



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**Corso di laurea in Ingegneria Biomedica**

**Progettazione, stampa e caratterizzazione di sensori per il  
monitoraggio dell'attività cellulare tramite analisi  
d'impedenza.**

**Relatore: *Prof.ssa* Sarah Tonello**

**Laureanda: Ilaria Colomberotto**

**Matricola: 2010220**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 25/09/2023**



*The important thing is not to stop questioning;  
never lose a holy curiosity.*

*- Albert Einstein*



## Indice

Abstract	pag. 3
Introduzione	pag. 5
Capitolo 1: Background	pag. 7
1.1 Potenziale di trans-membrana e potenziale d'azione	pag. 7
1.2 Elettrodi per biopotenziali: caratteristiche e principio di trasduzione	pag. 11
1.3 Elettrodi per misure di impedenza: caratteristiche e principio di trasduzione	pag. 15
Capitolo 2: <i>Microelectrode array</i> : (definizione, struttura e tipologie)	pag. 23
2.1 Definizione	pag. 23
2.2 Storia	pag. 23
2.3 Struttura generica	pag. 25
2.4 Tipologie di <i>MEAs</i>	pag. 26
2.5 Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dei <i>MEAs</i>	pag. 29
Capitolo 3: Realizzazione di un <i>MEA</i>	pag. 31
3.1 Scelta del substrato e dei materiali realizzativi	pag. 31
3.2 Fabbricazione	pag. 32
3.3 Passivazione degli elettrodi	pag. 41
3.4 Tecniche per aumentare l'area di elettrodo	pag. 42
Capitolo 4: Geometrie più utilizzate	pag. 45
Capitolo 5: Caso pratico: realizzazione di un <i>MEA</i>	pag. 55
5.1 Progettazione	pag. 55
5.2 Stampa	pag. 59
5.2.1 Materiali utilizzati: Kapton e inchiostri conduttivi	pag. 59
5.2.2 <i>Ink-Jet printing</i> : stampante Dimatix Materials Printer	pag. 60
Capitolo 6: Misurazioni e risultati	pag. 67
6.1 Caratterizzazione ottica – caratterizzazione strutturale	pag. 67
6.2 Caratterizzazione elettrica – caratterizzazione funzionale	pag. 70
6.3 Caratterizzazione elettrofisiologica – caratterizzazione funzionale	pag. 73
6.3.1 Spettroscopia d'impedenza	pag. 76
6.3.2 Registrazione del PA cellulare	pag. 85
6.4 Discussione dei risultati ottenuti	pag. 91
Conclusioni	pag. 93
Bibliografia	pag. 95



## **Abstract**

A partire dagli anni Cinquanta del secolo scorso vi è stato un enorme sviluppo dei biosensori per il monitoraggio cellulare, ed in particolare i *microelectrode arrays* (*MEAs*) hanno riscosso grande successo in anni recenti per la flessibilità delle applicazioni in cui possono essere impiegati.

Applicati sia *in vitro* che *in vivo*, il loro utilizzo ha portato un contributo non indifferente a discipline come l'elettrofisiologia, la medicina e la biologia, permettendo di approfondire le dinamiche e il comportamento delle cellule appartenenti a colture cellulari, di studiare non invasivamente l'evoluzione e l'attività della singola cellula (*in vitro*) e di proporre nuove tecnologie di monitoraggio, ma anche tentativi di trattamento, delle patologie più disparate (*in vivo*).

In questo elaborato, dopo un'iniziale infarinatura sui *MEAs* in cui verranno presentate struttura, tecniche di utilizzo, principali metodologie di fabbricazione e design più utilizzati, verranno trattati i sensori che sfruttano la tecnica dell'analisi d'impedenza (*EIS* o *ECIS*) e il monitoraggio del potenziale d'azione con geometria monopolare.

Verrà a questo proposito esposto un caso pratico di progettazione, realizzazione e caratterizzazione di un *MEA multi-purpose* per la misura di impedenza di una singola cellula, evidenziando in particolare le scelte fatte per quanto riguarda la geometria, la metodologia di stampa, i materiali utilizzati e le prove di verifica svolte in laboratorio per la caratterizzazione ottica, elettrica ed elettrofisiologica del biosensore realizzato, grazie anche all'ausilio di un analizzatore d'impedenza.





## Introduzione

La medicina è la disciplina che più di tutte ha come obiettivo il miglioramento del benessere psico-fisico di ogni individuo, ed è per questo che ogni giorno personale medico, tecnici e ricercatori si adoperano instancabilmente per trovare soluzioni innovative in grado di aumentare la salute della collettività.

In particolare, per avere migliori risultati nella cura del corpo nella sua totalità, è sempre più chiaro come sia indispensabile analizzarne le unità fondamentali, le cellule, in modo da poter riconoscere, trattare e addirittura prevenire adeguatamente le più diverse patologie.

È proprio per questo che, nel corso dei secoli, sono nate discipline che hanno tutt'ora lo scopo quello di indagare il funzionamento delle cellule; ne sono esempi la citologia, la microbiologia e l'elettrofisiologia.

Quest'ultima si propone in particolare di analizzare l'attività elettrica del corpo umano, sia per quanto riguarda tessuti che singole cellule.

La sua branca cellulare ebbe una spinta senza precedenti a partire dagli anni Cinquanta del Novecento, quando Alan Lloyd Hodgkin e Andrew Huxley riuscirono per la prima volta a misurare le correnti ioniche cellulari, a riconoscere per questo la formazione di un potenziale d'azione e a misurare la conduttanza di membrana, il tutto grazie alla tecnica del *voltage clamp*. Da allora la ricerca e le innovazioni per il monitoraggio dell'attività elettrica cellulare si sono moltiplicate, portando alla nascita di ulteriori tecniche (*patch clamp technique* - 1976) e all'adattamento di biosensori già esistenti per poterli applicare a livello micrometrico (i *GEVI* - *genetically encoded voltage imaging* - *FlaSh* - 1997, i *MEAs* - *microelectrode o multielectrode arrays* - 1972 e molti altri ancora).

Nel presente elaborato verrà approfondita una particolare tipologia di biosensori in miniatura, i *microelectrode array (MEAs)*, dei quali verrà fornita nei primi capitoli un'estensiva trattazione teorica, per poi passare alla realizzazione pratica di uno di questi biosensori che avrà come obiettivo il monitoraggio di attività e crescita cellulare tramite l'analisi di impedenza e la registrazione del potenziale d'azione, riportandone progettazione, tecnica di fabbricazione utilizzata e risultati della caratterizzazione.

Si andranno infine a verificare i risultati ottenuti, confrontandoli con quelli attesi.



## Capitolo 1: Background

Prima di poter entrare nel vivo della trattazione dei *MEAs* si rende necessaria un'introduzione inerente la propagazione dell'attività elettrica in una cellula e, soprattutto, il meccanismo che sta dietro agli elettrodi che andranno a misurare tale attività e su cui si baserà il tipo di sensore che verrà progettato.

Viene pertanto fornita di seguito una breve spiegazione al riguardo.

### 1.1 Potenziale di trans-membrana e potenziale d'azione

Le cellule eucarioti, che sono l'elemento base di cui è formato il corpo umano, presentano varie componenti fondamentali (Figura 1.1), tra le quali è possibile trovare la membrana plasmatica. Questa è formata da un *bilayer* lipidico contenente proteine di membrana che racchiude il citoplasma e tutti gli organelli appartenenti alla cellula, separa la stessa dall'ambiente extracellulare ed è responsabile della formazione e propagazione dell'attività elettrica cellulare nel caso di cellule elettricamente eccitabili. [1]

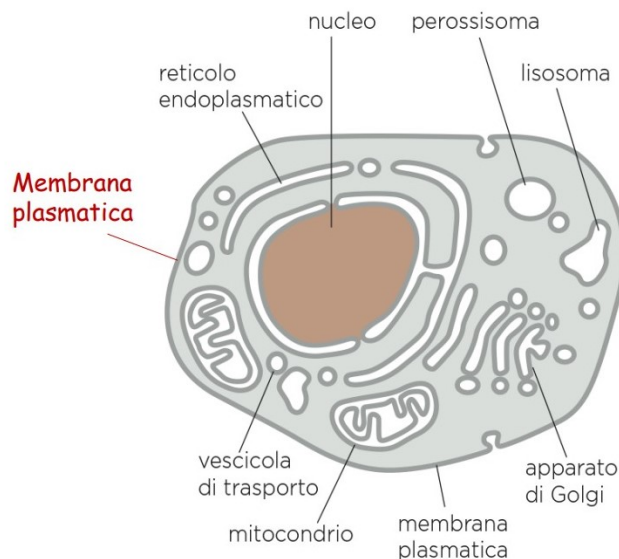


Figura 1.1 – Schema di una cellula eucariote

In presenza di cellule elettricamente eccitabili come quelle neuronali, muscolo-scheletriche o cardiache la membrana cellulare è infatti in grado di creare e mantenere una precisa concentrazione di ioni all'esterno e all'interno della cellula, generando un gradiente di concentrazione pressoché costante nel tempo (a meno che non sopraggiunga un impulso) che può venire misurato elettricamente e rappresenta il potenziale di trans-membrana a riposo (ottenuto grazie all'equazione di Einstein che lega gradiente e potenziale). Il mantenimento di questo gradiente risulta possibile grazie all'azione di specifiche proteine di

membrana che sono in grado di far passare ininterrottamente gli ioni da un lato all'altro della stessa.

