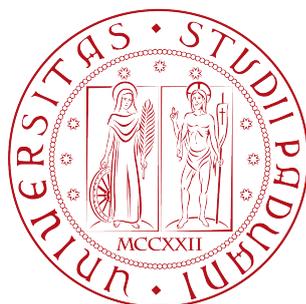


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE



Studio sui dispositivi plasmonici

Relatore:

Prof. Alessandro Paccagnella

Correlatore:

Dott.ssa Elisabetta Pasqualotto

Laureando:

Giovanni Pinaroli

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

A coloro che hanno saputo credere in me.

Indice

Introduzione	5
1 Risonanza Plasmonica	7
1.1 Plasmoni di superficie	7
1.2 Eccitazione ottica: Risonanza plasmonica	9
2 Tipi di misura	11
2.1 Misure ottiche	11
2.2 Misure elettriche	13
3 Sensori SPR	17
3.1 Configurazioni ottiche	18
3.1.1 Configurazione a prisma	19
3.1.2 Configurazione con reticolo	21
3.1.3 Configurazione a guide d'onda	22
3.2 Parametri caratteristici	24
3.2.1 Sensibilità	25
3.2.2 Risoluzione	26
3.2.3 Limite di rilevabilità	28
4 Biosensori per affinità	29
4.1 Funzionalizzazione della superficie	30
4.1.1 Rivestimento della superficie con uno strato autoassemblante (SAM)	31
4.1.2 Immobilizzazione tramite legami covalenti	31
4.1.3 Immobilizzazione tramite cattura	32
4.1.4 Accoppiamento tramite strato di lipidi	33
4.2 Elementi di funzionalizzazione	34
4.2.1 Proteine	34
4.2.2 Peptidi	34
4.2.3 Oligonucleotidi	34
4.2.4 Piccole molecole organiche	35
4.2.5 Carboidrati	35

5 Applicazioni	37
5.1 Ormoni	37
5.2 Farmaci	38
Conclusioni	41
Bibliografia	43

Introduzione

I progressi che si sono succeduti in ambito scientifico-tecnologico hanno permesso di migliorare i trattamenti forniti dalla medicina a vantaggio della qualità di vita. Le moderne cure per la salute prevedono l'applicazione di metodi diagnostici basati sul monitoraggio e/o sull'identificazione di quei tratti caratteristici, che vengono alterati dalle malattie oggi presenti. Tutti questi metodi vengono applicati nei laboratori specializzati i quali attraverso innovative apparecchiature riescono a venire incontro alle esigenze dei pazienti e degli specialisti. In questi ultimi anni si sta affermando una particolare classe di questi dispositivi basati sulla tecnica di risonanza plasmonica di superficie (SPR). Questi in particolare rappresentano l'ultima frontiera per i biosensori label-free capaci di determinare una misurazione che sfrutta il fenomeno della risonanza plasmonica. La tecnica a SPR si basa sull'omonimo fenomeno ottico che consente l'osservazione in tempo reale dell'interazioni di legame fra un'analita in soluzione ed un ligando immobilizzato sulla superficie del sensore. Le applicazioni della tecnica SPR sono numerose, sia nel campo farmaceutico e diagnostico che in quello genetico e nano-tecnologico. Infatti la tecnica a SPR può essere applicata per sistemi di drug discovery, regolazione dei geni o più generalmente sugli studi di struttura e di funzione di biomolecole. Ad esempio è utilizzata per:

- caratterizzare la cinetica, l'affinità e la stechiometria d'iterazione,
- determinare la concentrazione di un componente in una concentrazione,
- realizzare studi termodinamici,
- studiare l'effetto del mezzo su un'interazione (pH, sali, additivi, etc. . .),
- la cattura di ligando sconosciuto,
- rilevazione di epitopi, etc.

Le iterazioni comunemente usate includono:

- Proteina-proteina
- Proteina - D.N.A

- Proteina - Piccole Molecole < 100Da
- Anticorpo - Antigene
- Recettore di Membrana-Ligando
- Peptide - Recettore

La medicina moderna è senza alcun dubbio indirizzata ad operare tramite queste nuove tecniche di diagnosi basate sul monitoraggio dei biomarcatori presenti nei fluidi biologici ed è proprio grazie a queste tecniche innovative, che è tutt'oggi possibile diagnosticare malattie molto gravi in fase ancora non dannosa prima della comparsa dei sintomi caratteristici. Inoltre il continuo monitoraggio di questi marcatori biologici permette di determinare in alcune situazioni, la predisposizione dei soggetti a determinate malattie aumentando così il campo di prevenzione che la medicina può offrire oggi.

Senza alcun dubbio i biosensori SPR saranno un forte candidato come tecnologia di base per tutti i sistemi di analisi per la diagnostica che la medicina moderna dovrà introdurre nei protocolli futuri. Lo scopo di questa tesina è di presentare in modo generale la classe dei sensori SPR descrivendone i principi di funzionamento, alcune configurazioni con le quali vengono utilizzati e fornire alcuni esempi di applicazione.

Capitolo 1

Risonanza Plasmonica

La Risonanza Plasmonica è un particolare fenomeno fisico che interessa i plasmoni di superficie. La sua esistenza fù dimostrata per la prima volta dal fisico W. Otto nel 1968. Questo fenomeno è alla base di molti strumenti standard per la misurazione dell'adsorbimento del materiale su superfici metalliche planari (in genere oro e argento) o su superfici di nanoparticelle di metallo, e sta alla base di molte applicazioni di biosensori basati sul colore e a diversi sensori lab-on-a-chip.

1.1 Plasmoni di superficie

In fisica della materia, il plasmon è un'eccitazione collettiva di elettroni del plasma contenuto in un sistema finito di cariche quando esse vengono eccitate da un campo elettromagnetico oscillante. Considerando come sistema la superficie di un solido, se l'eccitazione rimane circoscritta sulla superficie questa viene definita plasmon di superficie [4]. Prendendo in esame un contatto tra un superficie metallica e un materiale dielettrico, associamo ad ognuno dei seguenti strati una permittività complessa cioè nella forma

$$\varepsilon_m = \varepsilon'_m + i\varepsilon''_m \quad (1.1)$$

$$\varepsilon_d = \varepsilon'_d + i\varepsilon''_d$$

dove ε'_j e ε''_j rappresentano la parte reale e complessa di ε_j (j ad indicare i casi di m e d).

L'analisi tramite le equazioni di Maxwell con le opportune condizioni al contorno permettono di dimostrare che una siffatta struttura supporta solo una modalità di trasmissione del campo elettromagnetico: i plasmoni di superficie. Questi, rappresentano un modo di trasmissione del tipo magnetico trasversale (TM) dove il vettore del campo magnetico è posto sul piano dell'interfaccia metallo-dielettrico ed è perpendicolare alla direzione di propagazione. Per rappresentare l'andamento del campo magnetico ci si può

servire di un sistema di riferimento cartesiano dove il metallo occupa la regione $z < 0$ e i plasmoni di superficie si propagano lungo l'asse x allora, il vettore dell'intensità magnetica lungo i plasmoni può essere scritto come

$$\mathbf{H}_j = (0, H_y, 0)_j = (0, 1, 0)Ae^{(-\alpha_j z + i(\beta x - \omega t))} \quad (1.2)$$

dove ω è la frequenza angolare, t è il tempo, β è la costante di propagazione e $\alpha_j = \sqrt{\beta^2 - (\omega/c)^2 \epsilon_j}$ dove j sta ad indicare m (metallo) o d (dielettrico). Associato al vettore intensità magnetica è presente, perpendicolarmente, anche il vettore del campo elettrico che si può calcolare tramite equazioni di Maxwell. Un tipico profilo del campo magnetico dei plasmoni di superficie è mostrata in figura 1.1.

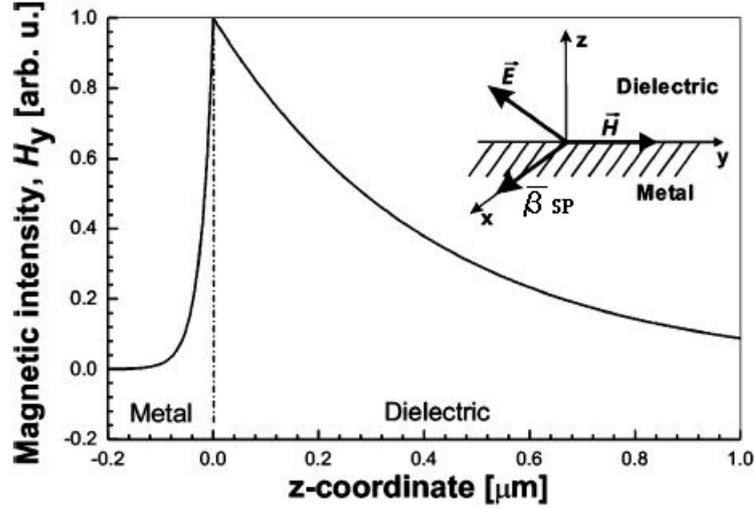


Figura 1.1: Distribuzione spaziale dell'intensità magnetica di un plasmonone di superficie nell'interfaccia tra oro e un dielettrico con $\epsilon_d = 1.328$.

L'intensità del campo magnetico raggiunge il massimo in corrispondenza della superficie di contatto tra i due materiali e diminuisce man mano che ci si allontana da questa. Il campo decade in direzione perpendicolare alla superficie di contatto ed è caratterizzato da una penetrazione definita come la distanza tra la superficie di contatto e il punto dove il campo è attenuato di un fattore e (base del logaritmo naturale). Tale grandezza dipende dalla lunghezza d'onda usata e dalla costante dielettrica del materiale presente. La costante di propagazione dei plasmoni di superficie in una superficie di contatto tra metallo e dielettrico è:

$$\beta_{SP} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (1.3)$$

dove λ è la lunghezza d'onda nel vuoto e ϵ_m e ϵ_d sono la permittività elettrica rispettivamente del metallo e del dielettrico che si utilizza [2].

