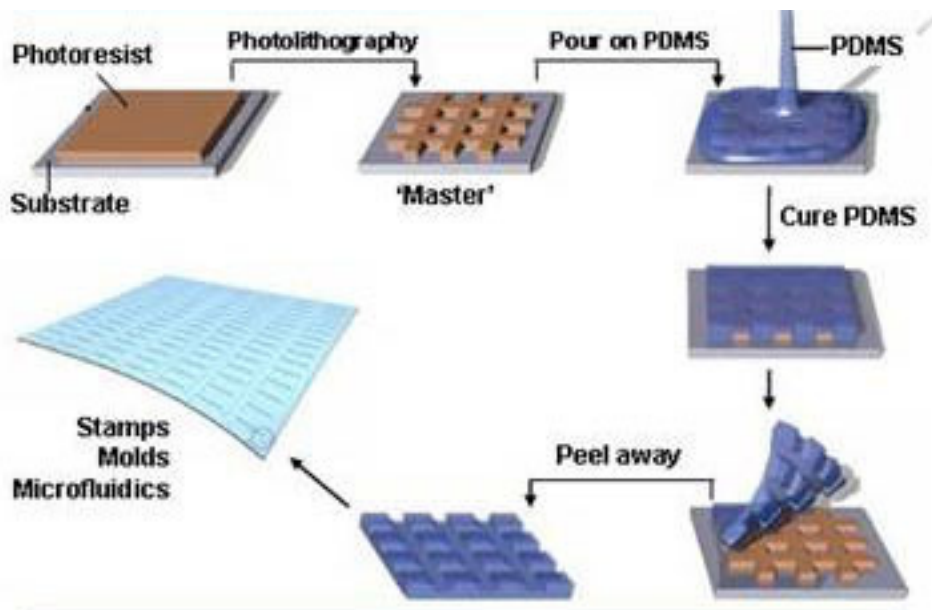
Il degasaggio del prepolimero serve ad evitare che rimangano delle bolle all'interno del silicone che potrebbero inficiare la precisione del pattern impresso sullo stampo.

Il PDMS liquido viene dunque versato sul wafer di silicio, alloggiato in una piastra Petri, fino a ricoprirne l'intera superficie. La polimerizzazione viene poi realizzata per via termica, in forno ventilato alla temperatura di 80°C per circa due ore.

Al termine della cottura, la porzione di PDMS con impressa il circuito microfluidico viene tagliata e sollevata delicatamente lungo il suo perimetro con una spatolina, per agevolare il distacco del polimero dal wafer.

**Tabella 2.6:** *Proprietà del PDMS*

<b>Parametro</b>	<b>Valore</b>	<b>Unità di misura</b>
Viscosità base a 23°C	5500	mPa·s
Viscosità miscela a 23°C	4000	mPa·s
Resistenza di passivazione a 23°C	2	ore
Resistenza alla trazione	7.1	MPa
Allungamento a rottura	140	%
Resistenza alla lacerazione	2.6	kN/m
Gravità specifica a 23°C	1.05	-
Coefficiente di conduttività termica	0.17	W/(m·K)
Rigidità dielettrica	21	kV/mm
Permittività	2.75	-
Fattore di dissipazione	0.001	-



**Figura 2.6:** Rappresentazione schematica del processo soft-litografico: deposizione del photoresist sul substrato; ottenimento del master per esposizione alla radiazione ultravioletta; deposizione del PDMS sullo stampo; polimerizzazione per via termica; estrazione

### 2.4.3 Adesione tramite plasma

Lo stampo in PDMS così ottenuto viene incollato ad un vetrino borosilicato da laboratorio che funge da supporto. L'accoppiamento viene realizzato attraverso la tecnica di adesione al plasma, che migliora le proprietà di adesività dei materiali polimerici.

Per garantire l'efficacia del trattamento, le due superfici che verranno in contatto devono essere prive di impurità, quindi vengono preliminarmente pulite con striscioline di scotch trasparente che rimuova il particolato depositato. Un ulteriore accorgimento può essere quello di pulire il vetrino boro silicato con qualche goccia di acetone.

Al termine di questa fase, i due pezzi vengono collocati nel plasma cleaner () per circa due minuti, con la superficie da incollare rivolta verso l'alto.

Il sistema di adesione al plasma è irreversibile, ovvero le due singole parti una volta unite non possono più essere disaccoppiate.

## 2.5 Sistema di regolazione delle portate

La movimentazione dei fluidi all'interno del circuito microfluidico necessita di un controllo altamente accurato, che sia in grado di mantenere con estrema precisione portate di ordini di grandezza anche micronici.

Per soddisfare tali esigenze si è ricorsi ad una pompa a siringa (PHD 22/2000 HPSI, HARVARD Apparatus, US).

Lo strumento è costituito da due blocchi separati, collegati mediante un cavo elettrico: l'interfaccia con l'utente, costituito da una tastiera ed un display per la gestione del flusso ed il sistema di pompaggio vero e proprio.

Quest'ultimo si compone di un holder per l'alloggiamento delle siringhe fino ad un numero massimo di 10, provvisto di una ganascia che ne garantisce il fissaggio, così come illustrato in Fig. 2.7.

Le siringhe utilizzate nelle prove sono in polistirene da 3 ml o da 5 ml. (Becton, Dickinson and Company, US).

Le siringhe vengono collocate nell'unità multi-rack in modo da essere sempre in numero pari a destra e a sinistra del perno della ganascia per non creare dissimmetrie nel sistema che potrebbero compromettere la precisione nell'erogazione dei fluidi. Per la stessa ragione il rack deve essere utilizzato riempiendo prima la parte centrale e poi in serie le postazioni via via più esterne.

Per mettere in azione la pompa lo strumento richiede di specificare la capacità della siringa utilizzata ed il modello della stessa.

La pompa è in grado di funzionare sia in modalità infusione che aspirazione. Nel nostro caso è stata utilizzata la prima modalità e successivamente è stato impostato il valore di portata desiderato.

Noti questi parametri la pompa è in grado di calcolare autonomamente la velocità di avanzamento del rack, che avviene per rotazione di una vite senza fine.

Nelle prove eseguite a portata variabile, è stato possibile effettuare le variazioni di portata in continuo, senza che il cambiamento imponesse un arresto del flusso.



**Figura 2.7:** Pompa a siringa per la movimentazione dei fluidi

## 2.6 Preparazione dell'apparato sperimentale

I test iniziali, per accertare la validità del sistema di misura costituito dalla cella a tre elettrodi, sono stati eseguiti con soluzioni di ferrocianuro di potassio ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) (Sigma-Aldrich, US) in nitrato di potassio ( $KNO_3$ , Sigma-Aldrich, US).

Il potenziale positivo di ossidazione del ferrocianuro è intorno a 0.25 V contro un riferimento di Ag/AgCl.

Il microelettrodo di lavoro è stato realizzato con un filo d'oro del diametro di circa 0.5 mm. Un capo del filo metallico è stato limato con carta vetrata per rendere la superficie a specchio, mentre il corpo dell'elettrodo è stato ricoperto da un film di smalto trasparente per escludere la superficie dal contatto con la miscela e ottenere così un'area attiva nota.

Per la calibrazione in flusso del biosensore di glucosio le soluzioni sono state ottenute diluendo del phosphate buffered saline (PBS) con glucosata 0.56 M (Eurospital, IT).

Gli elettrodi sono inseriti nelle guide con l'ausilio di uno stereo microscopio (Leica Microsystems, IT), per verificare con maggiore precisione il corretto posizionamento dell'elettrodo.

L'impiego del microscopio facilita inoltre il momento dell'inserimento, in particolare per l'elettrodo di lavoro, la cui parte enzimatica non deve entrare in contatto con le pareti in PDMS per evitare danneggiamenti.

Il fissaggio e la tenuta idraulica vengono realizzati, a seguito dell'integrazione dei microelettrodi, riempiendo i condotti laterali con una colla (DYMAX Corporation, USA)

a raggi UV (DYMAX 3067), un adesivo sufficientemente fluido da poter essere convogliato nel canale con una siringa posta all'imboccatura. Anche questa operazione è eseguita al microscopio, per verificare che la colla abbia riempito tutto e solo il condotto laterale.

Il cross-linking avviene esponendo le parti trattate ad una radiazione UV tramite lampada, per qualche secondo. Per i tempi di esposizione alla radiazione ultravioletta si veda il relativo datasheet.

Un accorgimento da utilizzare durante il trattamento è quello di escludere l'estremità del biosensore dal fascio luminoso attraverso la copertura con una strisciolina di nastro isolante nero: la radiazione UV potrebbe deteriorare l'enzima e quindi distruggere l'attività biocatalitica del sensore.

Le soluzioni di acqua ossigenata sono state ottenute con perossido di idrogeno 50% (Sigma-Aldrich, US) e PBS come elettrolita di supporto.

Per stimare l'effetto della portata sull'intensità di corrente sono state condotte delle misure cronoamperometriche con due soluzioni di DMEM *High Glucose* (4,5 mg/L D-glucose, Invitrogen, US) in DMEM *Glucose free* (Invitrogen, US) di concentrazione pari a 1 mM e 5 mM.

## 2.7 Procedura sperimentale ottimale per le prove in flusso

L'utilizzo di valori di flusso relativamente bassi quale quello ha causato l'insorgenza di bolle nel micro canale; in corrispondenza al pozzetto di immersione delle estremità elettrodiche l'ulteriore rallentamento del fronte del avanzamento del fluido ha provocato l'arresto e l'inerzia delle bolle d'aria.

L'eventualità che le bolle si arrestino nell'intorno della regione enzimatica del sensore, andando ad escludere il metallo dal contatto con il fluido ed inibendo la misura, si è verificata di frequente. Il deposito di bolle d'aria intorno al riferimento e al contro elettrodo ha impedito l'applicazione di un potenziale preciso all'elettrodo di lavoro, rendendo instabile la misura.