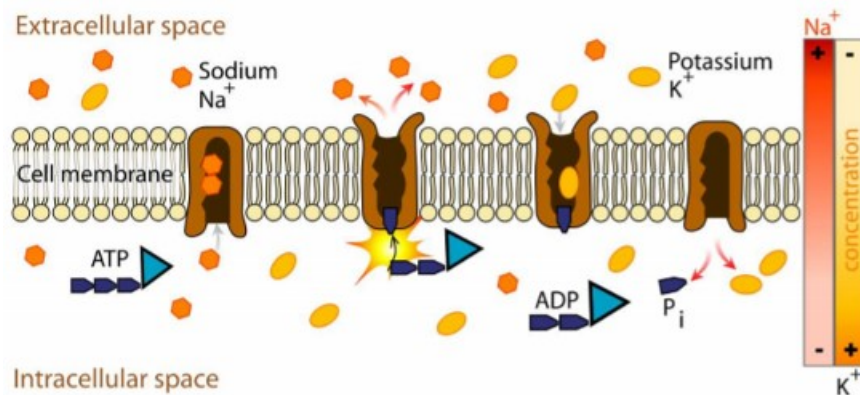


Figura 1.2 – Funzionamento delle pompe sodio-potassio per il mantenimento del potenziale di trans-membrana nelle cellule elettricamente eccitabili.

In assenza di impulsi elettrici, esistono due tipi di trasporto ionico: il trasporto passivo, che sposta naturalmente gli ioni nella regione a minor concentrazione (diffusione libera) e in quella verso cui è orientato il campo elettrico (diffusione ionica), cercando in entrambi i casi l'equilibrio, ed il trasporto attivo, che si verifica per opera delle pompe elettrogeniche sodio-potassio, basate sull'idrolisi dell'ATP, e garantisce un accumulo di cariche elettriche negative all'interno della cellula tramite la fuoriuscita di 3 ioni  $\text{Na}^+$  e l'ingresso di 2 ioni  $\text{K}^+$  (carica netta negativa), come è possibile vedere nella Figura 1.2. Questo continuo scambio genera il potenziale di equilibrio di trans-membrana  $V_m$ , che nelle cellule elettricamente eccitabili si aggira per neuroni e cellule pacemaker sui  $-70$  mV e per cellule muscolari sui  $-90$  mV ed è calcolabile come la media pesata dei potenziali di Nernst delle specie ioniche (ovvero i potenziali di trans-membrana per singola specie tra sodio  $V_{\text{Na}}$ , potassio  $V_{\text{K}}$ , cloro  $V_{\text{Cl}}$  ecc..) con le rispettive conduttanze (1).

$$V_m = \frac{g_{\text{Na}}V_{\text{Na}} + g_{\text{K}}V_{\text{K}} + g_{\text{Cl}}V_{\text{Cl}}}{g_{\text{Na}} + g_{\text{K}} + g_{\text{Cl}}} \quad (1)$$

Grazie al fatto che questi due fenomeni hanno luogo in versi opposti è possibile mantenere costante il gradiente di concentrazione; infatti, il trasporto attivo si occupa della creazione dello sbilanciamento ionico che garantisce la presenza di un potenziale, mentre il trasporto passivo del lento ma costante tentativo di ribilanciamento.

Tuttavia, la peculiarità di neuroni e muscoli è quella di essere in grado di trasmettere informazioni ed istruzioni da una parte all'altra del corpo tramite degli impulsi elettrici.

Questi impulsi vengono trasmessi grazie ad una variazione di potenziale a cavallo della membrana, anche se non tutti gli stimoli agenti sulla stessa diventeranno effettivamente informazione trasmessa.

Infatti, come è possibile osservare nella Figura 1.3, uno stimolo può causarne l'iperpolarizzazione (potenziale a cavallo della membrana diventa più negativo del potenziale di riposo), la quale si annullerà sempre entro qualche secondo riportando la membrana alla situazione di equilibrio, o la depolarizzazione (potenziale a cavallo della membrana diventa più positivo del potenziale di riposo), la quale può avere due risvolti: se l'impulso non raggiunge una certa soglia di stimolazione (che si aggira sui -55 mV) si tornerà rapidamente alla situazione di equilibrio, mentre se l'intensità dell'impulso raggiunge e/o supera la soglia considerata viene data vita al potenziale d'azione o PA, un impulso di forma ed energia specifiche in grado di trasmettersi da cellula a cellula e di trasportare informazioni.

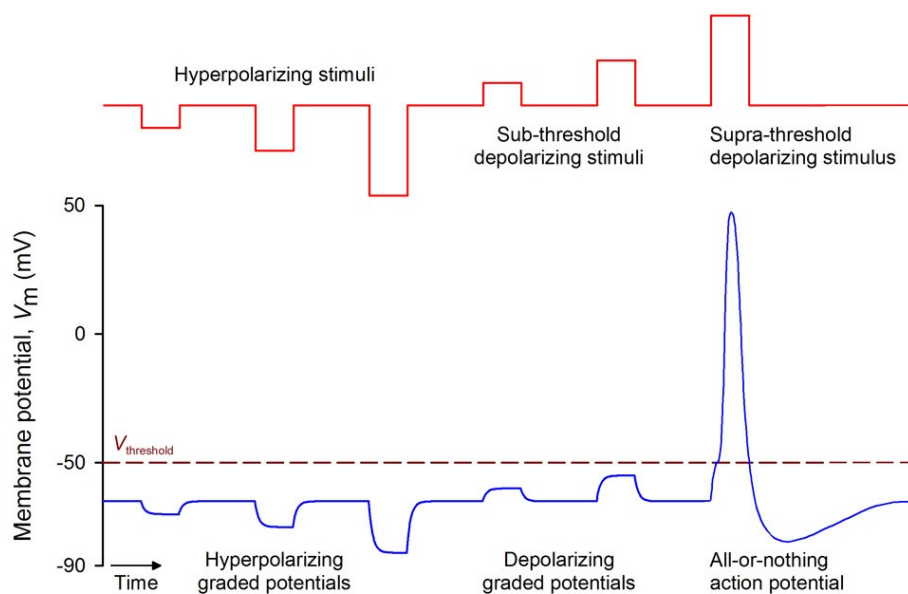


Figura 1.3 – Reazione del potenziale di membrana ai diversi stimoli in tensione e instaurazione del potenziale d'azione solo con il raggiungimento della soglia di stimolazione.

Il potenziale d'azione nelle cellule neuronali si compone di 4 fasi (vedi Figura 1.4):

1. Depolarizzazione: un impulso provoca l'innalzamento della tensione di transmembrana, che se raggiunge la soglia provoca l'apertura di molti canali del sodio voltaggio-dipendenti, aumentando ulteriormente il potenziale (flusso entrante di ioni positivi).
2. *Overshoot*: con l'aumentare del potenziale di membrana si aprono anche i canali del potassio voltaggio-dipendenti, che cominciano a riequilibrare la depolarizzazione dovuta ai canali del sodio. Questo, sommato ai primi canali del sodio che cominciano

ad entrare nella fase di inattivazione, ci porta al valore massimo di tensione positiva raggiungibile.