1.2 Eccitazione ottica: Risonanza plasmonica

La risonanza plasmonica è un'oscillazione coerente dei plasmoni di superficie eccitati da una radiazione elettromagnetica (luce, laser, ecc). Si è dimostrato che tutti i materiali che presentano una costante dielettrica con parte reale negativa e parte immaginaria positiva, supportano tale fenomeno fisico. L'onda della radiazione può, in certi casi, accoppiarsi tramite il campo evanescente generatosi nel punto di riflessione interna con la superficie plasmonica tra il metallo e il dielettrico. Questa situazione si verifica se e solo se la componente del "vettore-onda" è parallela alla superficie d'interfaccia. Tale accoppiamento può essere indotto attenuando per la quasi totalità i fenomeni di rifrazione e diffrazione. Questo miglioramento è ottenuto tramite specifici dispositivi d'accoppiamento [2]. Le più comuni configurazioni d'accoppiamento usati nei sensori SPR sono:

- a) prisma
- b) guida d'onda
- c) reticolo

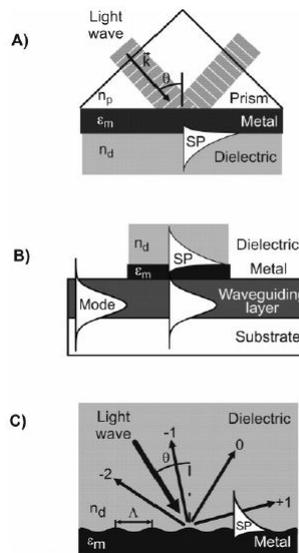


Figura 1.2: Accoppiamento luce-superficie plasmonica tramite (a)prisma (b)guida d'onda (c)reticolo.

In queste condizioni si osserva che si viene a generare un'onda evanescente che penetra all'interno della superficie metallica (strato sottile detto film). Tale onda si propaga all'interno della superficie d'interferenza con una determinata costante di propagazione adeguatamente corretta, viste le condizioni

di risonanza. Per esempio, nel caso di accoppiamento con prisma, si ottiene che tali condizioni sono soddisfatte per:

$$Re\{\beta\} = \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (1.4)$$

In pratica, quando il prisma viene illuminato, la luce passa attraverso il vetro ed è riflessa dal rivestimento. Ad un angolo superiore all'angolo critico θ_c ($n_1 > n_2$), osserviamo una totale riflessione della luce (Total internal reflection).

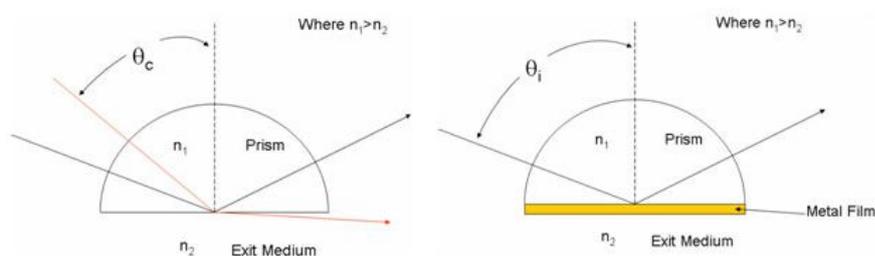


Figura 1.3: Angoli notevoli

Ad un certo angolo d'incidenza $\theta_i > \theta_c$, una porzione dell'energia luminosa si trasmette attraverso il rivestimento in metallo (oro, ecc...), formando quella che si definisce una "onda di risonanza" con il plasmon che si propaga lungo la superficie.

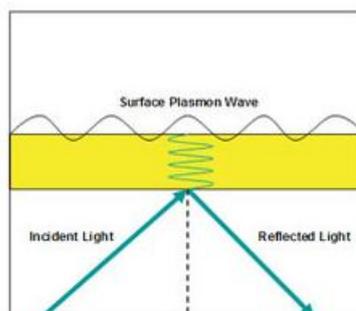


Figura 1.4: Schema fisico in condizioni di risonanza tra un dielettrico e un film d'oro.

Una considerazione molto importante è che nei processi di eccitazione ottica della superficie plasmonica, una porzione di energia dell'onda elettromagnetica è convertita in energia della superficie plasmonica e dissipata nel film metallico, con il risultato di una diminuzione dell'intensità dell'onda EM riflessa ed in aggiunta, un cambio di fase della medesima onda [10].

Capitolo 2

Tipi di misura

Per poter applicare il fenomeno fisico della risonanza plasmonica agli strumenti di misura quali i sensori, è necessario convertire l'intensità del segnale generato in risonanza in una grandezza misurabile in grado poi di essere elaborata. Esistono varie tecniche che rendono possibile questa conversione. Principalmente si eseguono misure di tipo ottico per esempio tramite la spettroscopia o elissometro oppure misure di tipo elettronico trasducendo il segnale ottico in un segnale elettrico grazie ad opportuni trasduttori.

2.1 Misure ottiche

Il metodo principale per misurare gli effetti prodotti dalla risonanza plasmonica è la spettroscopia la quale permette di capire e di interpretare le relazioni che intercorrono tra la lunghezza d'onda della risonanza e i substrati delle superfici utilizzate. Questi aspetti ricoprono un ruolo fondamentale al momento della progettazione del sensore. In figura 2.1 sono riportati i diversi approcci per la misura dello spettro della risonanza.

L'applicazione più lineare è la trasmissione di luce ultravioletta (figura 2.1(a)). In questa, si misura lo spettro di estinzione delle nanoparticelle misurandone la dipendenza dalla lunghezza d'onda della luce che passa attraverso il campione. Nel caso di campioni non trasparenti è opportuno usare una geometria riflettente (2.1(b)). In questa, viene usata una fibra ottica per guidare il fascio di luce al campione e anche per raccogliere la luce riflessa dalla superficie del campione stesso. In questa, quando il valore del rendimento della trasmissione della risonanza plasmonica è al massimo mentre il corrispondente valore nella curva di estinzione della luce riflessa è al minimo (perchè la luce assorbita dal campione in condizioni di risonanza non viene riflessa). La figura 2.1(c) mostra un'esempio di misura della dispersione della luce a campo oscuro. In questa, il campione viene colpito da una luce bianca e la dispersione di luce che ne consegue viene raccolta e analizzata. La figura 2.1(d) mostra invece l'eccitazione del campione tramite un laser e la luce di-

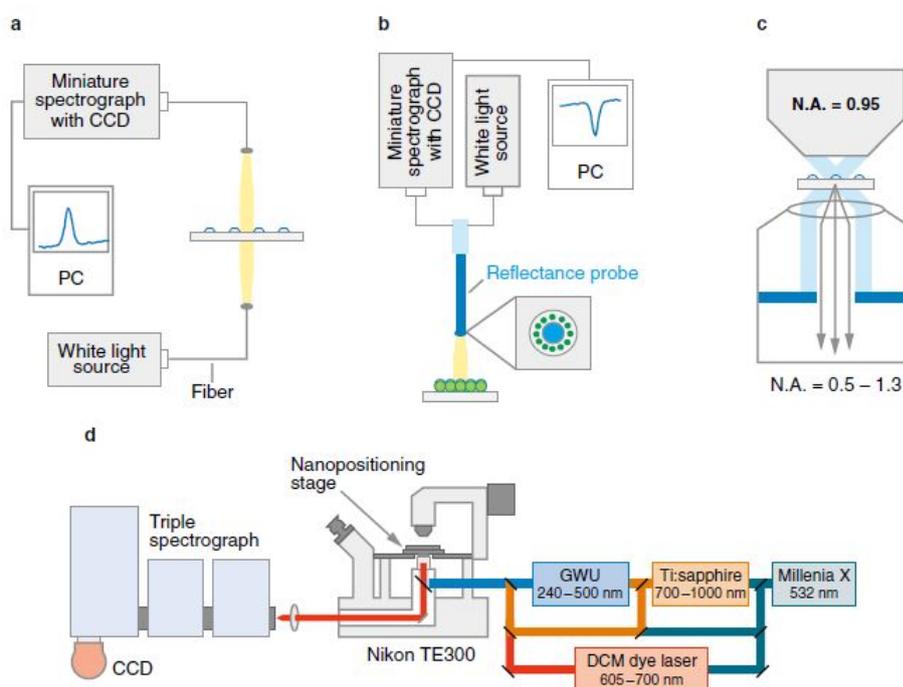


Figura 2.1: (a) Spettroscopia con luce ultravioletta. (b) Spettroscopia con geometria riflettente. (c) Spettroscopia a dark-field light-scattering. (d) Spettroscopia con l'utilizzo di un laser.

spersa viene raccolta e indirizzata ad uno spettrometro e quindi al rilevatore [3]. Un' altro tipo di misura ottica avviene tramite l'uso dell'ellissometro che è una tecnica specifica di rilevazione delle proprietà dielettriche di film sottili. Questa, valuta il cambio di polarizzazione sulla luce che viene riflessa dalla superficie contenente il campione. La variazione di polarizzazione è determinata dalle proprietà del campione. Tale tecnica è molto precisa nel estrapolare informazioni dalla fase e dalla polarizzazione del raggio riflesso, infatti può arrivare ad effettuare una misura con una sensibilità dell'ordine degli angstrom [9]. La misura tramite ellissometro avviene come rappresentato in figura 2.2.

In figura 2.2 si mostra che una radiazione elettromagnetica viene emessa da una sorgente ed è polarizzata linearmente. Questa passa attraverso ad un compensatore ed incide sulla superficie contenente la soluzione campione. La luce riflessa, passa attraverso un secondo compensatore e attraverso un'altro polarizzatore chiamato analizzatore e infine viene direzionata al rilevatore. I raggi di luce trasmessa e riflessa che colpiscono il piano d'incidenza si dividono in 2 componenti: il fascio polarizzato parallelamente al piano (p-polarizzato) con ampiezza r_s e il fascio polarizzato perpendicolarmente al piano (s-polarizzato) con ampiezza r_p . Questa tecnica misura il rapporto tra

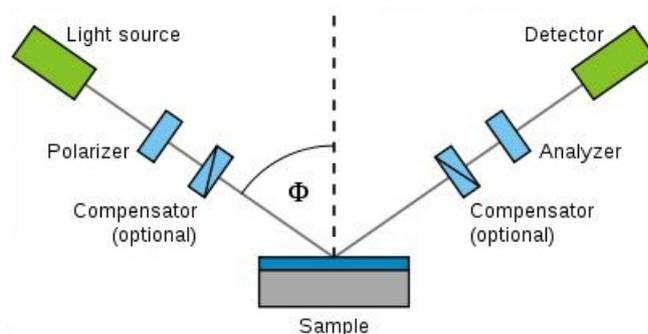


Figura 2.2: Misura con ellissometro

le due ampiezze dei due fasci di luce. L'ellissometro è una misura indiretta e in generale bisogna elaborare questa misura con modelli matematici che descrivono lo strato che si analizza.

In generale con le tecniche di misura ottica si vuole determinare il minimo d'intensità della luce riflessa, condizione che indica il massimo accoppiamento in risonanza. La posizione del punto di minimo dipende dalle caratteristiche del campione quindi la sua determinazione dà una chiara informazione sul campione stesso. Un esempio di misura acquisita tramite metodi ottici è rappresentato in figura 2.3 [1].