Per scongiurare la formazione di bolle d'aria, è stato quindi attuare un protocollo ad hoc. Le fasi successive della procedura sono elencate nel seguito:

- Preparare la soluzione alla concentrazione desiderata sotto cappa per mantenere il medium in condizioni di sterilità;
- Trasferire la soluzione in una piastra Petri e lasciarla in incubatore per circa 15 ore per consentire il raggiungimento della concentrazione di equilibrio dei gas e mantenerla alla temperatura di 37° C fino al momento dell'utilizzo;
- Trascorso l'intervallo di tempo prelevarle dall'incubatore e sempre sotto cappa aspirare il liquido con la siringa;
- Nel frattempo caricare una siringa con dell'acqua, facendo attenzione a degasare il fluido meccanicamente, battendo leggermente il corpo della siringa;
- Lasciar fluire l'acqua nel circuito tramite pompa a siringa fino a che si ha tracimazione dalla sommità del tubo, posta ad un'opportuna altezza  $h$  rispetto al piano (collocare una capacità a valle del tubo d'uscita dove si possa sversare il liquido);
- Degasare la siringa contenente il medium, se dovessero esserci ancora tracce di bolle d'aria;
- Arrestare il flusso d'acqua e collocare la siringa con il medium nel rack, fissandola saldamente;
- Azionare la pompa alla portata desiderata e attendere che il pistone si trovi in contatto con lo stantuffo della siringa (verificare visivamente la fuoriuscita del liquido);
- Collegare la siringa con il condotto d'ingresso del circuito e lasciar fluire il fluido;
- Dopo aver verificato che il fluido bagni l'estremità attiva degli elettrodi, collegare i morsetti al potenziostato;
- Applicare il potenziale desiderato;
- Rilevare la misura di corrente.

Si sottolinea come gli accorgimenti di cui si è tenuto conto nella procedura sperimentale mirino a mantenere oltre alle condizioni fluidodinamiche ideali anche i presupposti biologici alla base dell'affidabilità della misura, prima fra tutte la sterilità del medium. L'eventuale contaminazione batterica potrebbe infatti causare variazioni di pH e soprattutto modificare la concentrazione di glucosio, in quanto i batteri lo consumano per il loro metabolismo.



# Capitolo 3

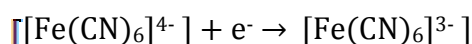
## Validazione e risultati preliminari

Il presente capitolo introduce alle prove sperimentali, condotte in fase preliminare, per la caratterizzazione del sistema microstrutturato in esame. L'approccio iniziale all'utilizzo delle tecniche elettroanalitiche in sistemi di microscala è stato effettuato mediante misure cronoamperometriche in statica, tramite l'utilizzo di un sistema reagente a comportamento noto. Una volta validato il sistema, sono state effettuate le calibrazioni dei biosensori. Successivamente gli elettrodi microstrutturati sono stati accoppiati con la piattaforma microfluidica e sono state condotte le prime misure in flusso, al fine di indagare le problematiche connesse al trasferimento delle informazioni acquisite in statica ad un sistema dinamico, soprattutto in relazione all'instaurarsi di regimi di moto più complessi.

### 3.1 Cronoamperometria in statica

La scelta di utilizzare la coppia redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  come sistema reagente è stata dettata dal fatto che è un sistema elettrochimico reversibile dal comportamento noto ed ampiamente descritto in letteratura.

La soluzione di ferricianuro viene versato nella cella elettrolitica dove successivamente vengono immersi gli elettrodi. A seguito dell'applicazione del potenziale indicato all'elettrodo di lavoro, durante la cronoamperometria si verifica la reazione di ossidazione del ferrocianuro a ferricianuro secondo lo schema riportato di seguito:



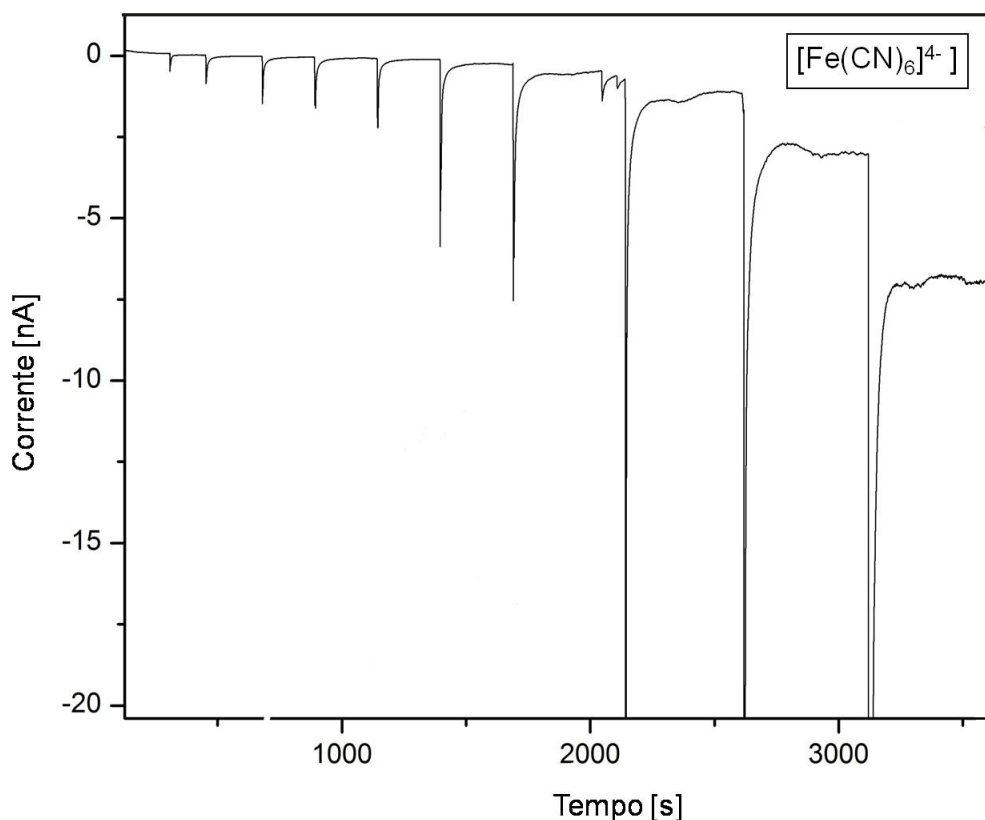
che produce una risposta in corrente proporzionale alla concentrazione di elettroanalita in soluzione secondo l'equazione riportata in letteratura (*Amatore C., 2009*).

L'esperimento consiste nel valutare quantitativamente la corrente prodotta dalla scarica della specie elettroattiva, in corrispondenza a diversi valori di concentrazione di ferrocianuro della soluzione.

Nel momento dell'imposizione del gradino di potenziale, la cella elettrolitica è riempita del solo elettrolita di supporto per la registrazione del bianco; una volta che il segnale di corrente si è stabilizzato attorno ad un valore pressoché nullo, vengono operate aggiunte

discrete di volumi noti di soluto al sistema, posto in agitazione con ancoretta magnetica a seguito dell'iniezione per uniformare il valore di concentrazione in tutto il volume di liquido. In questo modo si ottengono le soluzioni a diversa composizione.

Nel caso del sistema redox ferrocianuro/ferricianuro, la corrente rilevata cresce progressivamente in modulo, ma essendo negativa, il grafico della corrente nel tempo ha l'andamento mostrato in Fig. x. In esso risultano immediatamente visibili gli istanti in cui sono state effettuate le aggiunte ed il sistema è stato posto sotto agitazione.



**Figura 3.1:** Cronoamperometria di soluzioni di ferrocianuro a diverse concentrazioni

### 3.2 Taratura del biosensore

Per la taratura del biosensore è stata utilizzata la tecnica messa a punto con gli esperimenti precedenti. Il biosensore, il riferimento in Ag/AgCl e l'elettrodo ausiliario in Pt sono stati immersi nella cella elettrochimica, contenente 30 ml di PBS quale elettrolita di supporto, e successivamente è stato applicato all'elettrodo di lavoro uno step di potenziale di ampiezza pari a 0.7 V.

Dopo aver atteso la stabilizzazione del segnale, le miscele a composizione prefissata sono state ottenute tramite aggiunte di volumi discreti di glucosata.

L'iniezione di glucosio causa la concentrazione della soluzione e di conseguenza l'aumento del segnale di corrente; nel grafico di Fig. 3.2, che mostra l'evoluzione dell'intensità di corrente nel tempo, si notano chiaramente i "gradini" corrispondenti al salto di corrente derivante dall'aumento della concentrazione, in corrispondenza agli istanti in cui sono state effettuate le aggiunte.

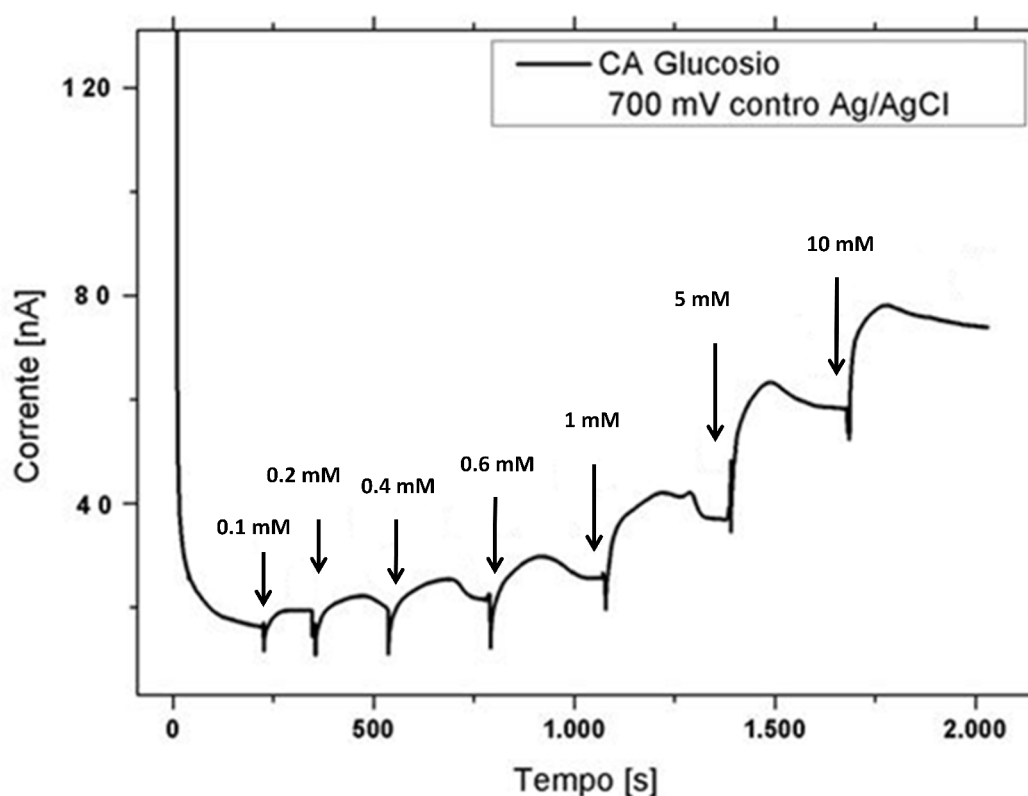


Figura 3.2.: Cronoamperometria di soluzioni di glucosio a diversa concentrazione.