3. Ripolarizzazione: continua l'azione dei canali del potassio e viene completata l'inattivazione di tutti canali del sodio, portando la differenza di potenziale misurata a ridiscendere.
4. Iperpolarizzazione: l'azione prolungata dei canali del potassio porta la tensione a scendere al di sotto del valore di equilibrio della membrana, che verrà poi riequilibrato con la chiusura dei suddetti canali e l'azione di diffusione libera e/o ionica.

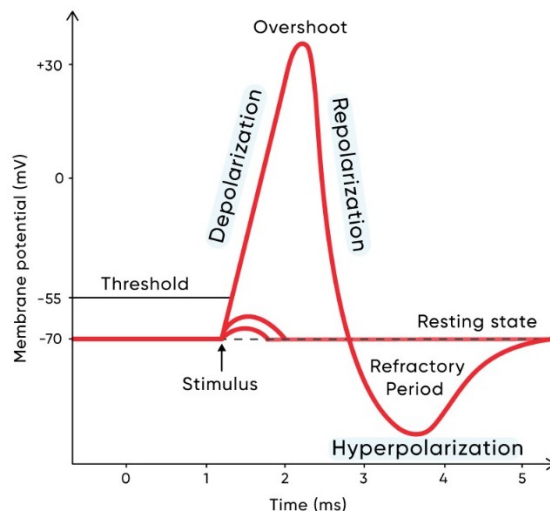


Figura 1.4 – Forma del PA e distinzione delle varie fasi.

Il PA si sviluppa quindi grazie all'azione di particolari canali “voltage-dipendenti”, la cui apertura o chiusura dipende appunto dalla differenza di potenziale di membrana.

I canali voltage-dipendenti più significativi per la trasmissione dell'impulso neuronale sono quelli del sodio e del potassio, entrambi chiusi in condizioni di equilibrio; questi si aprono al raggiungimento della soglia di stimolazione e fanno, nel caso del potassio, uscire una grande quantità di ioni  $K^+$ , e nel caso del sodio, entrare una grande quantità di ioni  $Na^+$  fino all'inattivazione del canale, che avviene dopo qualche ms.

Nel caso di una cellula muscolare o pacemaker vi sarebbe, appena dopo l'*overshoot*, una fase di plateau data dall'azione dei canali voltage-dipendenti del calcio.

Il PA ha poi un periodo refrattario che inizia subito dopo l'*overshoot* e perdura sino al ritorno al potenziale di equilibrio, il che impedisce ad altri stimoli di instaurare un nuovo PA (in realtà il periodo refrattario si divide in assoluto e relativo, e durante il periodo refrattario relativo è possibile generare un nuovo PA a patto che lo stimolo generatore sia abbastanza intenso da compensare l'iperpolarizzazione).

Il PA, infine, ha forma e durata indipendenti dall'intensità dello stimolo iniziale: se viene raggiunta la soglia di stimolazione, infatti, l'azione dei canali del sodio e del potassio continua allo stesso modo indipendentemente dalla forma dello stimolo.

Per questo il PA viene detto fenomeno del "tutto o niente" (*all-or-nothing*). [1], [2]

## 1.2 Elettrodi per biopotenziali: caratteristiche e principio di trasduzione

Per la misurazione del PA, ma anche di molti altri biopotenziali provenienti dal corpo umano, degli strumenti essenziali sono gli elettrodi per biopotenziali, costituiti da una coppia di elettrodi conduttivi in grado di misurare la differenza di potenziale tra due punti in un sistema biologico.

La registrazione del PA tramite *MEA* avviene utilizzando un tipico micro-sensore formato da (come verrà approfondito nel Capitolo 2) film metallico, passivante e substrato su cui le cellule coltivate *in vitro* vengono disposte e fatte aderire per la misurazione.

La misura in questione avviene grazie alla capacità dei microelettrodi di trasformare il flusso di ioni (fenomeno di conduzione ionica) presente nella regione extracellulare in un flusso di elettroni (fenomeno di conduzione elettronica).

Questo può avvenire poiché, nonostante le cellule siano spesso ben aderenti al substrato, è presente ancora un piccolo volume di elettrolita tale da formare con l'elettrodo un'interfaccia metallo-soluzione. Dalla formazione di questa interfaccia si sviluppa una reazione di ossidoriduzione che, agendo, dà vita ad un potenziale elettrico tra elettrodo e soluzione (positivo se la reazione all'equilibrio è più riducente – generazione di corrente anodica, negativo se è più ossidante – generazione di corrente catodica), il quale genera un doppio strato di cariche elettriche nell'interfase. [3], [4]

Il valore rilevato dal sensore è quindi quello del potenziale d'elettrodo che, nel caso di flusso di cariche nullo (corrente anodica e catodica nulla all'interfaccia), viene definito potenziale di equilibrio o di semi-cella, e può essere espresso dall'equazione di Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{rid}}$$

Questo corrisponde al potenziale di membrana cercato, grazie al fatto che la composizione ionica dell'elettrolita a contatto col metallo è proprio quella della regione esterna alla membrana cellulare (teoria del potenziale di semicella). [3], [4]

Nel caso di passaggio di corrente invece, il potenziale misurato risentirà della polarizzazione dell'elettrodo e non sarà quello di semi-cella, ma un valore superiore o inferiore allo stesso che vi si discosta di un sovrapotenziale ( $\eta$ ):  $\eta = E - E_{eq}$ . [4]

Il principio di trasduzione utilizzato da questa tipologia di elettrodi si basa su una misura bipolare, ovvero sull'utilizzo di due elettrodi conduttivi con i quali misurare il potenziale di due regioni diverse, trovando nella differenza il valore vero. Questi elettrodi devono essere molto simili tra loro e possibilmente ricoperti di argento/cloruro d'argento per evitare instabilità ed alto offset in DC, non necessitano di funzionalizzazione d'elettrodo e possono essere *wet* o *dry*.

Per funzionare presentano necessariamente un circuito di condizionamento in cui sono presenti amplificatori differenziali (INA), ponti resistivi abbinati a INA e circuiti per la lettura dell'impedenza che aiutano a rendere il segnale apprezzabile e visibile. [5]

Nella Figura 1.5 è riportato lo schema del meccanismo di trasduzione di un elettrodo per biopotenziali.

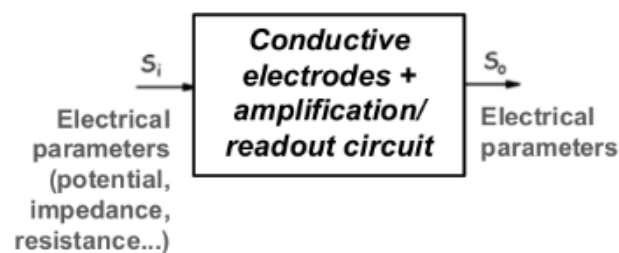


Figura 1.5 – Schema teorico del principio di trasduzione dei bioelettrodi.

Il principio di trasduzione degli elettrodi per biopotenziali è rappresentabile tramite un modello elettrico equivalente che varia a seconda del tipo di sensore utilizzato: esistono infatti bioelettrodi *wet*, *dry* o (nei casi peggiori) che presentano un isolante.

In Figura 1.6 (a) viene riportato il modello equivalente di un bioelettrodo *wet* (con gel), che presenta varie componenti (dal basso verso l'alto):

- Una resistenza  $R_u$  utilizzata per rappresentare gli strati sottostanti all'epidermide, relativamente conduttivi;
- Un condensatore  $C_e$  in grado di approssimare lo strato corneo poco conduttivo della pelle, che viene meglio rappresentato dall'impedenza empirica:  $Z(s) = Ks(j\omega)^{-\alpha}$ ;
- Una resistenza  $R_e$  con cui è possibile schematizzare gli scambi di ioni e materia che avvengono attraverso la pelle tramite follicoli piliferi, dotti sudoripari, ghiandole sebacee ecc., messa in parallelo al condensatore  $C_e$ ;
- Una (eventuale) resistenza  $R_g$  generata dall'utilizzo del gel;
- Lo schema elettrico dell'interfaccia elettrodo/elettrolita, formata dal parallelo tra un condensatore  $C_d$  ed un resistore  $R_d$  (vedi Sezione 1.3);
- Un generatore  $E_{hc}$  per rappresentare il potenziale di semicella dell'elettrodo. [4]



In Figura 1.6 (b) è invece visibile la rappresentazione schematica di un elettrodo per biopotenziali dry, in cui gli elementi circuitali che descrivevano l'interfaccia elettrodo/elettrolita ed il gel vengono eliminati, ed in cui l'impedenza di contatto si alza notevolmente.