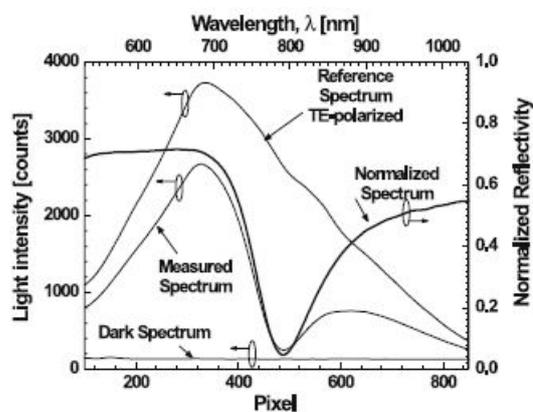


Figura 2.3: Esempio di spettro di misura tramite metodi ottici.

2.2 Misure elettriche

Per la conversione di segnali ottici in segnali elettrici il trasduttore principale usato nei sensori è il fotodiodo. Numerosi studi hanno dimostrato che i fotodiodi specialmente quelli a barriera Schottky risultano molti sensibi-

li e adatti alla trasduzione di segnali derivanti dai fenomeni di risonanza plasmonica. Infatti, ponendo come barriera del fotodiode la superficie di interfaccia tra il metallo e il dielettrico, ed eccitandola con un fascio di luce, la superficie plasmonica, in condizioni di risonanza, influisce notevolmente sul comportamento del fotodiode. Recenti studi sulle nanostrutture metalliche hanno permesso di applicare sui fotodiode a barriera Schottky (SB) dei nano-pattern ottici (grating) i quali inducono il diode ad interagire solo con determinate lunghezze d'onda. Lo studio del comportamento di questi diodi avviene variando un parametro della luce incidente (frequenza, intensità, fase, ecc ...) e misurandone la corrispondente fotocorrente. Questo metodo tuttavia presenta alcune limitazioni come, ad esempio, il fatto che l'intensità della luce intesa come numero di fotoni provenienti da un laser non può rimanere costante mentre la frequenza cambia e che l'efficienza quantica nella generazione della corrente cambia con il variare della frequenza. In alternativa si può usare una luce monocromatica ad una fissata intensità ottenendo così una corrente modulata dalle nanostrutture [8][7].

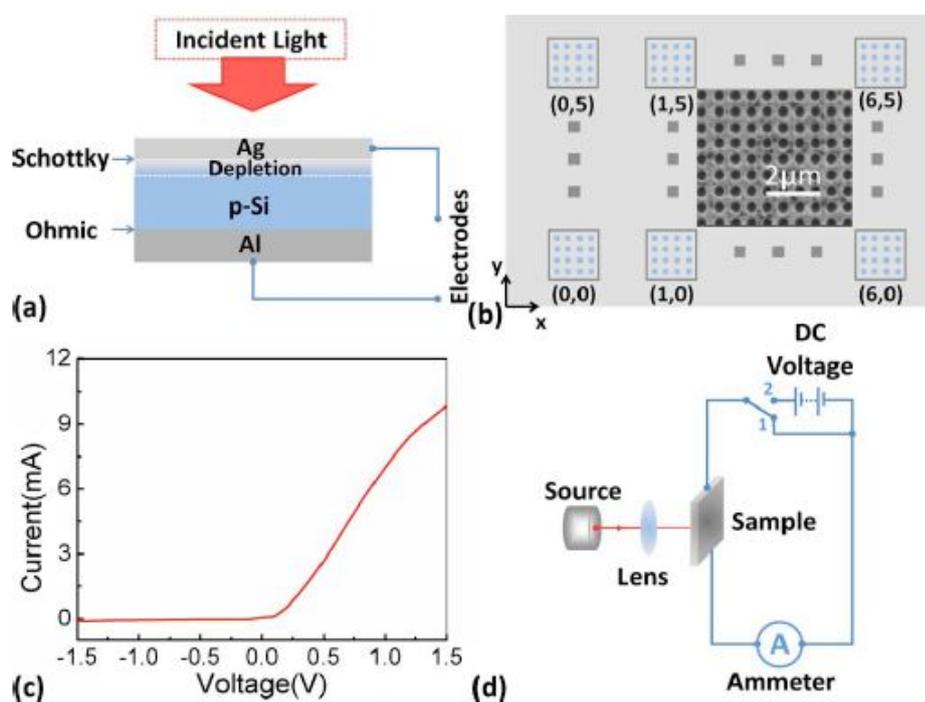


Figura 2.4: (a) Sezione del fotodiode a barriera Schottky formato da contatti di Ag e Si (b) Sezione trasversale del fotodiode (c) Grafico I-V (d) Schema di un esperimento di misura.

Nella figura 2.4(d) è riportato una schema esemplificativo di come avviene la trasduzione del segnale della SPR in una corrente. Si nota che nel circuito è

presente una sorgente di tensione costante. Normalmente escludendo questa, la fotocorrente generata risulta meno di $0.5\mu A$. L'introduzione della tensione continua permette invece di ottenere valori di corrente più apprezzabili come riportato in figura 2.5.

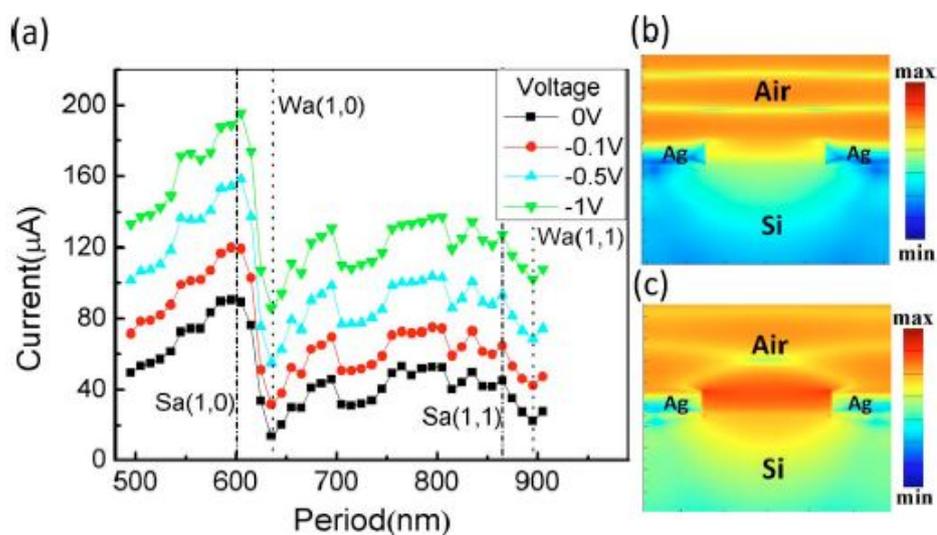


Figura 2.5: (a) Grafico corrente-periodo di grating per differenti valori di tensione applicata (b) e (c) distribuzioni di E_x in un singolo fotodiode con periodo di reticolo $635nm$ e $595nm$.

Capitolo 3

Sensori SPR

I sensori a tecnologia SPR sono dei dispositivi ottici. Quando la superficie plasmonica interposta tra il film metallico e il dielettrico viene eccitata, cambiando l'interfaccia tramite l'inserimento di un analita, l'indice di rifrazione varia e si provoca un cambio della costante di propagazione β_{SP} . Questo, a sua volta, modifica le condizioni di accoppiamento tra le onde di luce e la superficie stessa. Tali sensori risultano quindi molto sensibili a variazioni dell'indice di rifrazione. In base alla grandezza caratteristica della luce che interagisce con la superficie plasmonica e viene misurata, i sensori possono essere classificati come:

- Modulazione angolare
- Modulazione della lunghezza d'onda
- Modulazione della fase
- Modulazione d'intensità
- Modulazione della polarizzazione

Nei sensori che modulano l'angolo d'incidenza, una luce monocromatica eccita la superficie. La forza dell'accoppiamento che si viene a generare viene misurata a diversi angoli di incidenza della luce e la misurazione viene effettuata sull'angolo che produce l'accoppiamento maggiore e posto come valore di riferimento per il sensore. Nei sensori che invece modulano la lunghezza d'onda, la superficie viene eccitata da una luce collimata (contenente quindi più lunghezze d'onda) mantenendo l'angolo d'incidenza costante. In questo caso verrà misurata la lunghezza λ che genera l'accoppiamento più forte. Una possibile misura con queste due particolari configurazioni di sensori è riportata in figura 3.1.

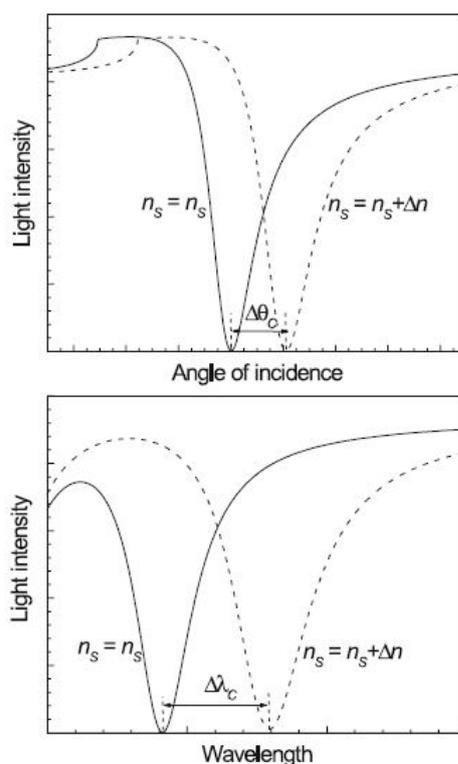


Figura 3.1: La figura in alto mostra come l'intensità della luce che interagisce con la superficie plasmonica è funzione dell'angolo d'incidenza e la figura in basso rappresenta l'andamento dell'intensità della luce per due differenti lunghezze d'onda.

I sensori che modulano il cambio d'intensità si basano su una misura della forza dell'accoppiamento tra la luce incidente e la superficie mantenendo angolo d'incidenza e lunghezza d'onda costanti. L'altra classe di sensori che si basa sul cambiamento di fase modula le variazioni di fase della luce che interagisce con la superficie per trovare il migliore accoppiamento mentre l'ultima configurazione cambia il grado di polarizzazione della luce e valuta quale produce l'accoppiamento maggiore [1].

3.1 Configurazioni ottiche

La superficie plasmonica interposta tra il film metallico e un dielettrico viene "eccitata" tramite i meccanismi d'accoppiamento menzionati nel precedente capitolo. In base a questi, si definiscono 3 classi di sensori. Tratteremo qui di seguito ognuna di queste configurazioni descrivendone pregi e difetti e ne riporteremo il principio base di funzionamento.