L'intensità di corrente relativa ad una definita composizione della soluzione è da leggersi in corrispondenza del plateau che si instaura dopo il picco immediatamente successivo all'immissione di un nuovo volume di glucosio.

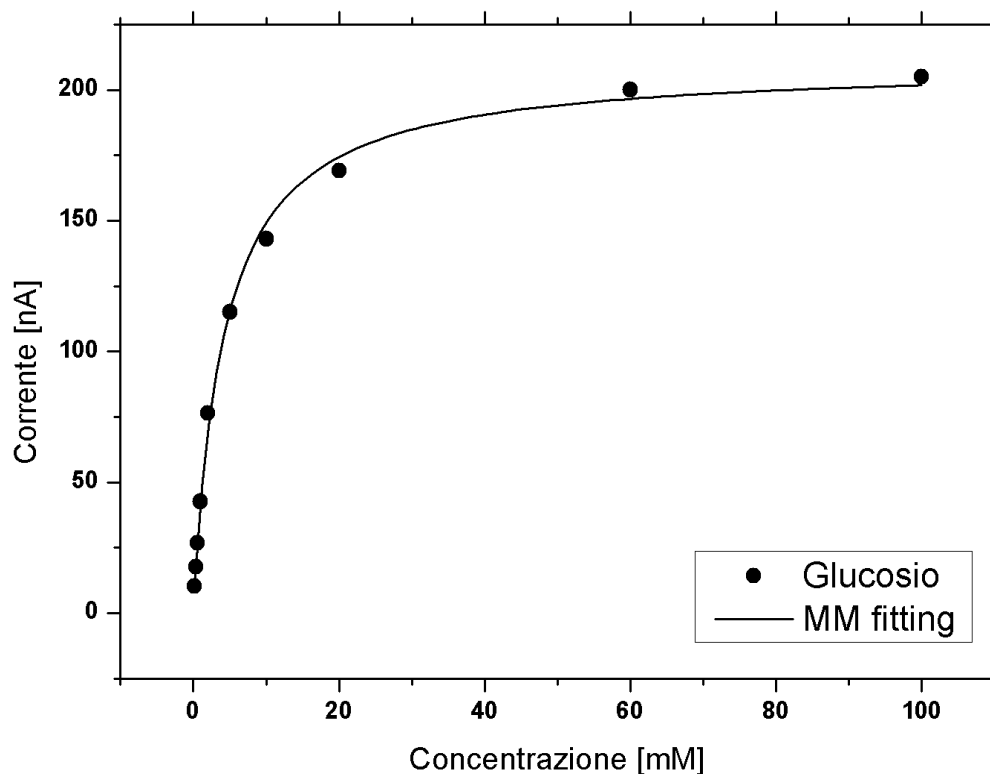
Diagrammando i valori d'intensità di corrente in funzione della concentrazione, risulta evidente come la correlazione tra le due grandezze sia caratteristica della cinetica di reazione enzimatica descritta dal modello di Michaelis-Menten

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dove  $v$  è la velocità di reazione iniziale,  $[S]$  è la concentrazione di substrato e  $K_m$  la costante di Michaelis-Menten.

La curva esibisce un tratto lineare fino al valore di concentrazione limite pari a circa 4 mM (come mostrato in Fig. 3.3 e tab. 1.1).

Per concentrazioni superiori l'enzima raggiunge la saturazione completa dei suoi siti attivi e la reazione enzimatica si arresta; in queste condizioni il valore massimo di corrente prodotta si assesta su un valore fissato e diventa indipendente dalla quantità di glucosio presente nella soluzione.



**Figura 3.3:** Curva di taratura del biosensore del glucosio e fitting con l'equazione di Michaelis-Menten

**Tabella 1.1:** Valori di  $K_m$  e  $V_{max}$  ricavati dal fitting con il modello di Michealis-Menten

	Valore	Errore
Vmax	210	3.2
Km	4.1	0.2

### 3.3 Accoppiamento biosensore - piattaforma microfluidica

#### 3.3.1 Vincoli progettuali

L'attuazione di un circuito microfluidico integrato con elettrodi microstrutturati è subordinata al soddisfacimento di alcuni vincoli progettuali fondamentali, dei quali si deve tener conto durante la fase di progettazione della piattaforma multistrato.

Al fine di elaborare la configurazione più adatta per l'accoppiamento, i requisiti da considerare riguardano:

- Dimensioni del sensore: la geometria e le dimensioni del circuito microfluidico devono garantire la completa immersione e perfusione dell'estremità attiva del biosensore, consentendo al tempo stesso un facile controllo del grado d'immersione della stessa;
- Regime di moto del fluido: è fondamentale combinare una geometria ottimale con un intervallo di portate tale da escludere la formazione di volumi morti;
- Tempo di vita del sensore: l'apparato deve essere dotato di un buon sistema di tenuta idraulica, in particolare nei punti di inserimento dei sensori e nelle regioni in corrispondenza ai tubi di ingresso e di uscita del fluido.

Per quanto riguarda quest'ultimo punto, sarebbe auspicabile costruire una piattaforma in cui gli elettrodi si possano inserire e all'occorrenza rimuovere, ovvero che l'accoppiamento non sia irreversibile. E' noto, infatti, che il biosensore subisce una progressiva perdita di attività catalitica nel tempo, in ragione di diversi fattori; un simile sistema consentirebbe la sua sostituzione senza imporre il rimpiazzo dell'intera piattaforma.

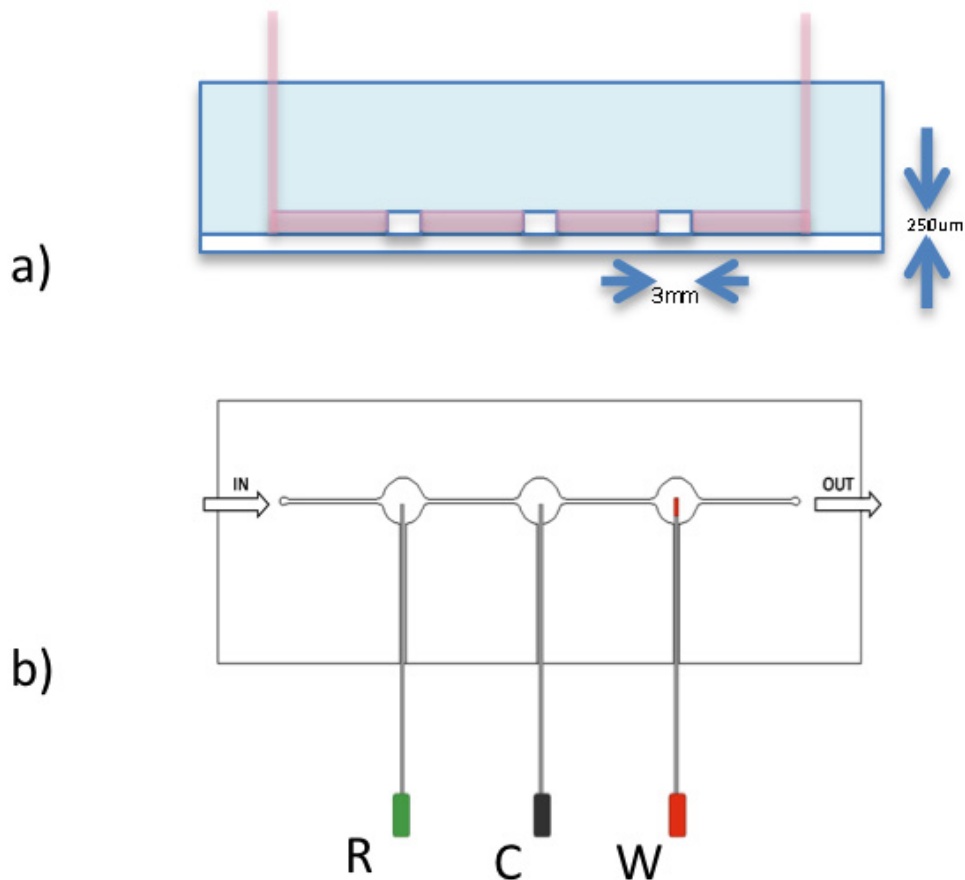
In prima battuta è stato provato un sistema che prevedeva l'utilizzo di una membrana sottile, dello spessore di 500  $\mu\text{m}$  che ricopriva l'intera superficie della piattaforma. Prima della deposizione della membrana sono stati effettuati tre fori cilindrici verticali tramite punch da biopsia per mettere in comunicazione la superficie della piattaforma con il microcanale.

Dopo l'applicazione della membrana, veniva effettuato un piccolo foro sulla membrana nella zona corrispondente ai fori verticali e poi veniva inserito verticalmente l'elettrodo.

Tale sistema non consentiva il monitoraggio del livello d'immersione degli elettrodi e allo stesso tempo era difficile realizzare una buona ripetibilità della misura a causa dell'imprecisione intrinseca della tecnica.

Un ulteriore problema era associato alla cattiva tenuta meccanica degli elettrodi che essendo immersi solamente per 1/8 della loro lunghezza complessiva non erano fissati saldamente per via dello spessore troppo sottile della membrana e quindi erano soggetti a spostamenti continui che inficiavano la bontà della misura.