Questo accade poiché gli elettrodi per biopotenziali devono essere in grado di captare tensioni a livello sia cellulare che superficiale, quindi provenienti anche da superfici solide e semisolide. Se venissero posti direttamente a contatto con la pelle, ad esempio, il segnale ottenuto avrebbe un modulo altissimo, dato dall'alta impedenza, che impedirebbe di apprezzare le piccole variazioni di potenziale corporee.

Per questo motivo va garantita la presenza di un'interfaccia metallo-elettrolita, anche minima, per la formazione del doppio strato di cariche positive o negative della redox da cui dipende il potenziale che si andrà poi a misurare. [6], [7]

Infine, in presenza di un isolante tra epidermide ed elettrodo (vedi Figura 1.6 (c)), viene aggiunto un condensatore che ne rappresenta l'accumulo di carica (e quindi la perdita di segnale). [5]

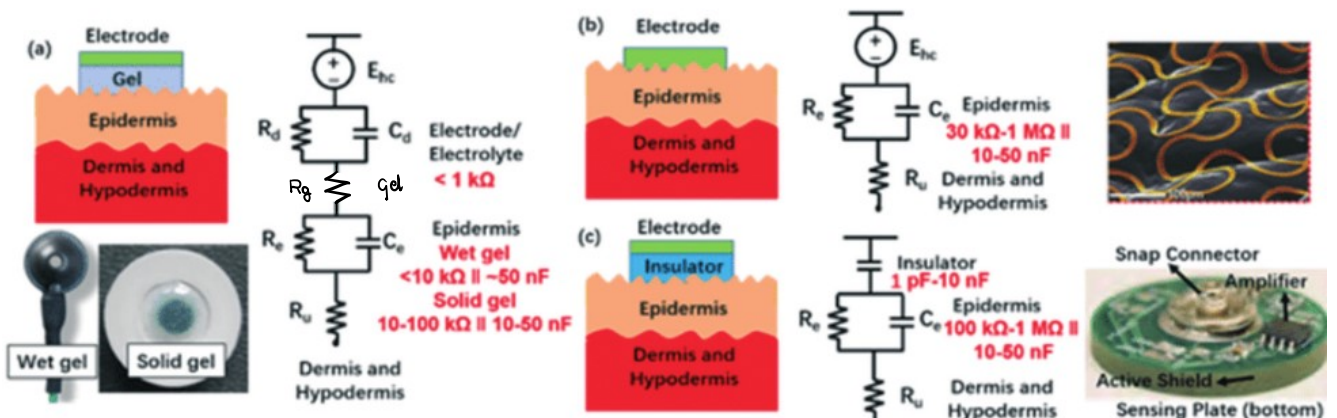


Figura 1.6 – (a) Schema elettrico e fisico di un bioelettrodo wet, (b) schema elettrico e fisico di un bioelettrodo dry, (c) schema elettrico e fisico di un bioelettrodo con isolante.

Viene infine riassunto nel modello rappresentato in Figura 1.7 il principio di trasduzione di bioelettrodi cellulari, dove si trovano tre componenti principali: la sorgente elettrica  $V_{in}$  che rappresenta il potenziale di transmembrana (il valore da misurare); il parallelo tra  $C_M$  e  $I_M$  esprime l'effetto congiunto del doppio strato lipidico della membrana cellulare e dei canali ionici presenti al suo interno; la resistenza di tenuta (*sealing resistance* –  $R_{seal}$ ) riproduce infine la perdita di segnale data dalla presenza dell'elettrolita tra cellule e microelettrodi, che “porta via” degli ioni dal flusso e li disperde nel mezzo stesso.

La corrente totale in grado di attraversare la membrana basale è quindi la somma della corrente ionica ( $I_{ionic}$ ) e della corrente capacitiva ( $I_M$ ) come segue:  $I_{total} = K \frac{dV_{in}}{dt} = C_M \frac{dV_{in}}{dt} + I_{ionic}$ . [7]

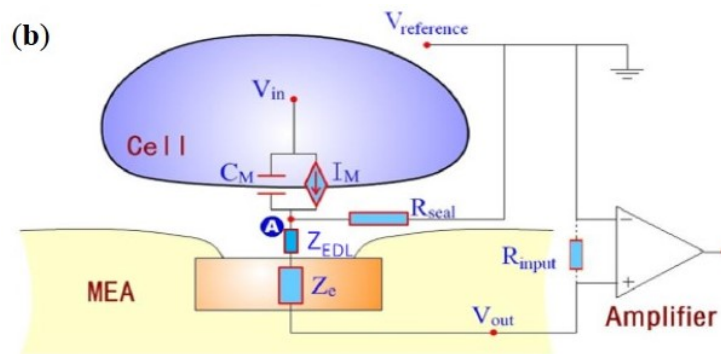


Figura 1.7 – Conversione del segnale da biologico a elettrico.

Dopo averne compreso il funzionamento, gli elettrodi per biopotenziali possono essere suddivisi in varie categorie a seconda di diversi criteri. Si riportano alcune classificazioni di seguito.

A seconda della dimensione dell'elettrodo si avranno:

1. Elettrodi superficiali: adeguati alla rilevazione di variazioni di potenziale (o all'invio di stimoli) su una zona superficiale abbastanza estesa della cute; sviluppano minore impedenza rispetto alle altre tipologie di elettrodi.
2. Elettrodi interni o ad ago: captano variazioni di potenziale (o inviano stimoli) all'interno di tessuti, dopo essere stati inseriti nel paziente (interni) o applicati sulla cute dello stesso (transcutanei); presentano un'impedenza intermedia tra gli altri due tipi di elettrodo.
3. Microelettrodi: elettrodi in miniatura, utilizzati per stimolare o registrare variazioni di potenziale a livello cellulare; hanno l'impedenza maggiore tra tutte le altre tipologie di elettrodo a causa della ridotta area di contatto del metallo con l'elettrolita. [3]

Gli elettrodi possono essere distinti inoltre in polarizzabili e non polarizzabili:

- Elettrodi perfettamente polarizzabili (o non reversibili): in questo tipo di elettrodi il potenziale di interfaccia dipende solamente dal doppio strato di cariche, e non varia al variare di potenziali esterni (non avvengono reazioni faradiche). Fungono da filtro passa-alto ed hanno accoppiamento capacitivo per la formazione del doppio strato di cariche, vengono realizzati in metalli nobili (difficili da ossidare e ridurre) con alterazioni di concentrazione ionica superficiale.

- Elettrodi perfettamente polarizzabili (o reversibili): questi elettrodi hanno invece un potenziale variabile a seconda degli stimoli di tensione applicati dall'esterno. Non vi è formazione di doppio strato di cariche e vi è libero passaggio di energia nelle due direzioni.

Un'ultima distinzione può essere fatta tra elettrodi interni ed esterni, che si applicano sia a livello cellulare (*in vivo* ed *in vitro*) che tissutale, misurando rispettivamente segnali intra-cellulari ed extra-cellulari. [8]

### 1.3 Elettrodi per misure di impedenza: caratteristiche e principio di trasduzione

Oltre ad essere utilizzati per captare una differenza di potenziale, gli elettrodi conduttivi possono essere utilizzati anche per eseguire una misura d'impedenza.

Tale misura valuta l'opposizione che un determinato corpo sotto analisi impone al passaggio di corrente.

Questa tecnica prende spesso il nome di spettroscopia di impedenza (o *ECIS – electrical cell-substrate impedance sensing*), poiché per riuscire a valutare varie caratteristiche resistive e capacitive del corpo sotto analisi è spesso necessario eseguire questa misura a frequenza variabile. Questo permette poi di valutare adesione, motilità, crescita e comportamento cellulare.