3.1.1 Configurazione a prisma

La maggior parte dei sensori a tecnologia SPR oggi in commercio sono basati sul dispositivo di accoppiamento a prisma. Questo sistema, combina la luce con la superficie plasmonica tramite un semplice e convenzionale dispositivo ottico. Inoltre questo stesso meccanismo, permette al sensore di essere adattato ad ogni tipo di modulazione [1]. Trattiamo ora qui di seguito alcuni esempi di questa tecnologia.

Sensori a modulazione angolare

Una prima e semplice configurazione di questo sensore fù introdotta da Matsubara nel 1988. La figura 3.2 mostra il semplice dispositivo ottico usato.

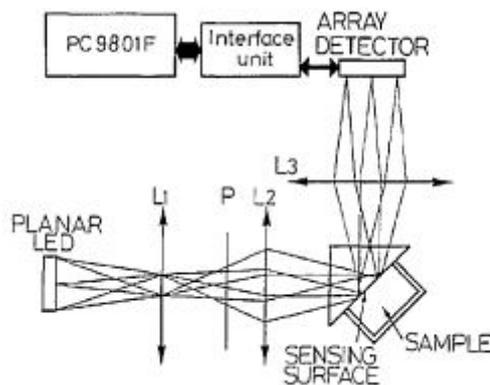


Figura 3.2: Schema del sensore SPR ad angular modulation. Le lenti L_1 e L_2 forniscono un intervallo angolare della luce incidente mentre la lente L_3 proietta lo spettro nel piano focale del detector.

É dimostrato che l'utilizzo delle lenti e del detector a fotodiodi nel piano focale posteriore alle lenti rende possibile ricostruire l'intero spettro angolare della luce riflessa. Questo design inoltre, permette di usare LED economici come sorgenti di luce trascurando il degradamento della risoluzione. Una configurazione più innovativa venne presentata da Zhang il quale ideò una semplice ed efficace architettura per sensori a SPR. Un raggio laser polarizzato ($\lambda = 635\text{nm}$) viene focalizzato e direzionato tramite lenti verso il film metallico. Quattro celle a fotodiodo vengono posizionate in modo che una coppia venga colpita dal laser incidente e l'altra dal raggio riflesso. Questo permette di approssimare tramite le quattro intensità misurate la posizione angolare con l'intensità del raggio. L'utilizzo delle celle a fotodiodo permettono una misura molto robusta al rumore e inoltre considerando le cellule di ogni coppia uguali, queste operano una compensazione intrinseca al rumore comune associato alle fluttuazioni del laser. Molte altre configurazioni

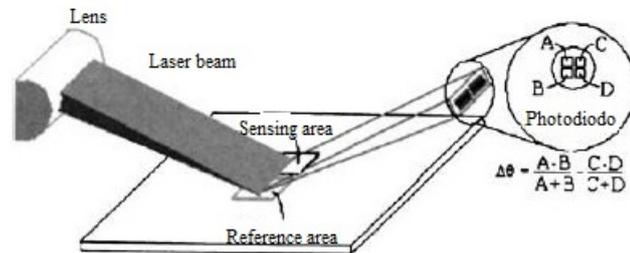


Figura 3.3: Sensore SPR differenziale

sono state proposte (Melendez, Kano, Chinowsky, ecc...) e tutte, come quelle sopra citate permettono di fornire una misura robusta al rumore pur utilizzando architetture più o meno complicate.

Sensori a modulazione della lunghezza d'onda

Una configurazione basata sulla modulazione della lunghezza d'onda per un sensore SPR è stata sviluppata da Homola. Il sensore consiste in una lampada alogena, la piattaforma del sensore ed un spettrometro. La luce bianca generata dalla lampada viene condotta sulla superficie sensibile grazie ad una fibra ottica. La piattaforma è costituita da un collimatore di input, un prisma di vetro, un polarizzatore e un collimatore di output il quale combina la luce sulle fibre ottiche che saranno analizzate dallo spettrometro.

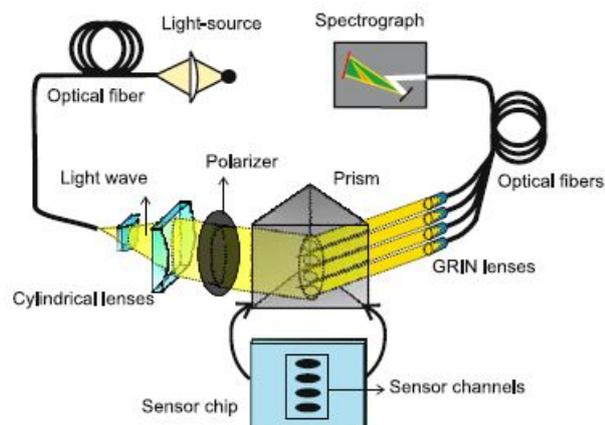


Figura 3.4: Sensore in configurazione 4-canali.

3.1.2 Configurazione con reticolo

Questi dispositivi, sebbene siano usati in modo meno esteso rispetto a quelli basati sull'accoppiamento prismatico, offrono una caratteristica di rilievo per l'industrializzazione: possono essere fabbricati con tecniche di replicazione su materiali polimerici permettendo quindi di ottenere un prodotto low-cost [1].

La prima configurazione che riportiamo a modulazione angolare è dotata di un elevato numero di canali sensibili ed è adatta per le applicazioni di screening. In questa configurazione un raggio di luce monocromatica viene concentrato grazie ad una lente, su di un reticolo rivestito d'oro e riflesso sotto la luce incidente normale.

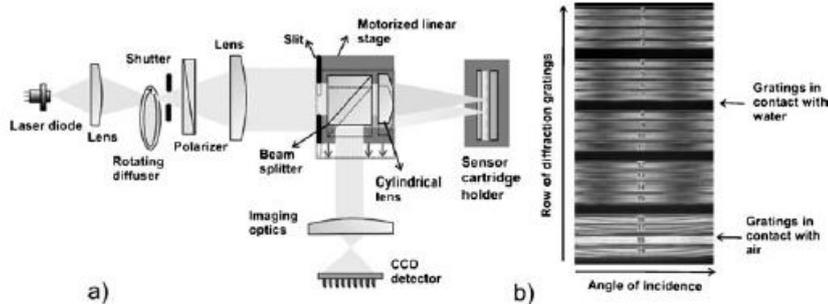


Figura 3.5: Configurazione di un sensore basato sull'accoppiamento con reticolo per le applicazioni di screening(a), tipica immagine dello spettro(b)

Gli spettri angolari vengono riportati ad un fascio collimato per mezzo di una lente di messa a fuoco e proiettati su un rivelatore CCD 2D. Le differenti righe di spettro sono lette sequenzialmente tramite il movimento dello splitter (prisma di nichol) e la lente cilindrica rispetto il chip sensore. Grazie all'incidenza normale e alla simmetria della struttura, si possono osservare due punti, uno di minimo e uno di massimo, per ogni spettro a seconda della misura.

Una configurazione che supporta la modulazione della lunghezza d'onda è stata proposta da Jori. Un raggio collimato di luce policromatica viene fatto incidere sulla superficie del grating. Il fascio riflesso viene raccolto e direzionato verso un analizzatore di spettro. Per migliorare l'accuratezza della misurazione si combina la modulazione della lunghezza d'onda con un filtro sintonizzabile (AOTF) come viene mostrato in figura 3.6.

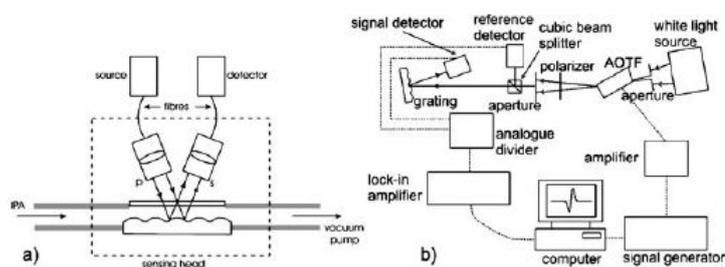


Figura 3.6: Sensore SPR basato su accoppiamento con reticolo(a), configurazione migliorata(b).

Il filtro viene usato per modulare la lunghezza d'onda in banda stretta della luce incidente in condizioni di risonanza. La differenza nel profilo di riflessione, correlata con la lunghezza d'onda della luce incidente viene registrata dal detector. Considerando il differenziale zero che corrisponde al minimo di riflettività SPR, si determina la frequenza base grazie alle quale l'analizzatore riesce ad misurare la minima distanza con un'accuratezza di circa $0.0005nm$. In pratica nei sensori SPR a spettroscopia, un luce (LED) viene variata di un determinato angolo e centrata sul chip così da cambiare l'angolo d'incidenza. La luce riflessa dalla superficie del chip stesso viene analizzata usando una camera CCD che cattura in ordine sequenziale le immagini ai vari angoli sollecitati e ne viene misurato l'accoppiamento.

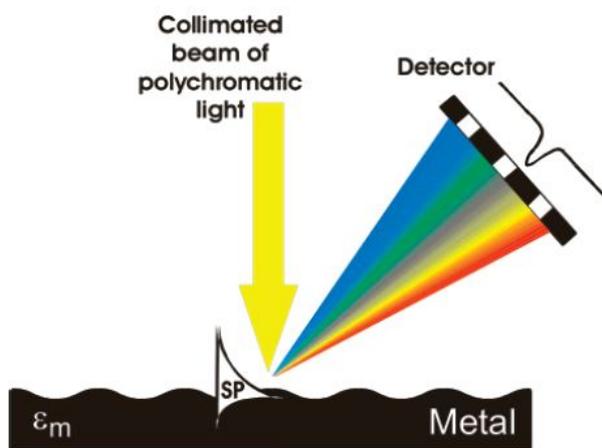


Figura 3.7: Concetto base de funzionamento dei sensori SPR basati sul accoppiamento con reticolo.

3.1.3 Configurazione a guide d'onda

Negli ultimi 15 anni la tecnologia dei sensori SPR basati sulle fibre ottiche o su circuiti integrati a guide d'onda si è sviluppata notevolmente. Le con-

figurazioni note di questi strumenti modulano sia la lunghezza d'onda che l'intensità e offrono un elemento sensoriale compatto e miniaturizzato capace così di accedere a punti di difficile accesso (hard-to-access). La prima configurazione che verrà analizzata è basata sulle fibre ottiche ed è stata proposta da Jorgensen e Lee. Il sensore consiste in una fibra ottica con il nucleo localmente esposto e un film d'oro attorno ad esso. Uno specchio posto alla fine dell'area sensibile riflette indietro la luce nella fibra generando così un accoppiamento ottico che permette la separazione della luce riflessa da quella illuminante. Un'altra configurazione molto simile, usa una luce monocromatica in modo da eccitare selettivamente le fibre con un ristretto range angolare di luce incidente e viene rilevato il cambio d'intensità della luce trasmessa. Il maggiore svantaggio che presentano questi strumenti è la scarsa capacità di compensare le perturbazioni introdotte dalla struttura fisica della fibra ottica (modi, polarizzazione, banda) e la limitata stabilità del sensore d'uscita. Per riuscire a limitare queste problematiche si sono sviluppati i sensori a singola fibra ottica di cui si riporta in figura 3.7 uno schema [1].