Per ovviare a questo problema si è ricorsi alla progettazione di un design ad hoc della piattaforma, nel quale gli elettrodi non sono più introdotti verticalmente nel canale, bensì lateralmente. Uno schema rappresentativo della piattaforma microfluidica è rappresentato in Fig. 3.4, in cui sono illustrate la vista laterale e la vista in pianta:



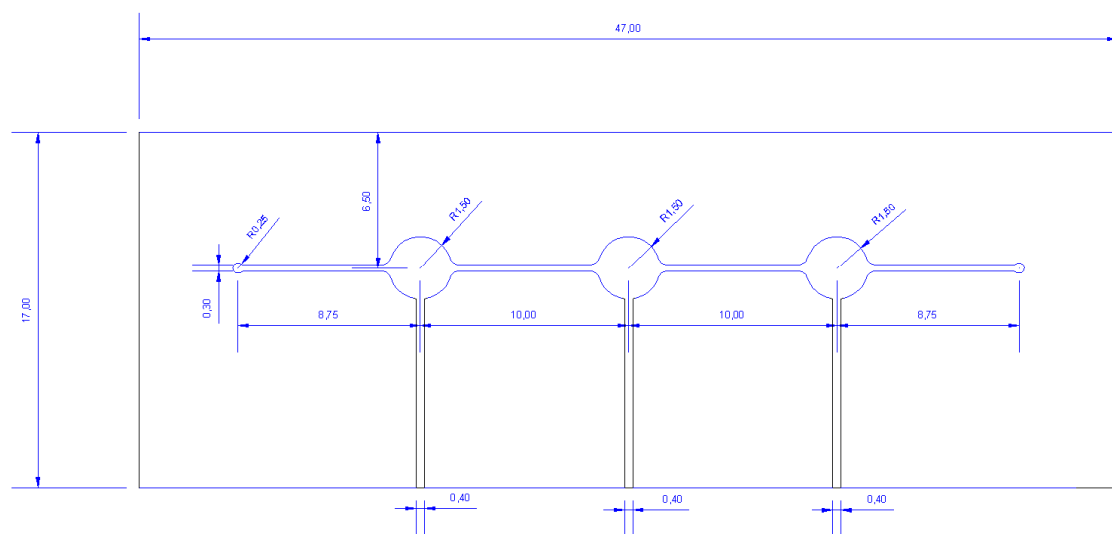
**Figura 3.4.** Rappresentazione schematica della piattaforma microfluidica progettata per l'accoppiamento con i biosensori; a) vista laterale; b) pianta

Nella nuova piattaforma il canale orizzontale rappresenta lo spazio all'interno del quale si muove il campione di fluido, mentre i microcanali laterali fungono da guida per l'alloggiamento degli elettrodi nel circuito microfluidico.

Le dimensioni del canale principale sono di 300  $\mu\text{m}$  di larghezza e di 250  $\mu\text{m}$  di altezza; la sezione trasversale è rettangolare. La parte terminale degli elettrodi viene inserita nel canale di scorrimento del fluido in corrispondenza di un pozzetto di forma cilindrica ed il raggio della sezione circolare di tale cavità è di 1.5 mm.

Il disegno della pianta quotata è rappresentato in Fig 3.5.

I fori nelle parti terminali del microcanale consentono l'inserimento dei condotti di



**Figura3.5:** Pianta della piattaforma microfluidica quotata in mm

Tale assetto permette di controllare più accuratamente il livello d'immersione dell'estremità biocatalitica del sensore e al tempo stesso di assicurare una migliore stabilità meccanica dell'elettrodo. Esso risulta infatti fissato più saldamente alla matrice siliconica e meno soggetto a spostamenti che potrebbero inficiare la misura.

Il nuovo design consente inoltre un perfezionamento dal punto di vista della perfusione della parte terminale dell'elettrodo, che viene investito pienamente dal flusso di medium.

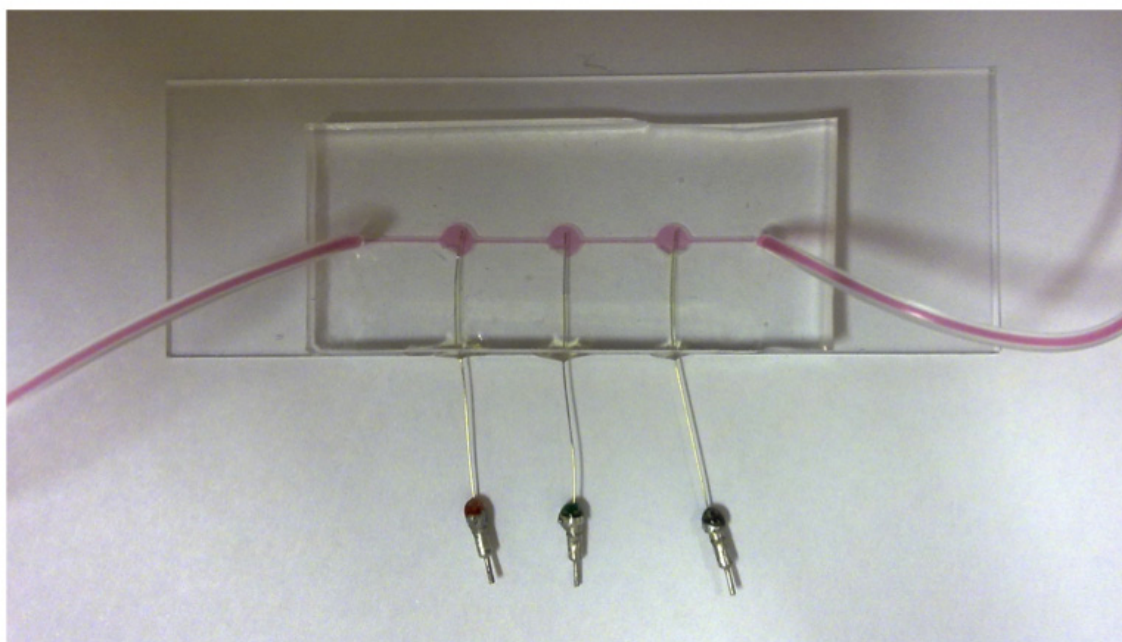
### 3.3.2 Prove di tenuta

Per verificare l'effettiva resistenza della piattaforma microfluidica sono state effettuate delle prove di tenuta idraulica, facendo fluire un tracciante liquido e verificando l'assenza di perdite.

Le prime prove sono state realizzate con un colorante alimentare, grazie al quale è possibile verificare in modo immediato la resistenza delle tenute e allo stesso tempo apprezzare il progressivo riempimento del circuito microfluidico, appurando il buon funzionamento fluidodinamico della piattaforma, come si può vedere in Fig. 3.6.

Successivamente il sistema è stato sollecitato lasciando scorrere nel circuito dell'acqua e applicando valori di portata progressivamente crescenti. L'intervallo di portate indagato è compreso tra 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

L'esito delle prove ha convalidato la buona tenuta idraulica della piattaforma multistrato.



**Figura 3.6:** Piattaforma microfluidica riempita con un tracciante colorato: il microcanale è completamente riempito e la tenuta idraulica è stagna

### 3.4 Prove preliminari in flusso

L'applicazione a sistemi in flusso di elettrodi microstrutturati, sviluppati in origine per la rilevazione di metaboliti in sistemi statici, costringe ad interfacciarsi con diverse problematiche, soprattutto per sistemi che accoppiano dispositivi di dimensioni micrometriche con sensori elettrochimici.

In sistemi in flusso, nonostante le dimensioni ridotte dei sistemi in questione, il contributo della convezione diventa significativo e la correlazione tra corrente misurata e concentrazione dell'analita in soluzione non si può evincere in maniera così diretta, come fatto per le prove in statica.

Come già visto, in particolare nel biosensore del glucosio in esame, il fatto che la reazione sia un processo multistadio rende ulteriormente complessa la situazione introducendo altri fattori rallentanti.

La struttura eterogenea del biosensore, in cui la deposizione di diversi strati sovrapposti di materiale polimerico rende difficile il raggiungimento dei siti biocatalitici e ancor di più della superficie metallica, aggrava ancora di più questa situazione.

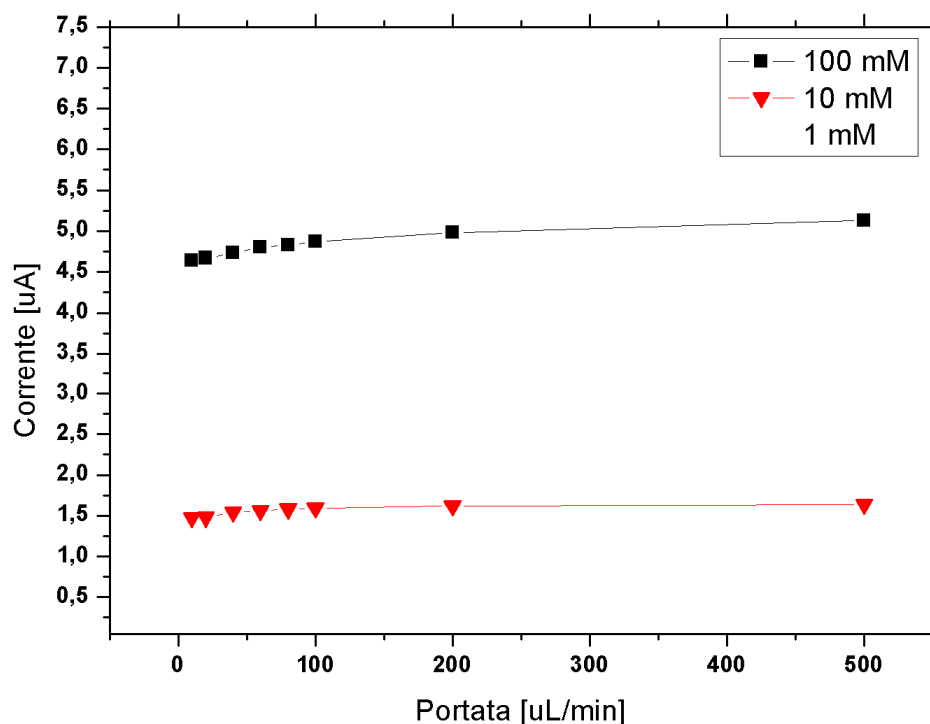
Al fine di effettuare un'indagine preliminare, per sondare se effettivamente la portata influenzi o meno la misura di corrente e per avere un'idea qualitativa degli effetti, sono state condotte delle indagini preliminari con soluzioni di perossido di idrogeno e PBS come elettrolita di supporto.

Le prove sono state condotte utilizzando la piattaforma microfluidica messa a punto come descritto. L'elettrodo di lavoro utilizzato è un microelettrodo di platino, cui viene applicato un potenziale di 0.7 V, corrispondente al potenziale di scarica dell'acqua ossigenata. Come per tutte le misure amperometriche, si è registrata la corrente passata attraverso l'elettrodo immerso nella soluzione.

Una volta giunti a stazionarietà, il fluido in moto è stato perturbato agendo sulla portata, che è stata modificata con una serie di impulsi a gradino di ampiezza variabile.