A livello analitico, l'impedenza viene indicata come la combinazione vettoriale di tutti gli effetti resistivi presenti in un circuito, e può essere calcolata come il rapporto tra la differenza di potenziale e la corrente passante attraverso l'interfaccia:  $Z(t) = \frac{V_{\omega}(t)}{I_{\omega}(t)}$ . [4]

In un sistema biologico vi sono una serie di ostacoli reali che possono essere rappresentati come elementi circuitali in grado di causare effetti resistivi, che sono quindi i contributi dell'impedenza misurata sul sistema in questione. Questi contributi, messi assieme, permettono di ricostruire un modello elettrico del sistema fisico considerato.

Il compito difficile dell'analisi d'impedenza è risalire a ciascun elemento circuitale e quindi a ciascun elemento fisico del sistema analizzato, compito che viene portato a termine variando la frequenza di analisi del sistema e ripetendo più volte la misura. Questo permette di risalire alle varie componenti poiché ciascuna di queste ha comportamento diverso a frequenze diverse (informazioni ottenibili tramite l'analisi del diagramma di Nyquist – impedenza per ciascuna delle frequenze esplorate – e del diagramma di Bode in modulo e in frequenza).

Attraverso la misurazione dell'impedenza di un sistema biologico si è quindi in grado di ricostruire non solo il suo modello elettrico, ma di comprenderne caratteristiche e

conformazione se questa non era precedentemente conosciuta, oltre che determinarne le varie modificazioni temporali (crescita, morte, spostamenti, ...). [4], [6]

Per quanto riguarda il funzionamento vero e proprio della tecnica *ECIS*, essa consiste nell'applicazione di una piccola tensione o corrente alternata (AC, non invasiva) variabile in frequenza dal basso verso l'alto rispetto agli elettrodi di lavoro, la quale "uscirà" da questi ultimi e rientrerà nel controelettrodo, con una corrente di intensità in modulo generalmente minore di quella di ingresso per opera dell'impedenza generata dagli ostacoli incontrati (cellule).

Viene poi utilizzato un *lock-in amplifier* per registrare i potenziali in entrata e in uscita, e tramite la legge di Ohm calcolare l'impedenza del sistema. È visibile nelle Figure 1.8 e 1.9 il principio di funzionamento della tecnica di spettroscopia d'impedenza. [7], [9]

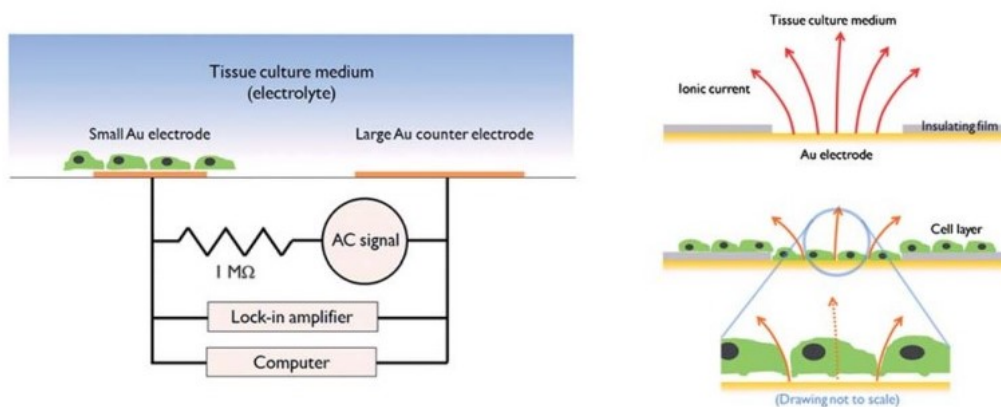


Figura 1.8 – Meccanismo di funzionamento della spettroscopia d'impedenza con circuito di condizionamento del segnale.

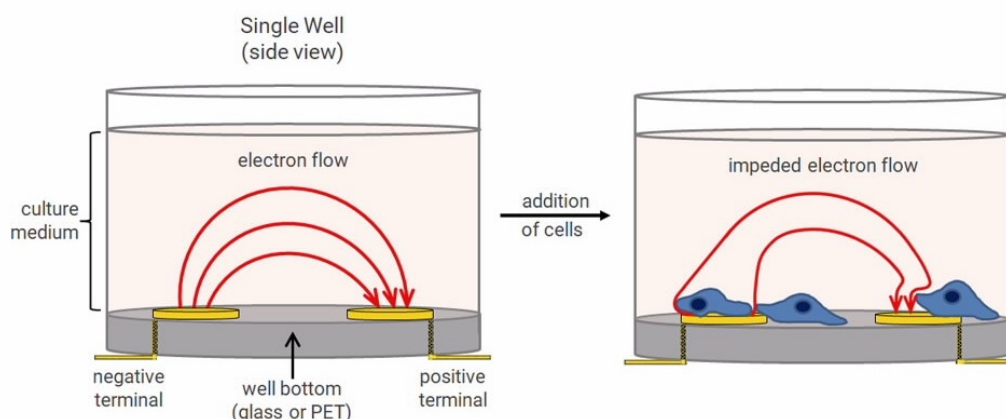


Figura 1.9 – Tecnica ECIS con (destra) e senza (sinistra) cellule.

La tensione (e conseguentemente l'impedenza) misurata dal *MEA* varia moltissimo al variare della presenza e della conformazione delle cellule presenti sullo strumento.

In assenza di cellule aderenti allo strato superficiale, la corrente è libera di scorrere dalla superficie agli elettrodi e l'impedenza di elettrodo risulta molto bassa.

Se invece vi sono cellule aderenti alla superficie dell'elettrodo queste ostacolano il flusso di corrente tra l'elettrodo emissivo e l'elettrodo ricevente aumentando l'impedenza del sistema, in quanto la membrana cellulare agisce da isolante parziale.

Maggiore superficie dei microelettrodi occupano le cellule, maggiore è l'impedenza superficiale misurata (impedenza massima si avrà quando le cellule occupano tutto il substrato disponibile).

Con la biofunzionalizzazione (aggiunta di molecole) di alcune porzioni di substrato e con la modificazione della superficie dei nanoelettrodi è possibile diminuire o aumentare l'aderenza delle cellule scelte alla superficie stessa, variando di conseguenza l'impedenza. [7]

I microelettrodi utilizzati per l'analisi d'impedenza cellulare possono presentarsi con un layout a due, tre o quattro elettrodi, che possono essere monopolari o interdigitati (*IDEs*).

Nel caso di layout a due elettrodi sono presenti un elettrodo di lavoro WE più piccolo ed un contro elettrodo CE più grande, e lo stimolo in corrente e la misurazione di tensione vengono svolti sugli stessi gli elettrodi, generando così elevata impedenza su entrambe le interfacce. Una rappresentazione del modello elettrico equivalente del layout in questione si trova in Figura 1.10 (a).

Nel layout a tre elettrodi viene aggiunto un elettrodo di riferimento RE, con il quale è possibile separare l'applicazione dello stimolo sinusoidale in tensione (tra WE ed RE) dalla misurazione della corrente (su CE). Viene così a generarsi impedenza solamente sull'elettrodo attraversato dalla corrente, il WE. Si riporta in Figura 1.10 (b) il modello elettrico equivalente del generico layout a tre elettrodi monopolari.

Nel layout a quattro elettrodi invece viene aggiunto un elettrodo sensing (WSE). In questo tipo di struttura viene applicato uno stimolo sinusoidale in corrente tra WE e CE e la tensione viene misurata tra WSE e RE, così da non attirare corrente su nessun elettrodo ed ottenere un'impedenza indipendente dalle interfacce elettrodo-elettrolita. Viene riportata la rappresentazione schematica di questo tipo di layout in Figura 1.10 (c). [5]

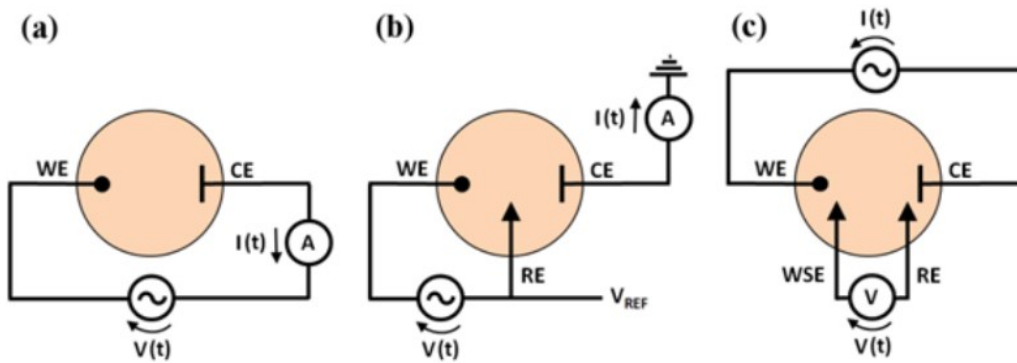


Figura 1.10 – (a) Rappresentazione circuitale schematica di un layout a due elettrodi, (b) rappresentazione circuitale schematica di un layout a tre elettrodi, (c) rappresentazione circuitale schematica di un layout a quattro elettrodi.