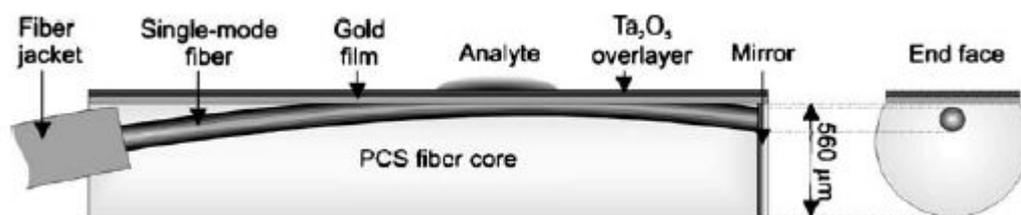


Figura 3.8: Sonda di un sensore SPR a singola fibra ottica

Ad ogni modo, questi sensori soffrono d'instabilità per quanto riguarda la polarizzazione. Per cercare di eliminare questa sorgente di instabilità negli ultimi anni si è introdotto l'uso di particolari fibre ottiche che mantengono la polarizzazione grazie alle quali si riscontra un sensibile miglioramento delle prestazioni del sensore. Un miglioramento delle performance si può riscontrare nei sensori ottici integrati. In questi, il segnale proveniente dal canale di misurazione viene normalizzato a un segnale di riferimento in modo tale da aumentare la stabilità. Una configurazione di un sensore che modula la lunghezza d'onda è riportato in figura 3.9.

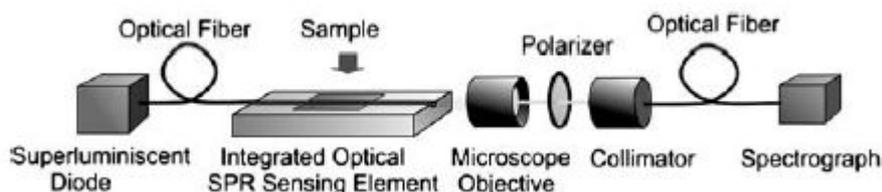


Figura 3.9: Sensore SPR a ottica integrata che modula la lunghezza d'onda

Il range di azione di un sensore integrato è determinato dall'indice di rifrazione del materiale usato per creare la risonanza. Questo porta alla fabbricazione di vetri con basso indice di rifrazione, buffer layer, overlayer con alti indici di rifrazione e strutture più complesse a multi-layer. Comunque lo sviluppo di queste tecnologie che introducono strati (layer) aggiuntivi, rendono meno sensibile il sensore in quanto si viene a diminuire la concentrazione di campo elettromagnetico nel campione e quindi si viene a generare una risonanza sempre più debole determinando misure meno precise.

3.2 Parametri caratteristici

Ogni volta che si effettua una misurazione con un sensore questo fa una predizione attraverso una funzione di trasferimento F tale che l'output risulti $Y = F(X)$. Questa funzione è determinata grazie ad un modello teorico e dalla calibrazione del sensore. Usualmente, la misura effettuata differisce dal valore reale:

$$X_{measured} = X_{real} + err$$

Ci sono varie sorgenti di errore presenti in un sistema fisico. Gli errori casuali sono variazioni statistiche della misurazione e non possono essere eliminate perché intrinseche del sistema. Gli errori sistematici invece, sono riprodotti in ogni misurazione e dipendono sia dall'errata calibrazione sia dall'accuratezza e dalla stabilità del esperimento [1]. Le principali caratteristiche che descrivono le performance di un sensore SPR sono sensibilità, linearità, risoluzione, accuratezza, riproducibilità, range dinamico, limite di rilevabilità, limiti di quantificazione.

La **sensibilità** di un sensore è descritta come il rapporto tra una variazione in uscita e la corrispondente variazione d'ingresso:

$$S = \frac{\partial Y}{\partial X}$$

Nel caso dei biosensori la sensibilità viene indicata come il rapporto tra una variazione d'uscita e una variazione di concentrazione.

La **linearità** viene definita usualmente come la massima deviazione della

funzione di trasferimento lineare su uno specifico range dinamico. In generale i sensori che presentano una funzione di trasferimento lineare sono preferiti rispetto a quelli non lineari in quanto richiedono meno punti di calibrazione per produrre una misura accurata. Nei casi pratici pochi sensori presentano questo tipo di funzione di trasferimento.

La **risoluzione** indica il più piccolo cambiamento all'ingresso che genera una cambiamento rilevabile all'uscita del sensore.

L'**accuratezza** di un sensore descrive la vicinanza tra misura in uscita e misura reale. Questa generalmente si esprime grazie al rapporto tra errore e output.

La **riproducibilità** è la capacità del sensore a riprodurre la stessa uscita in presenza del medesimo ingresso nelle stesse condizioni di operazione.

Il **range dinamico** rappresenta lo spazio dei valori che possono essere misurati dal sensore. Nei sensori a SPR che si basano sulla misura dell'indice di rifrazione, il range dinamico descrive un range di valori dell'indice di rifrazione del campione che può essere misurato con una specifica accuratezza.

Il **limite di rilevabilità (LOD)** è stato definito dall'*International Union of Pure and Applied Chemistry* e rappresenta la concentrazione di un analita c_l derivante dalla più piccola misura Y_{LOD} che può essere fatta. Il valore di Y_{LOD} è dato dall'equazione: $Y_{LOD} = Y_{blank} + m\sigma_{blank}$, dove Y_{blank} è la media delle misurazione senza analiti, σ_{blank} è la deviazione standard delle misurazioni a vuoto e m è un fattore numerico. Siccome $c_{blank} = 0$ LOD della concentrazione può essere espresso come $c_{LOD} = \frac{1}{S_c(c=0)}m\sigma_{blank}$, dove S_c indica la sensibilità del sensore all'analita.

Il **limite di quantizzazione (LOQ)** è generalmente la concentrazione dell'analita accettato per una concentrazione con deviazione standard di 10 volte maggiore, quindi il LOQ si può esprimere come $c_{LOQ} = \frac{10}{S_c(c=0)}\sigma_{blank}$

3.2.1 Sensibilità

La sensibilità di un sensore è il rapporto tra una variazione dell'uscita e la corrispondente variazione della grandezza da misurare, come ad esempio un analita. La sensibilità di un sensore SPR dipende essenzialmente da due fattori i quali sono la sensibilità del sensore di output rispetto al cambio di indice di rifrazione e l'efficienza della conversione del cambio di indice. La sensibilità di un sensore SPR all'indice di rifrazione può essere espressa come

prodotto di due termini

$$S_{RI} = \frac{\delta Y}{\delta n_{ef}} \frac{\delta n_{ef}}{\delta n_d} \quad (3.1)$$

dove Y indica l'uscita del sensore, n_{ef} indica l'indice effettivo della superficie plasmonica e n_d indica l'indice di rifrazione. Il primo termine rappresenta proprio la sensibilità dell'uscita all'indice effettivo della superficie ed il secondo, descrive la sensibilità dell'indice effettivo al cambio dell'indice di rifrazione ed è indipendente dal metodo di modulazione e di eccitazione. In generale la sensibilità dell'indice effettivo rispetto all'indice di rifrazione dipende dalla distribuzione della variazione dell'indice effettivo. Homola e Piliarik, usando la teoria della perturbazione, hanno calcolato tale sensibilità per due condizioni limite: (i) il cambio dell'indice di rifrazione che avviene all'interno dell'intero campione (ii) il cambio dell'indice di rifrazione che avviene solo all'interno ma ad una distanza molto piccola della superficie del sensore. Essi hanno dimostrato che la sensibilità dell'indice effettivo della superficie plasmonica può essere espressa come

$$\left(\frac{\delta n_{ef}}{\delta n_d}\right)_B = \frac{n_{ef}^3}{n_d^3} > 1 \quad (3.2)$$

La sensibilità dell'indice effettivo della superficie plasmonica rispetto al cambiamento dell'indice di rifrazione della superficie all'interno di uno strato di spessore h può essere espressa come

$$\left(\frac{\delta n_{ef}}{\delta n_d}\right)_S = 2\left(\frac{\delta n_{ef}}{\delta n_d}\right)_B \frac{h}{L_{pd}} \quad (3.3)$$

assumendo $h \ll L_{pd} = 1/Re\{\alpha_d\}$ e $|\varepsilon'_m| \gg \varepsilon''_m$. Questo suggerisce che la sensibilità all'indice di rifrazione è proporzionale alla sensibilità all'indice di rifrazione di bulk e al rapporto dello spessore dello strato all'interno del quale si verifica la variazione di indice e la profondità di penetrazione del plasmone di superficie L_{pd} [2].

3.2.2 Risoluzione

La risoluzione di un sensore SPR è definita come il più piccolo cambiamento dell'indice di rifrazione che produce un cambiamento rilevabile in uscita. L'intensità della variazione all'output dipende sia dall'incertezza dello strumento, sia dal rumore presente. Nei sensori ci sono varie sorgenti di rumore ma quelle dominanti sono associate alla fluttuazione dell'intensità della luce emessa dalla sorgente, alle proprietà statistiche della luce (shot noise) ed al rumore dovuto alla conversione dell'intensità di luce in altri segnali misurabili (elettronici). La risoluzione di un sensore SPR, r_{RI} , è tipicamente espressa in termini di deviazione standard del rumore all'uscita, σ_{so} . Mettendo in relazione la deviazione del rumore all'uscita con l'indice medio di rifrazione del

bulk si può dire che $r_{RI} = \sigma_{so}/S_{RI}$ dove S_{RI} è la sensibilità dell'indice di rifrazione del bulk. I sensori SPR che implementano un qualsiasi approccio di modulazione necessitano di misurare l'intensità dell'onda accoppiata con la superficie plasmonica per determinare l'uscita del sensore. Per ridurre gli effetti negativi del rumore in genere viene calcolata una media di tutte le intensità di luce misurate. Questo permette di ridurre il rumore presente di un fattore \sqrt{M} , dove M indica il numero delle misurazioni fatte. Il rumore dell'intensità della luce viene trasmesso al rumore in uscita del sensore attraverso l'algoritmo utilizzato per generare l'output del sensore. Piliarik e Homola hanno studiato la propagazione del rumore processando il segnale in ingresso con il metodo del centro e hanno dimostrato che la varianza del rumore può essere espressa come

$$\sigma_{SO} = K \frac{\sigma_{th}}{d} \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{w}{S_{RI}} \quad (3.4)$$

dove N è il numero di misurazioni, σ_{th} è l'intensità totale del rumore alla tensione di soglia, w indica la profondità al valore di soglia, d è la differenza dei valori della risonanza al punto di minimo e alla tensione di soglia e K è un fattore che dipende dai contributi relativi delle differenti sorgenti di rumore. Come segue dall'eq. 3.4, il rumore all'uscita è per la maggior parte dovuto al rapporto tra il rumore presente alla tensione di soglia e la profondità del punto a tale valore. Il rapporto w/S_{RI} dipende solamente dalla scelta della modulazione e dal tipo di accoppiamento quindi non da un grosso contributo alla risoluzione. L'eq. 3.4 spiega anche perchè i sensori a spettroscopia SPR presentano una risoluzione migliore rispetto gli altri (modulazione d'intensità, ecc...) in quanto nella spettroscopia i valori delle intensità misurate è circa di ordine 100 e questo grazie al metodo del centro che migliora la risoluzione. Un'altra importante conclusione è che nei sensori che modulano l'intensità si ha che σ_{RI} è proporzionale a σ_{th}/I , quindi il rumore diminuisce con l'aumentare dell'intensità della luce misurata [2].