L'esperimento è stato condotto modificando la portata in un range compreso tra 10 uL/min e 500 uL/min, e la medesima prova è stata ripetuta per due soluzioni a diversa concentrazione: 10 mM e 100 mM. In questo modo è stato possibile indagare la sensibilità della corrente all'azione combinata di portata e concentrazione.

Il risultato ottenuto è visibile nel grafico di Fig 3.7.



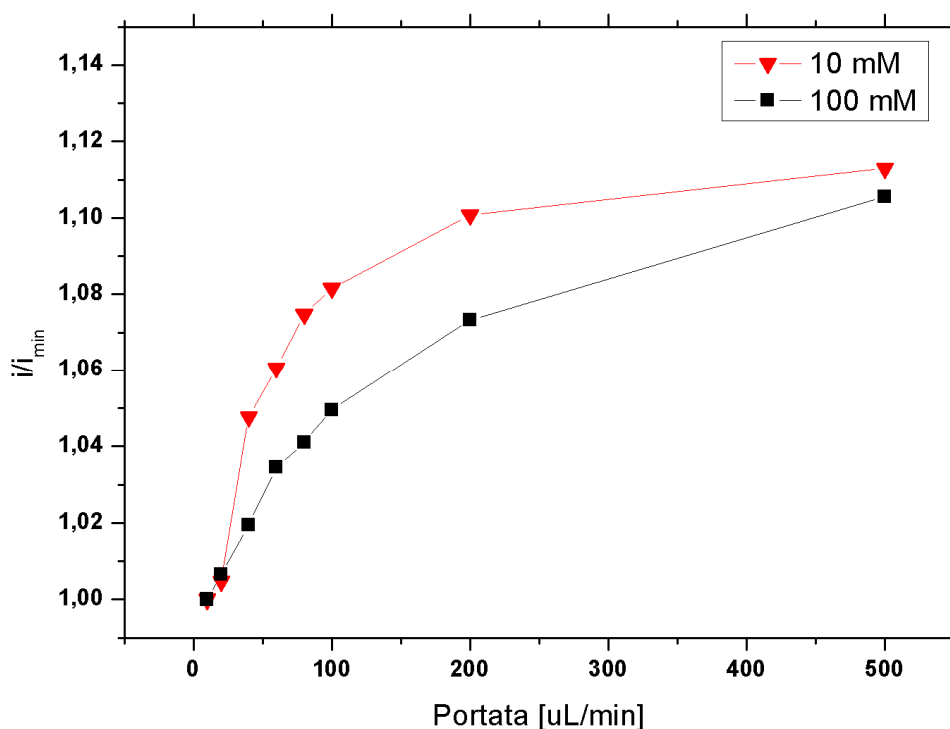
**Figura 3.7** Andamento della corrente in funzione della portata per le tre soluzioni di perossido di idrogeno rispettivamente 1 mM, 10 mM, 100 mM.

È evidente come a fronte di una variazione della portata di movimentazione del fluido, corrisponda un aumento di corrente.

L'accrescimento del flusso di elettroni registrato è imputabile al fatto che, modificando la portata, il fluido subisce un'accelerazione che induce un rifornimento più rapido di acqua ossigenata vicino alla superficie dell'elettrodo.

In particolare è stato osservato che l'amplificazione del segnale si manifesta con effetto istantaneo.

Il comportamento osservato per le due diverse soluzioni dimostra come le variazioni del segnale di corrente siano tanto più ampie quanto maggiore la presenza di acqua ossigenata nel mezzo fluido.



**Figura 3.8:** Corrente normalizzata rispetto al valore di corrente minima per le soluzioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$  alle concentrazioni 10 mM e 100 mM in funzione della portata

Diagrammando la corrente normalizzata rispetto al valore minimo registrato per ciascuna soluzione, si può facilmente osservare che, nell'intervallo tra 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , la modifica della portata produce una variazione della corrente significativa, per entrambe le miscele indagate.

Per valori di velocità di avanzamento del fluido superiori, però, si nota come la curva tenda ad appiattirsi fino ad assestarsi attorno ad un valore asintotico.

In particolare si può notare come l'asintoto venga raggiunto più rapidamente nel caso della soluzione più diluita.

Il trend osservato può essere spiegato assumendo che per valori di portata inferiori a 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  il regime fluidodinamico controllante è di tipo diffusivo ed il segnale di corrente rilevato è dipendente dalla portata; per valori superiori a questa soglia invece si verifica uno spostamento verso un regime di moto dominato dalla convezione la corrente risulta indipendente dalla portata.



# Capitolo 4

## Risultati

Alla luce delle considerazioni esposte nel capitolo precedente, sono stati condotti degli ulteriori esperimenti mirati alla caratterizzazione del comportamento del sistema microfluidico-elettrochimico in condizioni fluidodinamiche e chimiche che simulino quelle di un sistema biologico.

Il capitolo che segue analizza in maniera più dettagliata l'influenza della portata sulla misura di corrente, per un sistema in flusso con valori di portata molto restrittivi; vedremo come ciò introduca ulteriori problemi nell'acquisizione e nell'interpretazione dei fenomeni alla base della meccanismo di rilevazione del sensore.

Nei paragrafi successivi si fa cenno anche ai tempi di risposta del sistema, a fronte di variazioni di portata e di concentrazione. Vengono quindi successivamente esplicate le ipotesi fatte per spiegare i fenomeni osservati e le soluzioni per migliorare la qualità della misura.

### **4.1 Effetto della portata sulla corrente**

Come spiegato poco sopra, mimare condizioni analoghe a quelle proprie dei sistemi biologici ha posto il problema di ridurre drasticamente il valore di portata; il campo d'indagine è stato quindi circoscritto ad un intervallo di valori compreso tra 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Le medesime prove sperimentali sono state eseguite sia con soluzioni di glucosio, sia con soluzioni di perossido di idrogeno, alla stessa concentrazione.

#### ***4.1.1 Prove in flusso con soluzioni di glucosio e acqua ossigenata***

Le soluzioni impiegate nella misurazioni amperometriche sono state ottenute sciogliendo il DMEM *High Glucose* in DMEM *Glucose free*, fino ad una concentrazione pari a 1 mM e 5 mM.

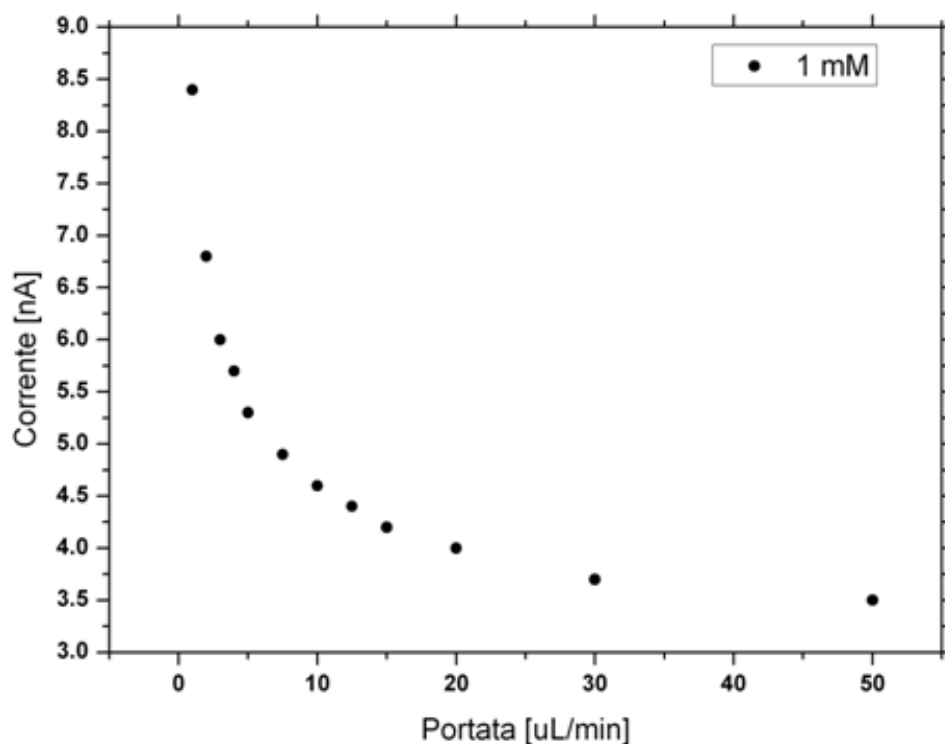
La scelta di utilizzare il medium di coltura cellulare come solvente è stata dettata dall'esigenza di riprodurre il più fedelmente possibile le condizioni che si possono creare

a valle di una camera di coltura cellulare, dove la corrente in uscita è costituita da medium esausto, ricco di prodotti del metabolismo cellulare.

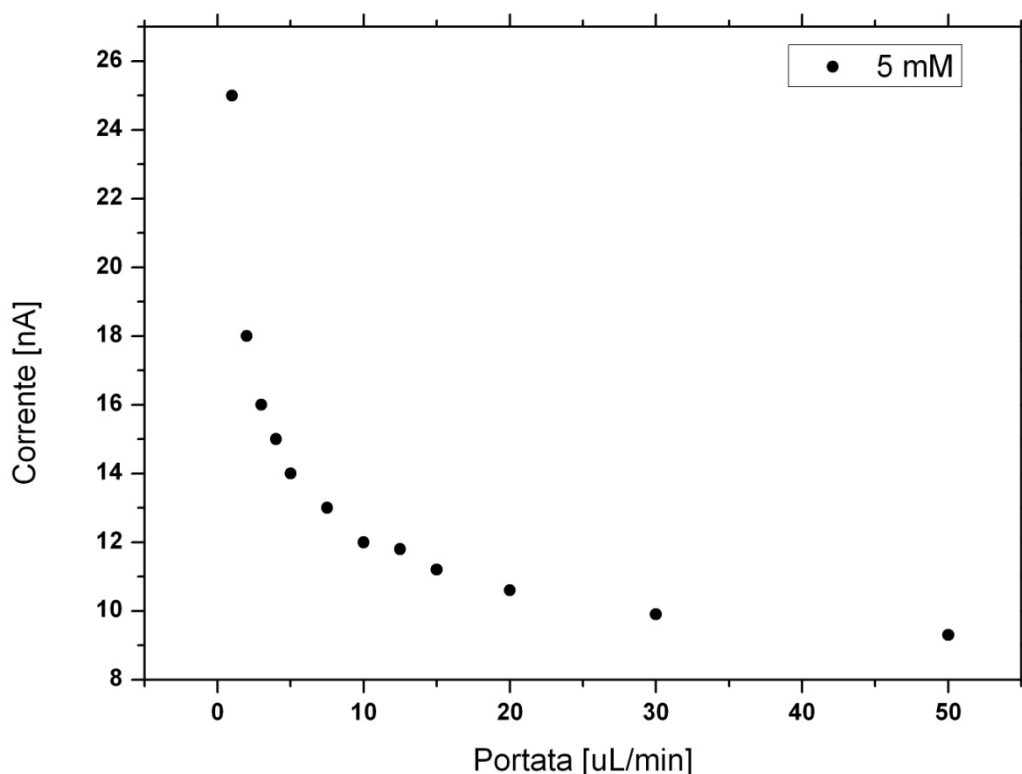
I valori di 1 mM e 5 mM rappresentano indicativamente la concentrazione minima e massima che si possono avere all'uscita della camera di coltura, a seguito di un consumo metabolico.