Vengono ora illustrate le due generiche categorie di elettrodo, monopolari ed interdigitati, che possono essere utilizzate nei diversi layout.

- Gli elettrodi monopolari possono presentarsi, come anticipato, in layout da due, tre o quattro elettrodi.

In ognuno di questi layout, per poter applicare la tecnica di analisi d'impedenza, è necessaria una grande differenza di dimensione tra elettrodo di lavoro e controelettrodo in favore del controelettrodo. Questo porta ad avere variazioni di impedenza praticamente solo se vi sono variazioni fisiche nella zona dell'elettrodo di lavoro WE, rendendo questo tipo di elettrodi adeguati a misure locali su poche o singola cellula, ma rendendo le misurazioni suscettibili ad ampie fluttuazioni.

La grande differenza di dimensione che dev'esserci tra i piccoli elettrodi di lavoro ed i grandi controelettrodi limita la miniaturizzazione (per mantenere i secondi abbastanza grandi da rendere apprezzabile la variazione di impedenza), ma causando contemporaneamente l'impossibilità di essere gli elettrodi più adeguati per l'high-throughput screening (HTS), processo di indagine e scoperta di farmaci che consente di testare come reagiscono le cellule a determinati composti chimici/biologici, per cui sono richiesti elettrodi il più piccoli possibile. [7]

Si riportano in Figura 1.11 due esempi schematici di elettrodi monopolari in layout da due.

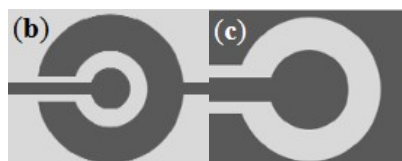


Figura 1.11 – Esempi di elettrodi monopolari per l'analisi d'impedenza cellulare in layout da due (WE centrale, CE attorno).

- Gli elettrodi interdigitati (anche detti *IDEs – interdigitated electrodes*) applicati nei MEAs sono composti da numerose unità sensibili a funzionamento indipendente che vanno a collegarsi ad una morsettiera, formando un ramo di un elettrodo.

Per formare un elettrodo funzionante in grado di misurare l'impedenza sarà presente un altro ramo identico al precedente incastrato specularmente al primo, formando una sorta di struttura a pettine (per il layout a due elettrodi). Ne viene riportato un esempio in Figura 1.12.

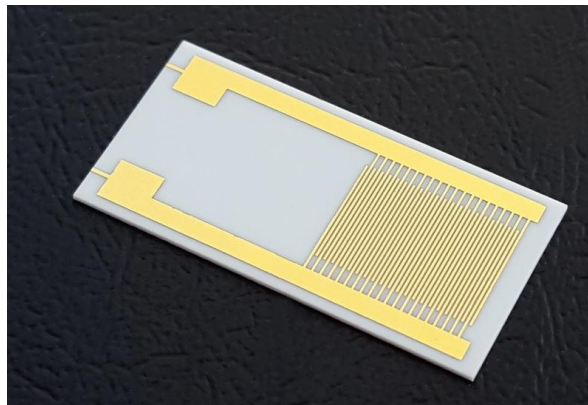


Figura 1.12 – Esempio di MEA con elettrodi interdigitati.

La tecnica EIS viene qui applicata tra un'unità sensibile di un ramo e quella di un altro. Questa tipologia di elettrodo viene particolarmente utilizzata per misure di impedenza su colture cellulari, in particolare dimostrando per questa applicazione maggiore sensibilità degli elettrodi monopolari.

È una struttura che nell'HTS lavora molto bene, soprattutto perché la loro superficie va a ricoprire almeno il 50% di ogni pozzetto riducendo le differenze di misura da un pozzetto all'altro. [7]

A seconda delle applicazioni, sarà preferibile utilizzare microelettrodi monopolari o IDEs, valutandone aspetti positivi e negativi caso per caso.

Infine, vengono di seguito riportati vari modelli elettrici equivalenti sviluppati nel corso del tempo grazie all'analisi di impedenza, per descrivere l'interfaccia elettrodo-elettrolita.

Anzitutto, è possibile descrivere con uno stesso schema l'interfaccia tra elettrodo e soluzione senza trasferimento di materia nei casi di elettrodi idealmente polarizzabili e non polarizzabili, visti nella scorsa sezione. Lo schema in questione viene riportato in Figura 1.13, ed è il parallelo tra una resistenza ed un condensatore, elementi dati dal doppio strato di cariche e dal passaggio

di corrente attraverso l'elettrodo. In questo caso il sovrapotenziale  $\eta$  avrà come componente dominante il trasferimento elettronico.

Portando  $R \rightarrow 0$  si ottiene il modello per l'elettrodo non polarizzabile ideale, portando invece  $R \rightarrow \infty$  si ha l'elettrodo polarizzabile idealmente. Nella realtà avremmo soluzioni intermedie.

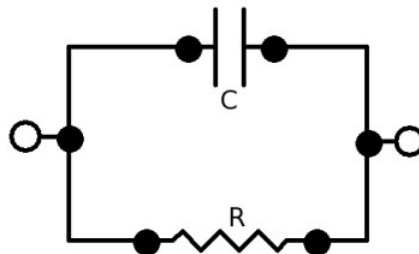


Figura 1.13 – Schema elettrico equivalente dell'interfaccia elettrodo-elettrolita (generico).

Tenendo conto anche della resistenza che genera l'elettrolita è possibile aggiungere una resistenza  $R_s$  in serie al circuito appena costruito, e considerando il potenziale di semi-cella dato dall'elettrodo mettervi in serie un generatore di tensione  $E_{hc}$ , come viene esposto nella Figura 1.14.

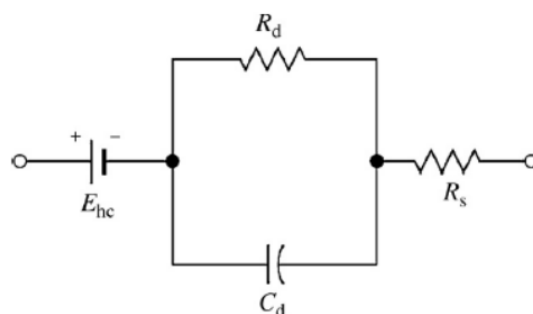


Figura 1.14 – Modello equivalente dell'interfaccia elettrodo-soluzione in presenza di potenziale di semi-cella e resistenza dell'elettrolita.

Omettendo il potenziale di semi-cella per semplicità, si può costruire un modello leggermente più complesso che tenga conto anche del trasferimento di carica (componente predominante del sovrapotenziale viene data dal trasferimento ionico) con l'aggiunta di una resistenza  $R_w$  (componente solamente reale).

Tuttavia, per descrivere efficacemente il contatto tra metallo e soluzione questo non basta, è necessario introdurre anche una componente immaginaria ( $Z_w$ ) per il trasferimento di materia: il famoso elemento di Warburg. Questo elemento andrà a sostituire la resistenza  $R_w$ , e viene in realtà abitualmente descritto da un parallelo tra la resistenza  $R_w$  e una capacità  $C_w$ .

Il modello in cui questo viene inserito è ancora oggi il più semplice ma efficace modello equivalente per descrivere l'interfaccia metallo/elettrolita, ed è definito modello di Randels.



È rappresentato da un circuito che, come riportato in Figura 1.15, amplia il modello equivalente precedente introducendo l'elemento di Warburg.

Molto spesso il doppio strato di cariche descritto dalla capacità  $C_{dl}$  può venire sostituito da un *constant phase element* (CPE), un elemento circuitale usato per mimare proprio un doppio strato di cariche (capacità imperfetta). [4], [7]

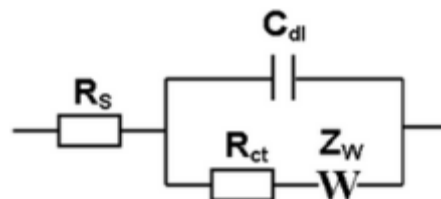


Figura 1.15 – Modello equivalente di Randles dell'interfaccia metallo-elettrolita.