3.2.3 Limite di rilevabilità

Il limite di rilevabilità (LOD) è di solito definito come la concentrazione di un analita che produce all'uscita una variazione uguale a 3 volte la deviazione standard di una misurazione effettuata con un campione in condizione fresh, ossia in assenza di analita. LOD può essere valutato solo quando i parametri dell'iterazione tra analita, rioscitore e trasporto di massa sulla superficie del sensore sono noti. Comunque, indipendentemente da questi fattori, possiamo determinare la minima concentrazione rilevabile dal sensore la quale produce una variazione all'uscita

$$\sigma_{\Gamma} = \frac{\sigma_{so}h}{S_h(\frac{\partial n}{\partial c})_{vol}} \quad (3.5)$$

dove $(\frac{\partial n}{\partial c})_{vol}$ indica la variazione dell'indice di rifrazione volumetrico al variare della concentrazione, S_h indica la sensibilità dell'indice di rifrazione del sensore d'uscita al cambio di indice all'interno di uno strato sottile di spessore h . Se siamo nelle stesse condizioni dello sviluppo dell'eq. 3.4 possiamo scrivere che

$$\sigma_{\Gamma} = \sigma_{RI} \frac{L_{pd}}{2(\frac{\partial n}{\partial c})_{vol}} \quad (3.6)$$

dove L_{pd} indica la profondità di penetrazione del plasmone di superficie [2].

Capitolo 4

Biosensori per affinità

I biosensori a tecnologia SPR sono dei dispositivi nei quali vengono incorporati degli elementi di bioriconoscimento (biorecognition elements) i quali, sono in grado di riconoscere e di interagire con un specifico analita. Gli elementi di riconoscimento, vengono immobilizzati sulla superficie del film metallico a stretto contatto con la superficie plasmonica.

Quando una soluzione campione, contenente un determinato analita, viene fatta interagire con il sensore, le molecole dell'analita cominciano a legarsi agli elementi di riconoscimento determinando così una variazione dell'indice di rifrazione della superficie di misura del sensore. Questo a sua volta da luogo ad una variazione della costante di propagazione della superficie plasmonica come riportato in figura 4.1.

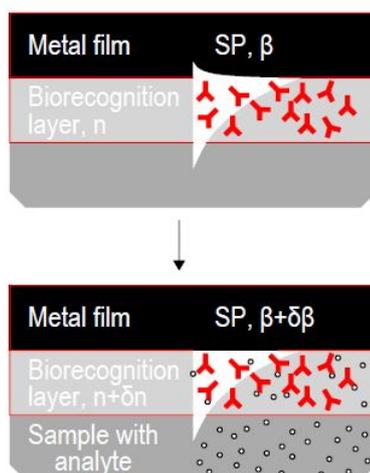


Figura 4.1: Principio della risonanza plasmonica di superficie nei biosensori per affinità.

La variazione può essere determinata misurando una delle caratteristiche

della luce che interagisce con la superficie. Nel dettaglio, la variazione dell'indice di rifrazione indotta dalle molecole dell'analita dipende dall'aumento dell'indice volumetrico di rifrazione che può essere espresso come:

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc}\right)_{vol} \Delta c_b \quad (4.1)$$

dove Δc_b è la concentrazione dell'analita espressa come massa/volume [1]. Il valore della variazione dell'indice di rifrazione dipende dalla struttura chimica dell'analita. La scelta di un appropriato elemento di riconoscimento e la sua immobilizzazione ha un'importanza fondamentale sulle caratteristiche del sensore quali sensibilità, specificità e limite di rilevabilità. L'uso crescente della SPR nell'ambito tecnico scientifico ha portato diversi miglioramenti negli strumenti e ne ha espanso il loro campo di applicazione.

4.1 Funzionalizzazione della superficie

Lo sviluppo di biosensori a tecnologia SPR ha fatto emergere la necessità di ottenere diverse tecniche di immobilizzazione per i differenti tipi di elementi di riconoscimento. Questi come vedremo in seguito variano dalle proteine ai filamenti di DNA. Questi elementi, vengono posti sulla superficie del sensore e immobilizzati. Il processo di funzionalizzazione deve fare in modo di immobilizzare sulla superficie un numero sufficiente di elementi di bioriconoscimento e di minimizzare il numero di legami non specifici. Inoltre, gli elementi devono essere fissati lasciando inalterata la loro attività biologica. Di seguito verranno descritte le più importanti tecniche utilizzate per la funzionalizzazione della superficie alcune delle quali sono riportate in figura 4.2 [1].

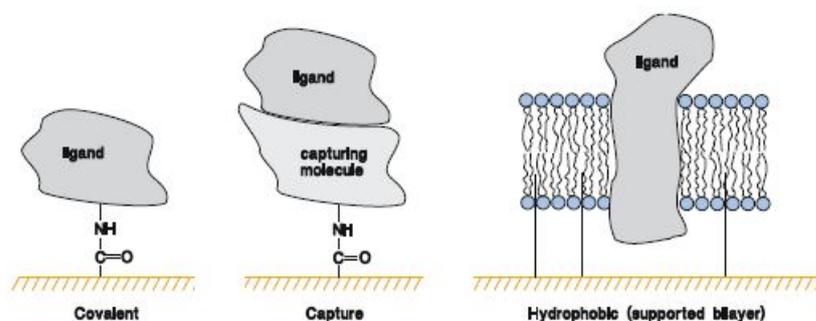


Figura 4.2: Diversi approcci per l'immobilizzazione alla superficie.

4.1.1 Rivestimento della superficie con uno strato autoassemblante (SAM)

L'approccio più semplice e più utilizzato per la cattura degli analiti consiste nel creare uno strato al di sopra della superficie metallica (oro o argento) e sfruttare la sua capacità di assorbimento spontaneo delle proteine e di altre molecole. Questo serve a minimizzare l'assorbimento di molecole non specifiche come invece accade con l'introduzione dei gruppi reattivi nelle specifiche immobilizzazioni. Il metodo più utilizzato è basato sulla creazione di uno strato autoassemblante formato da molecole di tiolo o di disolfuro. Questo, è uno strato organizzato di molecole in cui una delle estremità della molecola, il "gruppo di testa", mostra una speciale affinità per un substrato. I SAM sono costituiti anche da una coda a cui può essere legato un gruppo funzionale nella parte finale. La formazione di questo strato è essenzialmente dovuta alle interazioni delle molecole di disolfuro con la superficie tramite le forze di Wan der Waals. Nella pratica si va a depositare o si immerge la superficie in una soluzione contenete le molecole da immobilizzare (es. tioli) e si lascia agire per un determinato tempo. Queste, per le interazioni citate, creano uno strato di rivestimento sopra l'intera superficie. Grazie a questo procedimento si riesce a generare una struttura densa e molto stabile e inoltre orientata, con buona approssimazione, lungo la normale della superficie. Una rappresentazione di questa struttura è riportata in figura 4.3.

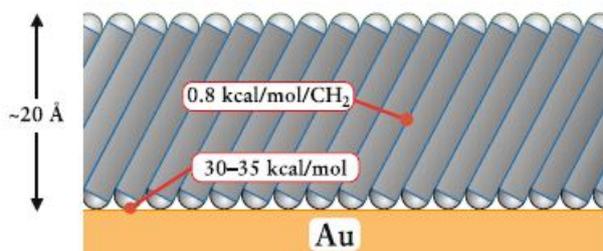


Figura 4.3: Rappresentazione della struttura a strato autoassemblato (SAM) su una superficie d'oro.

La possibilità di interazione di differenti gruppi funzionali con i tioli permette di applicare questa tecnica per ottenere proprietà di superficie specifiche. Per esempio nelle prime applicazioni, venivano usati degli idrossili così da conferire alla superficie un elevato carattere idrofobico e permetteva l'immobilizzazione delle molecole sia direttamente sia tramite opportuni legami.

4.1.2 Immobilizzazione tramite legami covalenti

Questa tecnica suggerisce di introdurre diversi gruppi funzionali sulla superficie per facilitare un'immobilizzazione controllata. La possibilità di avere

differenti gruppi sulla superficie sta alla base del meccanismo generale di attrazione per gli analiti sulla stessa superficie. In figura 4.4 viene mostrato come il gruppo dei carbossilici può essere fatto reagire con gruppi amminici o convertito per essere usato nell'accoppiamento chimico con altri reagenti.

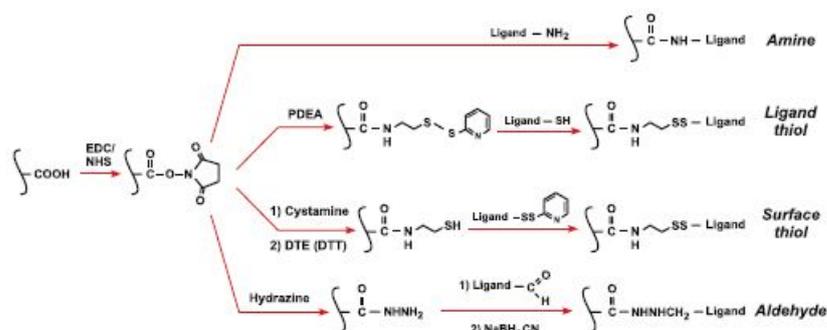


Figura 4.4: Alcune sequenze di reazione del gruppo dei carbossilici nei legami d'immobilizzazione con differenti reagenti.