Le prove sono state condotte alimentando inizialmente del PBS per consentire l'assestamento del valore di corrente intorno a quello basale, poi è stata cambiata la siringa ed è stata alimentata la soluzione di glucosio alla portata di 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . I valori di corrente corrispondenti alle diverse portate considerate sono stati ricavati variando da 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  al valore da studiare, attendendo che si raggiungesse un nuovo stazionario e ritornando nuovamente al valore di 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; tale sequenza di operazioni è stata effettuata per tutte le portate da analizzare.

I risultati ottenuti sono rappresentati in Fig. 4.1 e Fig. 4.2.



**Figura 4.1:** Andamento dell'intensità di corrente in funzione della portata per una soluzione 1 mM di DMEM High Glucose in DMEM Glucose free.



**Figura 4.2:** Andamento dell'intensità di corrente in funzione della portata per una soluzione 5 mM di DMEM High Glucose in DMEM Glucose free.

Per entrambe le soluzioni analizzate si nota come, all'aumentare della portata, l'intensità di corrente rilevata decresca progressivamente, salvo poi appiattirsi fino al raggiungimento di un plateau in corrispondenza alla portata di circa  $30 \mu\text{L}/\text{min}$ ; a partire da questo valore, anche a fronte di aumenti successivi della portata, la corrente non subisce ulteriori modifiche.

Il risultato è inaspettato, perché si potrebbe pensare che l'incremento della portata, e quindi della velocità d'avanzamento del fronte di fluido, determini un innalzamento della corrente prodotta grazie ad un più rapido apporto di glucosio.

L'andamento osservato induce invece a credere che all'aumentare della portata s'instauri un regime di moto in cui la predominanza del trasporto convettivo sulla diffusione provochi lo strappaggio dell'acqua ossigenata prodotta prima che questa abbia il tempo di diffondere fino alla superficie del biosensore, dove dovrebbe ossidarsi con conseguente produzione di corrente.

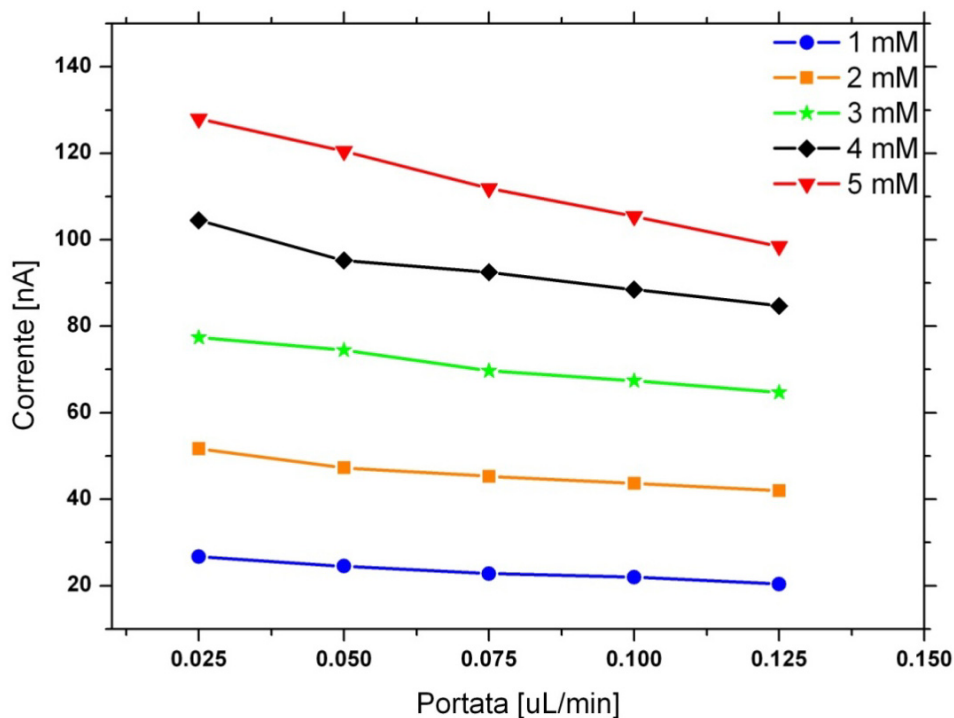
L'allontanamento della specie elettroattiva non ancora reagita dalla superficie del sensore ne impedisce la scarica ed il segnale di corrente risulta sensibilmente attenuato.

L'effetto di attenuazione del segnale rilevato è tanto più marcato quanto più alto è il valore di portata, fino al raggiungimento di un minimo asintotico.

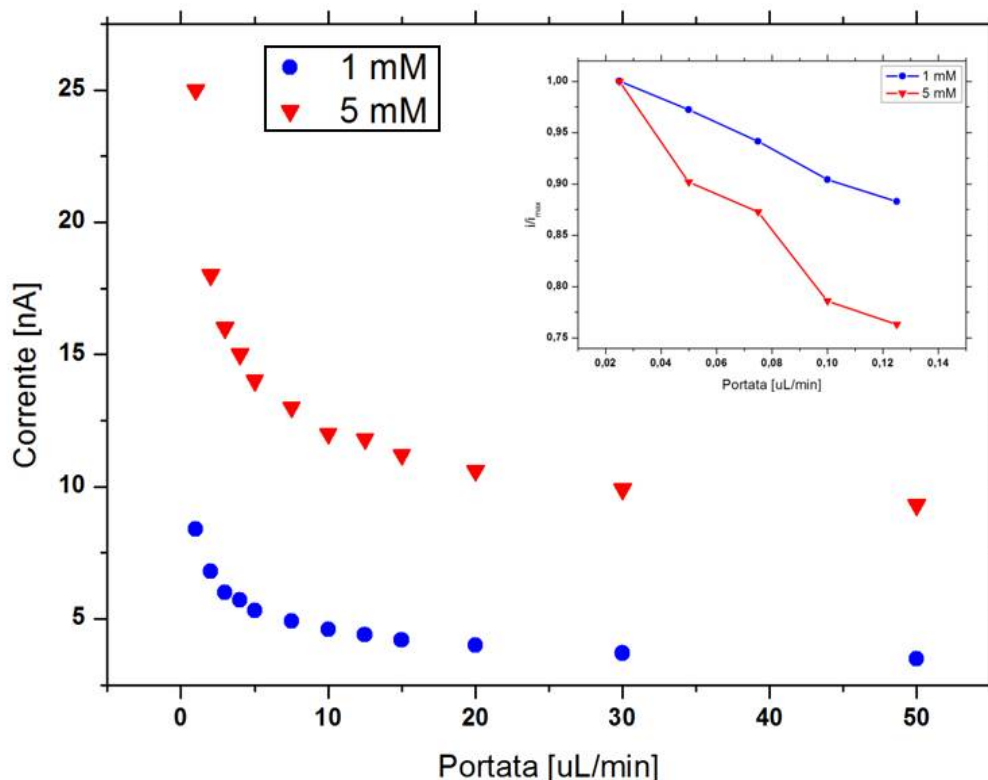
Per particolari applicazioni biologiche, potrebbe presentarsi l'eventualità di dover utilizzare campi di portata ancora inferiori rispetto a quello investigato.

Per questo motivo sono state effettuate delle misure con valori di portata compresi tra 0.025 e 0.125  $\mu\text{L}/\text{min}$ , per soluzioni alle concentrazioni di 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM e 5 mM di DMEM *High Glucose* in DMEM *Glucose free*.

I risultati ottenuti sono illustrati nei grafici di seguito.



**Figura 4.3:** Andamento dell'intensità di corrente in funzione della portata per cinque soluzioni di DMEM High Glucose in DMEM Glucose free, di concentrazione 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM e 5 mM.

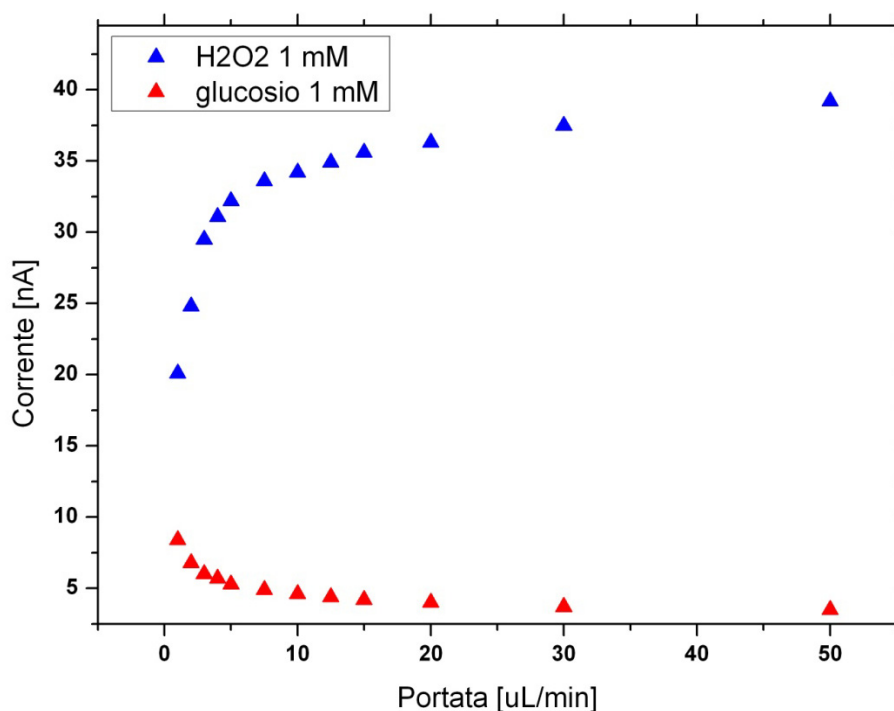


**Figura 4.4:** Andamento della corrente in funzione della portata: confronto tra le soluzioni 1 mM e 5 mM. Nel riquadro, profilo di corrente normalizzato per le due soluzioni, sempre in funzione della portata.