Infine, il modello elettrico equivalente completo di un elettrodo a contatto con la pelle (nei tre casi di elettrodo *wet*, *dry* o con isolante) è già stato trattato nella precedente sezione parlando del principio di trasduzione utilizzato dagli elettrodi per biopotenziali, e se ne possono vedere gli schemi elettrici in Figura 1.6.

Nel presente elaborato verranno trattate matrici di microelettrodi *multi-purpose*, concentrando in particolare la trattazione (nella parte pratica) sulla simulazione e misurazione di PA e sull'applicazione della tecnica di spettroscopia d'impedenza.



## Capitolo 2: *Microelectrode array* (definizione, struttura e tipologie)

Nel presente capitolo si entrerà nel vivo della trattazione dando una definizione dei *MEAs* e, dopo una piccola parentesi storica, esponendone struttura generica e tipologie principali.

### 2.1 Definizione

Un *MEA* (*microelectrode array* o *multielectrode array*), in italiano matrice di microelettrodi, è un dispositivo di misura in miniatura formato da un substrato su cui si distribuiscono in maniera ordinata dei microelettrodi, spesso formando una griglia (da qui *array*), rendendo possibile la misura di segnali bioelettrici a livello cellulare e multicellulare. [10]

I *MEAs* sono strumenti particolarmente utili per la rilevazione di depolarizzazioni e polarizzazioni cellulari date dall'insorgenza di un potenziale d'azione, per l'elettrostimolazione di cellule elettricamente eccitabili, come possono essere le cellule nervose (neuroni), cardiache (miocardiociti) o muscolari (miociti), per la misura dell'impedenza cellulare ed altre tecniche di indagine della salute cellulare.

Tutte queste attività possono essere svolte anche dal medesimo strumento.

Negli ultimi anni sono stati utilizzati anche per lo studio di colture cellulari 3D.

### 2.2 Storia

Storicamente, la prima testimonianza dell'utilizzo di un *MEA* risale ad una cinquantina di anni fa, precisamente al 1972, quando C. A. Thomas Jr. e i suoi collaboratori pubblicarono il primo articolo che descriveva la struttura ed il funzionamento di un *rMEA* 2D (*MEA* rigido bidimensionale) per la registrazione dell'attività elettrica di cellule in coltura. L'*array* in questione prevedeva due righe da 15 elettrodi d'oro, placcati in platino per ridurre l'impedenza, isolati e installati tramite uno strato adesivo su un substrato di vetro. In Figura 2.1 è possibile distinguere le varie parti del primo *MEA* mai realizzato.

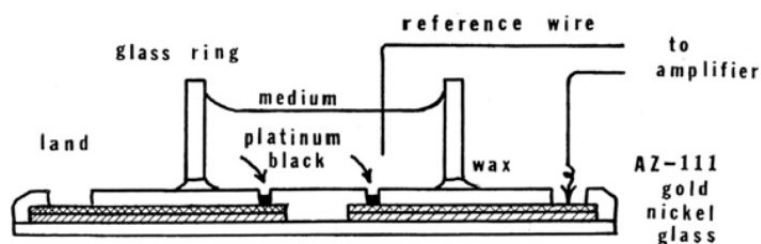


Figura 2.1 – Struttura del primo *MEA* di C. A. Thomas Jr.

Negli anni immediatamente successivi, partendo proprio dal modello introdotto da Thomas Jr., vennero utilizzati *array* di microelettrodi bidimensionali, costruiti a partire da substrati rigidi di vetro, silicio o successivamente vetro rivestito di ossido di indio-stagno, applicabili sia *in vitro* che *in vivo* (successivamente sostituiti da quelli flessibili per il danneggiamento dei tessuti che provocavano).

Tramite gli esperimenti fatti da Thomas su cellule neuronali di pulcino si scoprì che questo tipo di *array* era in grado di registrare un segnale solo per gruppi di cellule eccitabili abbastanza consistenti, e si dovette attendere sino al 1980 per avere le prime registrazioni di attività elettrica di singole cellule tramite MEAs.

Guenter Gross scoprì poi nel 1982 che l'ampiezza dei segnali registrati sia da singole cellule che da colture era dipendente dalla temperatura: scendendo infatti sotto i 30°C, fino a temperatura ambiente, l'intensità del segnale misurato diminuiva esponenzialmente.

Negli anni a venire (1986) Wheeler e Novak si occuparono della misurazione del potenziale di reti neuronali in ambito extracellulare ed i *rMEAs* furono nella ricerca prontamente sostituiti dai più versatili, sottili e meccanicamente adatti *fMEAs* (MEAs flessibili), per applicazioni sia *in vitro* che *in vivo*.

Questi ultimi venivano, e vengono ancora oggi, realizzati a partire da substrati in parilene, poliimmide, polidimetilsilossano (PDMS) o altri polimeri ibridi.

Dagli anni Novanta in poi, con la diffusione dei computer e la maggiore reperibilità delle componenti sia hardware che software per la costruzione di MEAs, molti più laboratori riuscirono ad introdurli in ambito di ricerca.

Vennero così sviluppate matrici per il monitoraggio *in vitro* del comportamento cellulare di cellule neuronali e cardiache, ma vennero anche sviluppati *array* per gli impianti *in vivo*, per il *mapping real-time* dell'attività cellulare e/o tissutale, per il monitoraggio di organi in attività e per testare trattamenti alternativi su cellule mirate (terapie termiche, ottiche o elettriche).

In questo periodo i MEAs planari vennero utilizzati per la prima volta nello studio di colture cellulari tridimensionali, non solo quindi per raccogliere informazioni da un singolo strato di cellule, anche se così facendo riuscivano a rilevare segnali solo dalle cellule immediatamente a contatto con gli elettrodi, ottenendo però più informazioni sul comportamento delle cellule in un tessuto.

Per ottenere informazioni più significative da una coltura tridimensionale vennero creati, qualche anno più tardi, i MEAs 3D (MEAs tridimensionali), che si sviluppavano anche nella terza dimensione e permettevano quindi di registrare l'attività elettrica in tutti e tre i piani

spaziali. Gli *array* di microelettrodi tridimensionali in questione erano sia rigidi che flessibili, entrambi applicabili anche in questo caso sia per studi *in vitro* che *in vivo*.

Negli ultimi anni la ricerca dei *MEAs* si concentra sul cercare di aumentare il rapporto segnale-rumore durante le registrazioni. Buoni risultati sono stati ottenuti a tal proposito provando nuovi materiali o composti per gli elettrodi tali da diminuirne l'impedenza, modificando la geometria degli elettrodi per far aderire meglio la membrana basale della cellula al substrato e modificando la superficie degli elettrodi per aumentarne l'area disponibile in modo da ridurne ulteriormente l'impedenza.[11]–[13]

### 2.3 Struttura generica

La struttura di un *MEA* può essere definita in gergo “a panino”: esso è normalmente formato da una sovrapposizione di più strati successivi, ottenuti tramite deposizione dello strato di materiale desiderato, fotolitografia, incisione e/o copertura isolante, ed in generale tramite uno dei processi di fabbricazione che verranno approfonditi in seguito.

Ad oggi esistono un'enormità di *MEAs* diversi, che si distinguono per applicazione, geometrie, tecniche e materiali di fabbricazione utilizzati e molto altro ancora.

Tutti presentano comunque degli elementi costitutivi caratteristici:

1. Un substrato, la parte più spessa dell'*array* (dell'ordine di qualche mm) su cui viene costruita tutta l'impalcatura che andrà a formare il nostro micro-sensore; per gli *rMEAs* è realizzato tipicamente in silicio o vetro mentre per i *fMEAs* è solitamente in PDMS o altri polimeri flessibili. (vedere il prossimo paragrafo per un approfondimento su *rMEAs* e *fMEAs*).
2. Un motivo metallico (*metal pattern*), che viene realizzato per deposizione e successiva fotolitografia e incisione, per *Ink-jet printing*, per stereolitografia e altre metodologie di fabbricazione che verranno trattate nel capitolo dedicato alla fabbricazione (Capitolo 3, Sezione 3.2).