L'approccio più utilizzato e versatile interessa l'accoppiamento tra i nucleotidi e il gruppo dei carbossilici. In genere vengono utilizzati i gruppi degli aminoacidi ed in particolare la lisina. Per facilitare le reazioni dei reagenti vengono introdotti sulla superficie delle sostanze specifiche che nello specifico della lisina sono EDC e NHS. La reazione avviene secondo la sequenza mostrata in figura 4.5. Di questa specifica modalità d'immobilizzazione ne

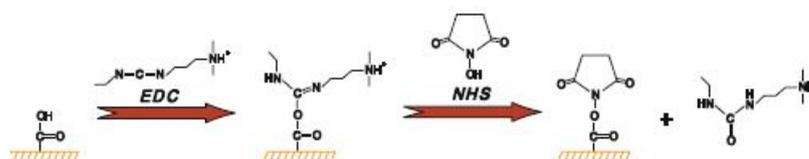


Figura 4.5: Sequenza di attivazione del gruppo dei carbossilici tramite EDC/NHS.

esistono diverse varianti alcune delle quali sono l'accoppiamento con gruppi tiolo o l'accoppiamento con gruppi aldeidici ma tutte si basano sullo stesso principio di funzionamento.

4.1.3 Immobilizzazione tramite cattura

Le tecniche di accoppiamento tramite legami covalenti presentano delle limitazioni. Ad esempio, le molecole possono essere instabili durante l'accoppiamento o l'attività dei siti di legame può risultare a volte poco efficiente. Tutte queste problematiche vengono amplificate se le molecole interessate sono di piccole dimensioni. L'immobilizzazione tramite cattura può risultare

quindi migliore. Questa, si basa sulla forte intensità di legame generata da specifici agenti di cattura (TAG) posti sulla superficie del sensore. Un vantaggio di questa tecnica è la possibilità di rimuovere questi tag dalla superficie dopo l'analisi mentre lo svantaggio principale introdotto è il notevole consumo del campione. I TAG più usati sono degli anticorpi specifici indirizzati verso le proteine ricombinate, oppure possono essere degli anticorpi composti da molecole organiche. Recentemente si è descritto un nuovo approccio che interessa le interazioni peptide-peptide. Un caso particolare di cattura riguarda i legami affini avidina-biotina. Questa particolare configurazione è molto usata e risulta molto adatta per i sensori SPR.

4.1.4 Accoppiamento tramite strato di lipidi

L'interesse della rilevazione delle proteine che interagiscono con i lipidi è in costante aumento specialmente nelle applicazioni riguardanti la rilevazione di droghe. Questo approccio è basato sull'assorbimento delle vescicole lipidiche o dei liposomi. Questi, a contatto con una struttura planare come la superficie del sensore tendono a dispiegarsi per creare una struttura dove la parte idrofobica delle molecole è orientata perpendicolarmente verso la superficie. In questa situazione i gruppi di lipidi principali orientati verso la soluzione acquosa riescono ad interagire con gli analiti bersaglio. Tale struttura è sufficientemente stabile per la rilevazione tramite SPR ma è facilmente degradabile in presenza di specifici detergenti. Inoltre le impurità che possono essere assorbite dalla struttura possono alterare la rilevazione. Uno sviluppo di questo metodo è l'utilizzo di un doppio strato di lipidi come viene mostrato in figura 4.6.

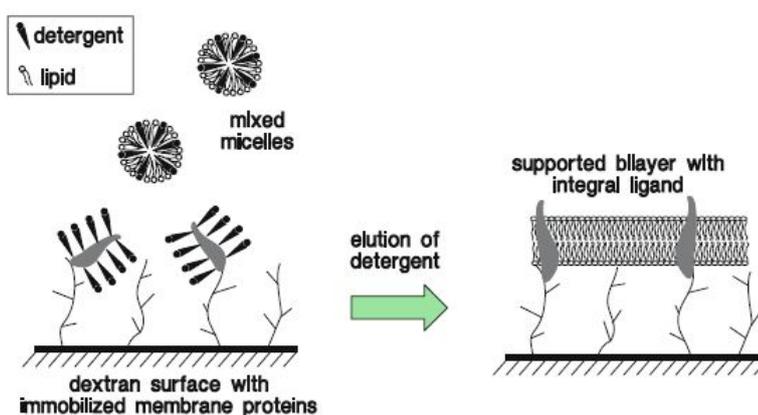


Figura 4.6: Membrana d'immobilizzazione a doppio strato di lipidi.

4.2 Elementi di funzionalizzazione

Come visto nella precedente sezione, esistono numerosi tipi di strutture molecolari create specificatamente per ottenere un accoppiamento ottimale con le diverse tecniche di immobilizzazione [1].

4.2.1 Proteine

Le proteine sono gli elementi più utilizzati nei biosensori SPR, tuttavia esiste una grande varietà di queste strutture e purtroppo non sono tutte riconducibili ad una strategia di immobilizzazione comune. Il comune denominatore sono i polipeptidi dove il singolo amminoacido fornisce i tratti funzionali della struttura che possono essere utilizzati per l'immobilizzazione sulla superficie del sensore. Gli amminoacidi più usati, assieme ai loro gruppi funzionali sono ad esempio: lisina ($-NH_2$), cisteina ($-SH$), serina e tirosina ($-OH$). Gli N terminali restanti formano un sito di legame con il loro corrispettivo gruppo amminico. Gli anticorpi sono la classe di proteine più omogenea ed è la più utilizzata come elementi di bioriconoscimento per diversi tipi di applicazioni. Le proprietà di legame sono importanti nella selezione dello specifico anticorpo. Questi inoltre risultano le molecole più semplici da immobilizzare. In media un anticorpo contiene 50 – 70 terminali di lisina e quando si utilizza l'accoppiamento covalente con gli elettrofilamenti della superficie la probabilità di legame con la regione che media l'interazione dell'anticorpo con il suo complemento (regione F_c) è molto alta. Ci sono anche delle tecniche alternative di immobilizzazione per gli anticorpi ma di norma questi non creano nessun problema nello stabilire un legame.

4.2.2 Peptidi

I peptidi risultano molto simili alle proteine e quindi il loro utilizzo trova un grande riscontro applicativo. In base alla composizione del peptide e alle sue caratteristiche, questo viene trattato come una proteina. Viene utilizzato l'accoppiamento tramite gli amminoacidi ma, sebbene questo risulti un procedimento più lineare, l'immobilizzazione dei peptidi più piccoli richiede un'altra strategia. In questi casi per esempio si può introdurre della lisina nella regione del peptide che non è interessata nell'interazione. Un'altra soluzione può essere di biotinilare ossia di legare una molecola di biotina al peptide in una posizione specifica, eventualmente seguita da una purificazione cromatografica.

4.2.3 Oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi sono composti da un gruppo di nucleotidi con carica negativa e sono relativamente resistenti ai legami di tipo covalente. Sebbene

i gruppi fosfati possano essere usati nelle reazioni di condensazione con nucleofilanti e i gruppi amminici principali, la reazione si presenta lenta e l'effetto dell'idrolisi dell'acqua contrasta il processo della reazione. Inoltre i legami basati sui nucleotidi si presentano deboli e non possono essere utilizzati in condizioni normali di accoppiamento. In alternativa, il metodo più comune per la loro immobilizzazione si basa sull'utilizzo di derivati biotinilati. Questi, sono sintetizzati grazie a dei reagenti standard per la sintesi degli oligonucleotidi e la loro immobilizzazione su una superficie modificata con l'avidina deve essere effettuata attraverso un buffer neutro.

4.2.4 Piccole molecole organiche

Sebbene la maggior parte delle applicazioni è dominata dall'utilizzo delle proteine, l'uso di piccole molecole organiche come ormoni, vitamine, droghe è in forte crescita. Normalmente, queste molecole necessitano di essere trattate in maniera differente rispetto a quelle precedentemente descritte. Spesso è necessario sintetizzare dei derivati da queste molecole con i gruppi funzionali in determinate posizioni. Inoltre alcune sostanze presentano una bassa solubilità in sostanze acquose e quindi necessitano di essere trattate con solventi organici durante l'immobilizzazione. In generale, per l'immobilizzazione delle molecole si ricorre all'attrazione elettrostatica ma per le molecole di piccola taglia ($< 700Da$) questo non è applicabile. Le molecole con i gruppi funzionali come ammini, tiolo, aldeidi o gruppi carbossilici possono essere normalmente immobilizzati tramite legami covalenti ai corrispondenti gruppi attivi sulla superficie del sensore. Le piccole molecole al contrario, non essendo dotate dei loro gruppi funzionali necessitano di essere trattate e quindi di dover sintetizzare delle molecole organiche. Questa procedura porta notevoli vantaggi sul fatto di poter gestire la struttura della molecola che si va a creare e quindi di poter così trovare le condizioni ottimali per generare l'accoppiamento più forte con la superficie. Inoltre la scelta del tipo del gruppo funzionale e la struttura della molecole può essere ottimizzata al fine di minimizzare l'interferenza con gli altri gruppi non specifici creando così una sorta d'indipendenza tra i vari gruppi.

4.2.5 Carboidrati

Le interazioni che interessano i carboidrati sono molto importanti per diversi eventi biologici. Normalmente la loro interazione con le proteine è debole e le tecniche tradizionali risultano spesso difficili da applicare. La rilevazione SPR è una buona tecnica per studiare il comportamento di queste molecole visto che c'è un crescente interesse in settori emergenti come la glicomica. L'utilizzo più importante è nell'accoppiamento dello zucchero con i gruppi idrossili. In alternativa si possono utilizzare altre piccole molecole. L'approccio più comune consiste nell'usare gruppi aldeidici per l'immobilizzazio-

ne diretta o per creare una soluzione modificata del carboidrato che verrà successivamente immobilizzata. In alternativa si possono inserire dei derivati biotinilati come la biotina. I carboidrati polisaccaridi possono essere immobilizzati in vari modi in base ai gruppi funzionali presenti. Le glicoproteine possono essere considerate come un caso speciale di carboidrato. Per l'immobilizzazione covalente tramite nucleofilanti o gruppi di elettrofilanti è necessario utilizzare un'alta concentrazione di polisaccaridi e il risultato è relativamente modesto. La migliore alternativa è biotinilare i gruppi funzionali disponibili prima dell'immobilizzazione.