Questi ultimi test hanno confermato la tendenza messa in luce dalle prove preliminari. Tuttavia da queste prove non si riesce a stabilire una chiara correlazione tra la concentrazione della soluzione e la variazione dell'intensità di corrente in conseguenza della perturbazione (per i grafici della corrente normalizzata si rimanda all'appendice A).

L'osservazione del comportamento delle soluzioni di glucosio e le ipotesi fatte hanno suggerito la possibilità di effettuare le medesime prove con soluzioni di perossido di idrogeno 1 mM e 5 mM.

La portata è stata variata ancora una volta all'interno del range di valori compreso tra 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Nel grafico di seguito è illustrato l'andamento della corrente registrato con le soluzioni di acqua ossigenata a confronto con quello ottenuto in precedenza con le soluzioni di glucosio.



**Figura 4.5:** Andamento della corrente in funzione della portata: confronto tra una soluzione 1 mM di DMEM High Glucose in DMEM glucose free e una soluzione 1 mM di perossido di idrogeno in DMEM Glucose free.

E' assolutamente evidente come la tendenza dell'acqua ossigenata sia in completa opposizione al comportamento delle soluzioni di glucosio: le soluzioni di perossido di idrogeno esibiscono un netto aumento dell'intensità di corrente per valori di portata crescenti.

Il risultato ottenuto non fa che confermare l'ipotesi del lavaggio dell'acqua ossigenata ad opera della corrente principale: infatti le soluzioni dei due soluti diversi, a parità di concentrazione, dovrebbero, in linea torica, produrre la stessa corrente, in quanto il rapporto stechiometrico tra glucosio reagente e acqua ossigenata prodotta è 1:1. Nel caso delle soluzioni di acqua ossigenata, questa si scarica istantaneamente in quanto già contenuta nella soluzione di alimentazione, diversamente da quanto accade con le soluzioni di glucosio, dove viene prodotta ma non ha tempo di ossidarsi sul metallo.

Lo step limitante è quindi da attribuirsi ai rallentamenti legati alla diffusione dell'acqua ossigenata attraverso il doppio strato poroso polimerico, oltre che da un fattore intrinseco collegato al fatto che la reazione è un processo multistadio.

Dal confronto dei valori di corrente sviluppati dalla soluzione di perossido di idrogeno e quelli sviluppati dalle soluzioni di glucosio è stato possibile stimare un'efficienza di misura del sensore dato dal rapporto tra i primi ed i secondi, come rappresentato nell'immagine di Fig. 4.7.

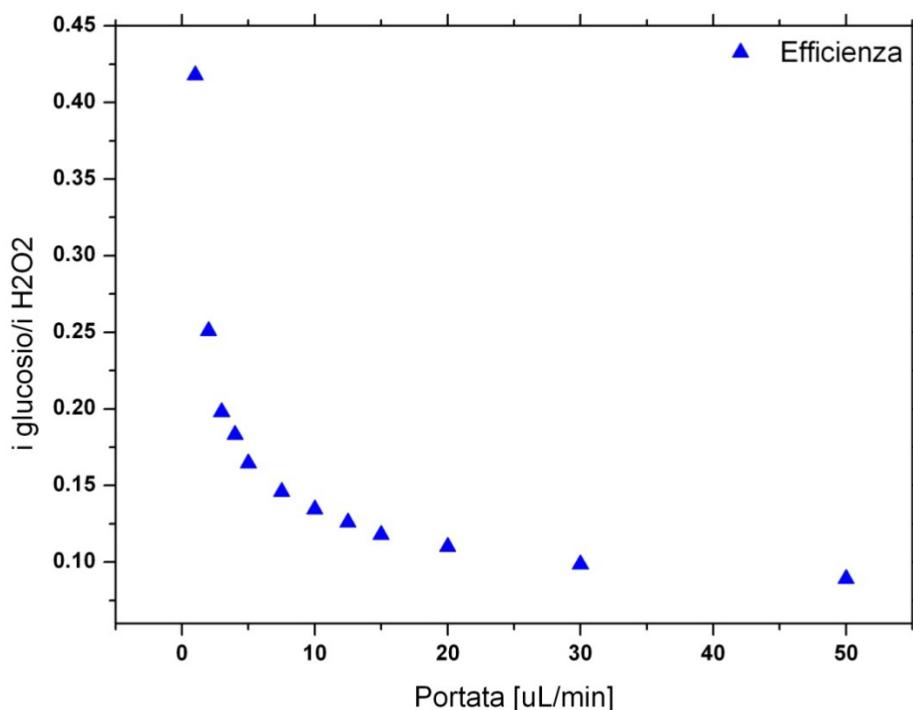


Figura 4.6: Efficienza di rilevazione della concentrazione di glucosio in funzione della portata

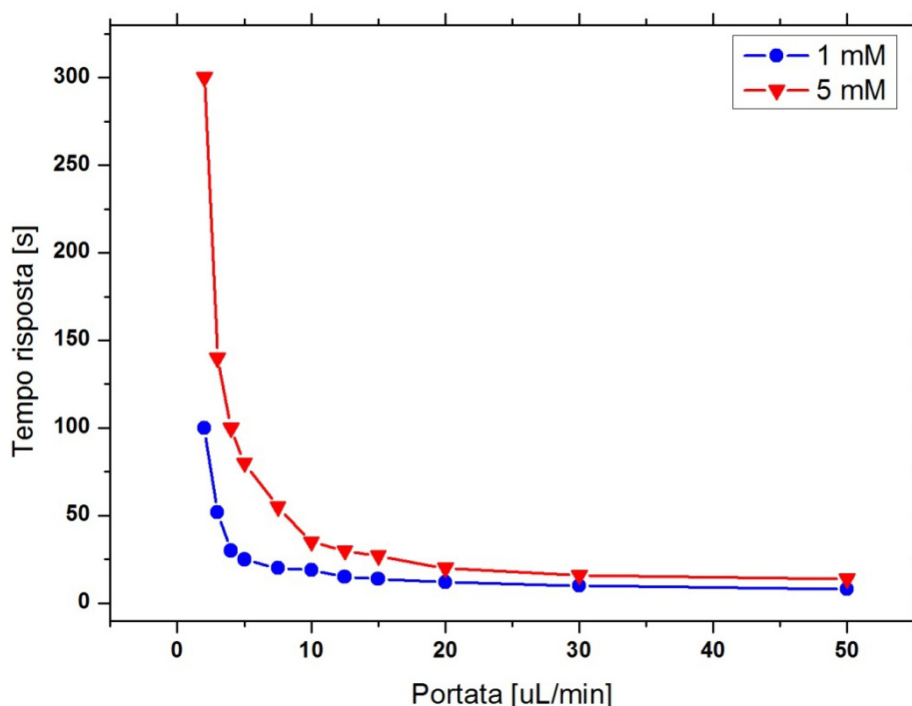
Dal grafico si evince come effettivamente si riesca a rilevare solo una percentuale del glucosio presente nel flusso; tale valore si riduce drammaticamente quando la portata sale al di sopra di 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Alla luce di ciò, si capisce come convenga lavorare con valori di portate relativamente basse, intorno a 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

## 4.2 Tempi di risposta del sistema

Quanto visto ha messo in luce la necessità di utilizzare valori ridotti di portata per minimizzare il fenomeno di strappaggio dell'acqua ossigenata prodotta sulla superficie del biosensore. Tuttavia, durante le prove sperimentali a portata variabile, è stato osservato che i tempi di risposta del sistema a fronte di una perturbazione sono tanto più lenti quanto minore è la velocità del fluido nel micro canale.

Quanto detto trova riscontro nel grafico riportato di seguito (Fig. 4.8).



**Figura 4.7:** Andamento del tempo di risposta in funzione della portata per due soluzioni di glucosio in DMEM alle concentrazioni 1 mM e 5 mM

Al crescere della velocità di scorrimento del fluido, i tempi del transitorio si riducono notevolmente fino a raggiungere un valore stabile.

I tempi di risposta per il valore indicativo di 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  richiede circa 300 secondi per l'esaurimento del transitorio, per una soluzione di concentrazione 5 mM. L'effetto è attenuato quanto più è diluita la soluzione.

Per il buon funzionamento del sistema è però necessario che il tempo di misura sia confrontabile con il tempo di campionamento e per ovviare a tale problema si è proposto l'utilizzo di un *loop* di campionamento.

Con questo accorgimento è possibile scorporare la portata di processo da quella di *sampling*, così da utilizzare, per l'ingresso del campione di misura, quella più adatta ad ottenere un buon compromesso tra efficienza di misura e tempo di risposta.

# Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata messa a punto una piattaforma microfluidica integrata con biosensori microstrutturati per l'analisi in linea di metaboliti.

Nella fase preliminare dello studio sono state effettuate delle misure cronoamperometriche in statica per la caratterizzazione del biosensore.

Per il trasferimento delle conoscenze ottenute nel sistema batch ad un sistema in flusso è stata progettata la piattaforma, con una geometria ottimale per il rispetto dei vincoli imposti dalla fluidodinamica e dalla struttura del biosensore, successivamente realizzato ricorrendo a tecniche di microfabbricazione.

Con il dispositivo così ottenuto si è riusciti a studiare in modo più approfondito e mirato il comportamento del sistema, investigando il ruolo della portata quale variabile fondamentale per la qualità della misura. Per quantificare l'effetto della portata sono state condotte prove con acqua ossigenata e si è riusciti ad ottenere una stima dell'efficienza di rilevamento del sensore amperometrico, con cui si è stabilito un range di portate ottimali da utilizzare per rilevare una frazione sufficiente del glucosio nella corrente principale.

Per la risoluzione del problema relativo alla dilatazione dei tempi di risposta del sistema è stato adattato alla piattaforma microfluidica un *loop* di campionamento in modo tale da incorporare il valore di portata di processo da quello di movimentazione del campione di misura.



# APPENDICE A

## Grafici

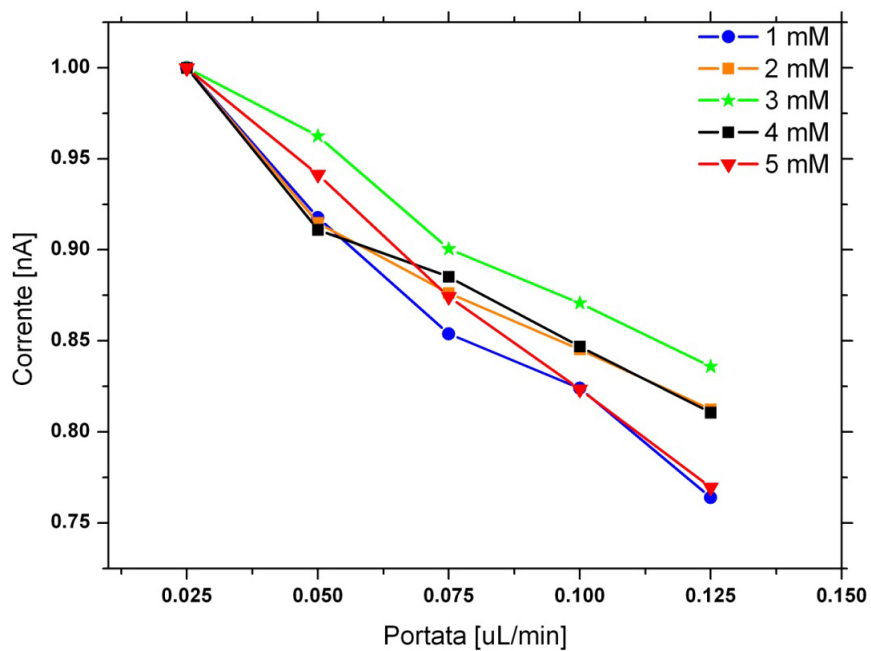
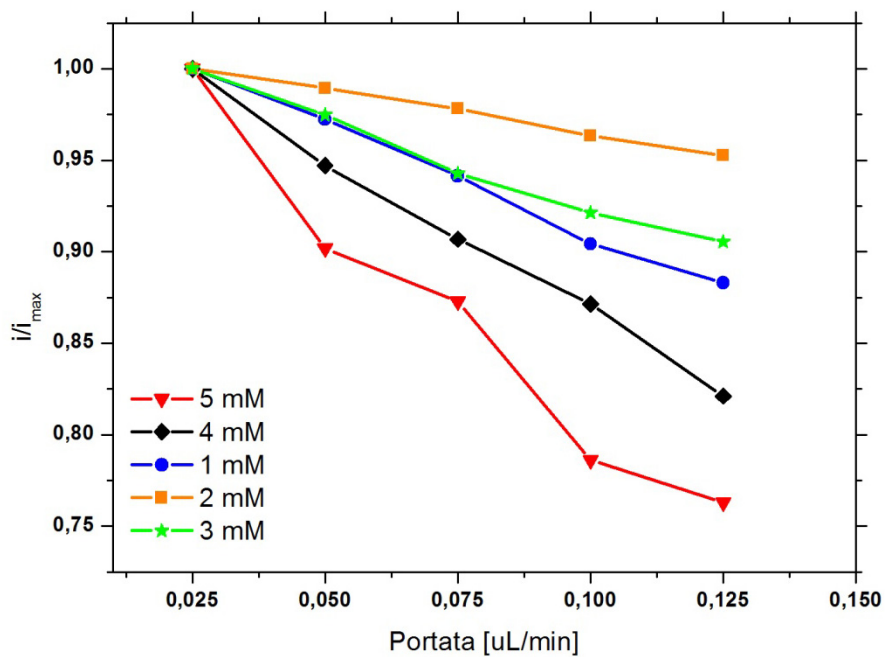


Figura 1.A- 2.A: Andamento della corrente normalizzata rispetto alla corrente massima in funzione della portata



# Riferimenti bibliografici

Amatore C., De Mota N., Sella C., Thouin L., “*General Concept of High- Performance Amperometric Detector for Microfluidic (Bio)Analytical Chips*” *Analytical Chemistry*, No. 80, 2008, pp 4976- 4985

Conroy P., Hearty S., Leonard P., O’Kennedy, R., “*Antibody production, design and use for biosensor-based applications*”, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, No. 20, 1, 2009, pp10-26.

Heller A., “*Amperometric biosensors*”, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 7, Issue 1, 1996, pp 50-54.

Heller A., Feldman B., “*Electrochemistry in diabetes management*”, *Accounts of Chemical research*, No. 43(7), 2010, pp 963-73.

Kappes T., Galliker B., Schwarz M. A., Hauser P.C., “*Portable capillary electrophoresis instrument with amperometric, potentiometric and conductometric detection*”, *Trends in analytical Chemistry*, No 20, Issue 3, 2001, pp 133-139.

Moser I., Jobst G., Urban G. A., “*Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine*”, *Biosensors and Bioelectronics*, No 17(4), 2002, pp 297-302.

Mulchandani A., Chen W., Mulchandani P., Wang J., Rogers K.R., “*Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides*”, *Biosensors & Bioelectronics*, No. 16, 2001, pp 225-230

O’Neill R. D., Lowry J. P., Rocchitta G., McMahon C. P., Serra P. A., “*Designing sensitive and selective polymer/enzyme composite biosensors for brain monitoring in vivo*”, *Trends in Analytical chemistry*, Vol. 27, No. 1, 2008.

Palmisano F., Rizzi R., Centonze D., Zambonin P.G., “*Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerised thin films*”, *Biosensors & Bioelectronics*, No. 15, 2000, p 531- 539.

Pumera M., Merkoçind A., Alegret S., “*New materials for electrochemical sensing VII. Microfluidic chip platforms*” Trends in Analytical Chemistry, No. 25, Issue 3, 2006, pp 219-235.

Serra P. A., Rocchitta G., Bazzu G., Manca A., Puggioni G. M., Lowry J. P., O’Neill R. D., “*Design and construction of a low cost single-supply embedded telemetry system for amperometric biosensor applications*”, Sensors and Actuators B, No. 122, 2007, pp 118-126.

Thévenot D. R., Toth K., Durst A. R., Wilson G., “*Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*”, Biosensors & Bioelectronics, No. 16, 2001, pp 121–131.

Toghill K. E., Compton R. G., “*Electrochemical Non-enzymatic Glucose Sensors: A Perspective and an Evaluation*”, International Journal of Electrochemical Science, No. 5, 2010, pp 1246-1301.

Frey O., Talaei S., Van der Wal P. D., Koudelka-Hep M., De Roij N. F., “*Continuous-flow multi-analyte biosensor cartridge with controllable linear response range*”, Lab on a chip, No. 10, 2010, pp 2226-2234.

# Ringraziamenti

Incredibile ma vero...anche per me è arrivato il fatidico giorno! Anzi, forse proprio perché il mio percorso è stato un po' accidentato e ci sono stati momenti in cui il traguardo è sembrato lontanissimo (ma mai inarrivabile!), la soddisfazione oggi è ancora più grande. Ma questo successo è frutto anche dell'appoggio che ho avuto da molte persone, che per me sono state importantissime!

Per questo un grandissimo grazie va ad Antò e Berto perché, nonostante gli innumerevoli sermoni, hanno sempre creduto nelle mie possibilità e mi hanno spronata a tenere duro.

Un ringraziamento con tutto il cuore è per Za, per avermi messa sempre al primo posto, per avermi dato la carica nei momenti no, per le mille mila ore a studiare e anche per avermi finalmente insegnato ad impaginare la tesi! E per un sacco di altre cose...segrete. E per Pepe! Oggi festeggiamo insieme Dottore!

Grazie mille anche Nicola, per avermi dato l'opportunità di lavorare nel suo gruppo e per la soddisfazione che mi ha dato per il lavoro svolto...e anche e soprattutto per le divagazioni!

Un sentito ringraziamento va anche alla Prof.ssa Giomo per il tempo dedicato a mettere a punto il modello matematico.

Grazie a Flambert per avermi seguita con assiduità durante il periodo di tesi, nonostante tutti i battibecchi...e grazie anche per aver prestato a Luca le scarpe per la partita di calcetto!

Un ringraziamento speciale al Pollastro, ora ti devo restituire quell'abbraccio che mi hai dato alla fine del tuo esame...me lo ricorderò per sempre. Dai che ora recuperiamo tutto il tempo perduto negli ultimi sei mesi...

Grazie mille a Francy e Sadomax, perché a volte sono latitante, ma nonostante questo voi ci siete sempre!

Un grandissimo grazie a Rizzo, e a Flanny, che così la smetterà di chiamarmi "trenta denari": perché insieme a voi il tempo vola...vecchia la Groenlandia non salta, è solamente rimandata.

Grazie di cuore ad Ally, Rosa e Stefy per le indimenticabili gag siciliane e non.

Un grazie di cuore anche alla Lesi, per tutti i momenti che abbiamo condiviso e per tutti quelli che verranno.

Grazie mille ad Elle e a Fabietto, per gli aperitivi e per aver sopportato tutti i mie bidoni...ah, e per l'opus cementsiumumu!

Non posso dimenticare di ringraziare tutto il Bioera Lab, in particolare a tutti i biotech a cui ho tolto la vita per farmi preparare le soluzioni.

Un ringraziamento esclusivo lo devo però riservare a Luca: per le penne, il caricabatterie, il caffè, il silicone, il wafer nel forno, il cristallizzatore, i disegni in Autocad e non ultimo il gossip sfrenato e per le risate...e soprattutto per Mario Maria Raman!!!!!!

Un ringraziamento, ed è davvero sincero, a Cla, Niki, Tony, Tini, Baldi Pelle, Pez, Loris, Nico, Ste: perché sono bastati pochi giorni e mi avete fatta sentire come se ci conoscessimo da sempre.

Grazie di cuore a tutti i miei compagni di volley, tutti insieme ed ognuno singolarmente, perché con voi mi diverto talmente tanto da riuscire a schiodarmi dal divano il lunedì sera.

Grazie di cuore a tutti i miei parenti, che non posso citare ad uno ad uno perché troppi, ma sui quali so di poter sempre contare. Grazie soprattutto a Betty, perché ora che stiamo a 5 metri di distanza ho un po' meno voglia di andarmene di casa, a Nicco, Alice e Fede, Daria, Valeria, Matteo e Alessandra...e Vieri!

In ultima, ma non perché meno importante, un ringraziamento di cuore anche al VinTim & Friends, per avermi ritenuta all'altezza di entrare nel "& Friends" e per le pigozzate sempre ad altissimo livello!