Capitolo 5

Applicazioni

I progressi compiuti dalla scienza nei campi della genomica, proteomica e ingegneria molecolare, hanno contribuito a migliorare i trattamenti di una grande varietà di malattie allungando e migliorando così l'aspettativa di vita. Il controllo dei fluidi biologici e dei marcatori contenuti in essi è la prassi con cui la medicina moderna ormai opera, ecco perchè i biosensori SPR presentati in queste pagine sono e saranno una tecnologia cardine nella medicina moderna. Questi strumenti diagnostici permettono un monitoraggio continuo della concentrazione di determinati analiti, a differenza degli strumenti ordinari. Tra le più importanti ricordiamo quelle per la rilevazione di:

- Marcatori del cancro
- Marcatori cardiaci
- Anticorpi
- Ormoni
- Farmaci
- Allergie
- Tossine
- Metalli pesanti

Di seguito verrà riportata la spiegazione un pò più nel dettaglio di alcune delle applicazioni sopra elencate in modo da fornire una visione più chiara e generale delle potenzialità di tali strumenti.

5.1 Ormoni

Il monitoraggio della concentrazione degli ormoni femminili è molto importante per la diagnosi di malattie oltre che per la salute dell'eventuale feto. Il

più importante ciclo di marcatori femminili che viene tipicamente misurato nei laboratori o nei test commerciali è l'ormone follicolo stimolante (FSH) come indicatore della non gravidanza, l'ormone luteinizzante (LH) come indicatore dell'ovulazione e l'ormone della gonadotropina corionica (hCG) come indicatore della gravidanza. In figura 5.1 viene riportata la misura diretta del hCG effettuata da un sensore SPR con modulazione della lunghezza d'onda[1].

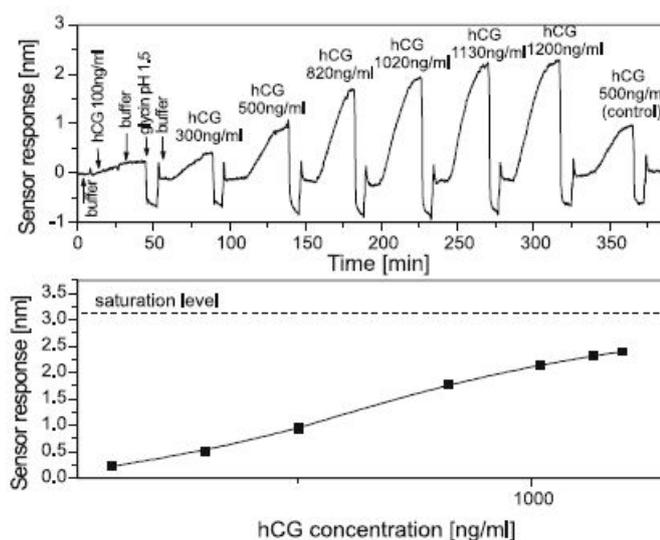


Figura 5.1: In alto viene riportato l'output del sensore corrispondente alla concentrazione di hCG tramite i legami con l'anti-hCG immobilizzato sulla superficie, in basso invece viene riportata la curva di calibrazione del sensore.

In questi casi, l'immobilizzazione consiste in un collegamento tra streptavidina ad un SAM biotinilato seguito dal legame degli oligonucleotidi biotinilati ai siti di legame disponibili di streptavidina. Infine, anticorpi chimicamente modificati come gli oligonucleotidi e la loro sequenza complementare vengono immobilizzati sulla superficie del sensore tramite ibridazione del DNA e si è calcolato che il limite di rilevabilità per una misura diretta dell'hCG con il sensore SPR a modulazione di lunghezza d'onda è di 0.5 ng mL^{-1} .

5.2 Farmaci

Il monitoraggio di sostanze come i farmaci a scopo terapeutico, è molto importante per il trattamento di molte malattie (e.g., HIV, infarti, Parkinson, malaria, fibrosi cistica, diabete mellito, ecc. . .). In generale, si vuole rilevare la presenza di anticoagulanti quali il 7-hydroxycoumarin (7-OHC) o derivati. I siti di legame immobilizzati in eccesso generano una risposta del sensore che è inversamente proporzionale alla concentrazione del 7-OHC. Altri inve-

ce, rilevano la presenza di un anticoagulante orale come il warfarin. Questa misura viene effettuata con plasma ultrafiltrato (diluito in rapporto 1:100) e in un range di circa $4 - 250 \text{ ng mL}^{-1}$. In figura 5.2 viene riportata la curva di calibrazione del sensore e il grafico dei residui nella misura della concentrazione della warfarina. Si ha inoltre che diversi chip di sensori con

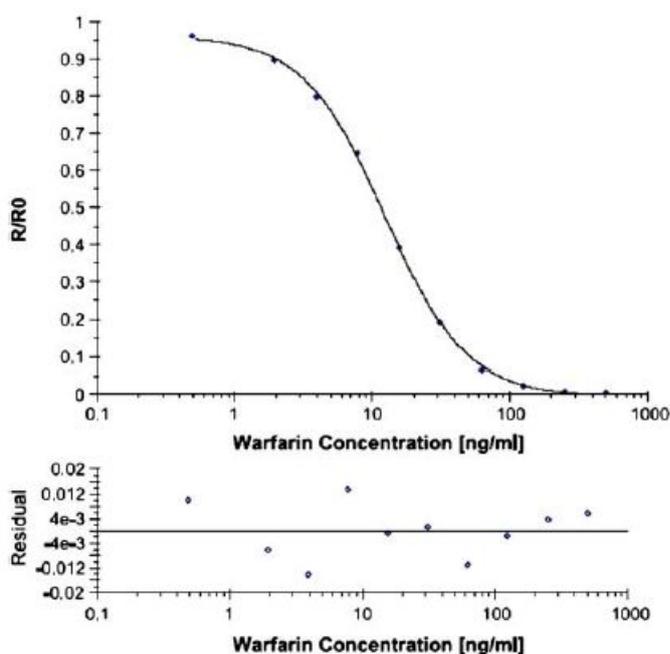


Figura 5.2: In alto curva di calibrazione del sensore e in basso la risposta del sensore in termini di residui rispetto ad un valore medio di warfarina.

rivestimento a singolo strato o di derivati idro-gel si caratterizzano per la loro capacità di resistere all'assorbimento di sostanze non specifiche contenute nel plasma. I migliori risultati rispetto all'assorbimento del plasma si ottengono con l'immobilizzazione degli anticorpi su una superficie modificata tramite SAM. Il limite di rilevabilità trovato per l'interferone- γ in plasma diluito al 1% è circa di 250 ng mL^{-1} mentre quello di piccole molecole organiche come l'eparina, utilizzando l'immobilizzazione di anticorpi specifici è di circa 625 ng mL^{-1} . Si segnala infine che nella rilevazione della morfina tramite i suoi anticorpi specifici, il segnale della SPR si riduce a causa degli effetti inibitori della morfina stessa[1].

Conclusioni

In queste pagine è stata presentata la tecnologia dei sensori SPR. Si è visto come, con opportuni metodi d'eccitazione, una superficie di interfaccia metallo/dielettrico, riesca a generare un segnale molto sensibile alle variazioni dell'indice di rifrazione della superficie stessa. Tale variazione si può misurare attraverso varie tecniche, sia di tipo ottico (ellissometria, spettroscopia) che elettrico, trasducendo il segnale in una grandezza elettrica tramite opportuni trasduttori (fotodiodo). Sono state inoltre presentate varie configurazioni di sistemi di acquisizione dati basati sul fenomeno SPR. Si è visto che con un'opportuno trattamento della superficie d'interfaccia (funzionalizzazione) è possibile ottenere una misura della concentrazione di un analita presente in una soluzione. Questo è dovuto al fatto che, le molecole d'interesse presenti nella soluzione, interagiscono con la superficie opportunamente trattata, modificando l'indice di rifrazione dell'interfaccia e facendo quindi variare i parametri della SPR. Quello che si ottiene è quindi un dispositivo label-free facilmente applicabile in diagnostica o più in generale, in ambito medico e biologico.

Ad oggi, questi strumenti sono ancora in fase di sviluppo e progettazione, tuttavia ci si attende che andranno a ricoprire un ruolo di rilievo nelle tecnologie future, sia in ambito biologico che medico. Questi strumenti infatti risultano molto adatti ad applicazioni che richiedono misure molto accurate. Infatti i loro punti di forza sono:

- elevata sensibilità
- elevata affidabilità
- semplicità di funzionamento e della strumentazione
- il fatto che le misurazioni possono essere fatte con piccoli volumi di analità

I sensori basati sull'accoppiamento tramite reticolo sono il riferimento per la produzione di massa vista la sua progettazione low-cost, mentre per situazioni più raffinate i sensori a guide d'onda rappresentano un'ottima alternativa visto il loro grado di integrabilità. Nell'immediato futuro ci si aspetta da questa tecnologia un ulteriore miglioramento dal punto di vista

delle prestazioni rendendo questi dispositivi sempre più robusti e precisi. Inoltre sia le tecniche di funzionalizzazione della superficie che lo studio degli elementi di funzionalizzazione sono campi in continuo miglioramento. La prevenzione è l'arma più potente che la medicina ha in un mondo sempre più frenetico dove la salute del singolo individuo è minata da un'infinità di fattori. Gli strumenti SPR sono e saranno strumenti all'avanguardia che mireranno a diagnosi sempre più precise e veloci.

Bibliografia

- [1] Homola J., *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, methods and applications*, Series Editor: O. S.Wolfbeis, July, 2006.
- [2] Homola J., *Surface Plasmon Resonance for Detection of Chemical and Biological Species*, Chemical Reviews, American Chemical Society, 2008, Vol 108, No. 2.
- [3] Katherine A. Willets and Richard P. Van Duyne, *Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing*, The Annual Review of Physical Chemistry, 19 October 2006.
- [4] Daryoush Mortazavi, Abbas Z. Kouzani, Akif Kaynak and Wei Duan, *Nano-Plasmonic Biosensors: A Review*, IEEE, 2011.
- [5] Jing Zhao, Xiaoyu Zhang, Chanda R. Yonzon, Amanda J. Haes and Richard P. Van Duyne, *Localized surface plasmon biosensors*, Review, futuremedicine, Nanomedicine, 2006.
- [6] Nikmat N. Daghestani and W. Day, *Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors*, Review, Sensors, 2010.
- [7] S. H. Lim, W. Mar, P. Matheu, D. Derkacs and E. T. Yu, *Photocurrent spectroscopy of optical absorption enhancement in silicon photodiodes via scattering from surface plasmon polaritons in gold nanoparticles*, Journal of Applied Physics, 101, May, 2007.
- [8] Yumin Wang, Xiaodong Su, Yongyuan Zhu, Qianjin Wang, Dongliang Zhu et all., *Photocurrent in Ag-Si photodiodes modulated by plasmonic nanopatterns*, Applied Physics Letters, 2009.
- [9] <http://en.wikipedia.org/wiki/Ellipsometry> (visionato il 10 febbraio 2012)
- [10] <http://www.alfatest.net> (visionato il 18 dicembre 2011)