È il componente che andrà a formare i veri e propri elettrodi, le linee di conduzione e le piastre di collegamento esterne, e può essere composto di un singolo metallo o più metalli sovrapposti e/o strati adesivi, il tutto per migliorare l'aderenza al substrato e la conduzione elettrica del segnale acquisito. Viene normalmente realizzato in oro, titanio, platino o altri materiali conduttivi (non solo metalli) a seconda delle necessità e delle tecnologie di realizzazione.

Molto spesso è composto da più strati ed elementi diversi, i principali sono:

- Metallo di adesione

- Metallo conduttore (per le linee di conduzione e le piastre di collegamento)
  - Metallo che forma i microelettrodi (ogni elettrodo ha dimensioni di 10 – 100  $\mu\text{m}$  ed è distanziato dagli altri da 30  $\mu\text{m}$  ad 1 mm per evitare interferenze durante l’acquisizione del segnale)
3. Uno strato isolante inerte che va a ricoprire le linee di conduzione tramite passivazione per evitare il più possibile l’attenuazione del segnale ed il cross-talk tra segnali acquisiti. Normalmente è uno strato realizzato in biossido di silicio, nitruro di silicio o ONO (composito  $\text{SiO}_2\text{-Si}_3\text{N}_4\text{-SiO}_2$ ).

Nella Figura 2.1 è riportato lo schema di un *array* esemplificativo, mentre nella 2.2 ne è apprezzabile la stratificazione.

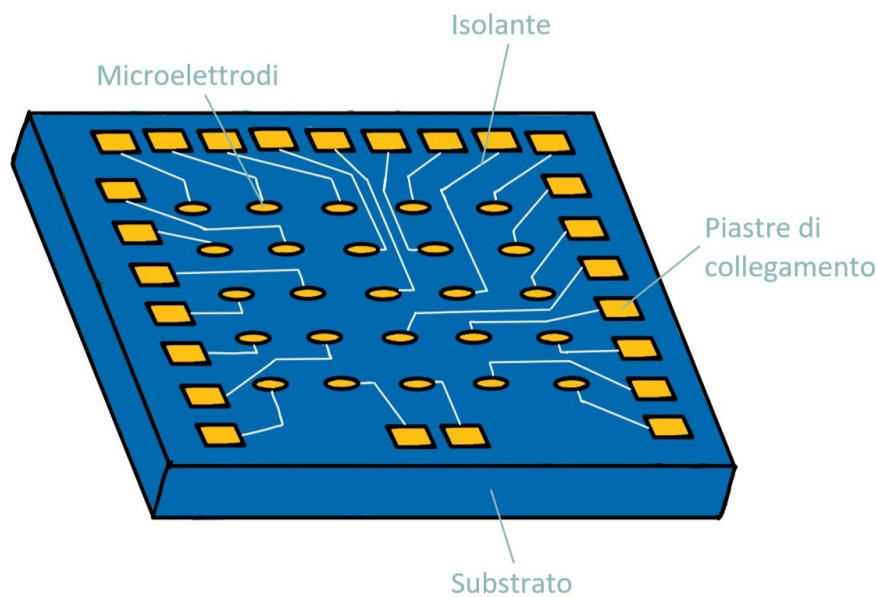


Figura 2.2 – Rappresentazione schematica di un *MEA* e delle sue componenti principali (visione dall’alto).



Figura 2.3 – Schema che illustra la stratificazione di un tipico *MEA*.

Esistono poi molte varianti di *MEAs* che aggiungono componenti, variano alcuni dei passaggi descritti o ne aggiungono degli altri; qualche caso specifico verrà trattato in seguito. [13], [14]

## 2.4 Tipologie di *MEAs*

Vi sono alcune importanti categorie di *MEAs* in cui le matrici possono essere suddivise, e nonostante in un singolo *MEA* sia possibile trovare caratteristiche comuni a più categorie, risulta comunque molto utile introdurle.

La prima distinzione riguarda il loro utilizzo: *array in vitro* e *array in vivo*.

Gli *array in vitro* vengono utilizzati a livello di laboratorio di ricerca per studiare il comportamento di cellule e colture cellulari in un ambiente controllato e sterile. A questo scopo possono essere utilizzate matrici commerciali che presentano dai 16 ai 256 elettrodi tipicamente realizzati in oro, platino, ossido di indio-stagno, nero di platino o nitruro di titanio, oppure possono venire realizzate dai ricercatori matrici ad hoc, con geometrie e materiali specifici per gli scopi del loro lavoro.

I *MEAs in vivo* sono invece impiantabili fisicamente nel corpo umano, e sono utilizzati sia in ambito di ricerca che come reali tecnologie di trattamento.

Gli *array* inseriti in un paziente sono quasi sempre realizzati in materiali flessibili (*fMEAs*, vedi tra poco), per permettere loro di muoversi e contrarsi contigualmente al tessuto su cui vengono applicati, in modo da non perdere aderenza (e quindi accoppiamento elettrico) o danneggiare il tessuto stesso (i *rMEAs* non vengono più utilizzati proprio per questi due motivi).

Per muscoli e cuore vengono utilizzate sia matrici flessibili planari che tridimensionali, mentre per la cura ed il monitoraggio della materia grigia vengono maggiormente utilizzate matrici flessibili tridimensionali, in grado di captare segnali a profondità diverse della retina neurale.

Ad oggi le matrici non solo sono flessibili, ma addirittura elastiche, caratteristica che permette di fare misurazioni anche sotto sforzi importanti, ad esempio permettendo monitoraggio continuo anche durante le contrazioni dei muscoli scheletrici e del muscolo cardiaco.

Esistono innumerevoli utilizzi nei quali sono stati impiegati i *MEAs in vivo*, per citarne alcuni: monitoraggio real-time dell'attività cardiaca su pazienti affetti da aritmie e cardiopatie (anche con sensori che integrano componenti come estensimetri in miniatura, vedi Figura 2.4), realizzazione di dispositivi bio-elettronici che, applicati attorno alla superficie del cuore, oltre a monitorarne l'ECG fungono anche da pacemaker (Choi et al., 2018), misurazione dell'elettrocorticografia (ECoG) e stimolazione ottica grazie a matrici increspate (Ji et al., 2019). [12], [15]



Figura 2.4 – Illustrazione schematica di un MEA flessibile ed elastico integrato con un estensimetro per la misurazione delle deformazioni cardiache.

Un'altra divisione molto importante per i *MEAs* si basa sulla natura del substrato su cui è costruito il sensore:

- *MEAs* rigidi (*rMEAs*), tipicamente realizzati in silicio o vetro, vengono principalmente utilizzati *in vitro* in quanto non adeguati alle applicazioni su tessuti molli. I primi *MEA* erano tutti realizzati su substrati rigidi con la tecnica della fotolitografia;
- *MEAs* flessibili (*fMEAs*), tipicamente realizzati in materiali polimerici flessibili, il più famoso dei quali è il PDMS (polidimetilossano), vengono applicati sia *in vitro* che *in vivo* e sono in grande ascesa.

Considerando invece la distribuzione spaziale degli elettrodi si hanno:

- *2D-MEAs*, in cui gli elettrodi si sviluppano lungo due direzioni spaziali (su un piano);
- *3D-MEAs*, in cui gli elettrodi si sviluppano in tutte e tre le direzioni spaziali (tridimensionalmente), che stanno sempre più andando a sostituire gli *array* planari per impedenza minore e maggiore sensibilità, oltre che migliore risoluzione spaziale.

In base alla tecnica di misura sfruttata si trovano invece:

- *Action potential monitoring MEAs*;
- *Impedance based analysis MEAs*.

Spesso uno stesso sensore può integrare entrambe le tecniche di analisi.

Ed infine, a seconda della vicinanza degli elettrodi data dall'utilizzo o meno di transistor:

- *Standard MEAs*: normali *MEAs* con struttura descritta in precedenza;
- *High-Density (HD-MEAs)* o *Ultra High-Density CMOS – type MEAs (UHD-MEAs)*, *array* che, grazie alla presenza dei circuiti integrati sottostanti, consentono di realizzare migliaia di elettrodi a distanza ravvicinata su un singolo substrato, in grado



sia di ricevere che indurre il segnale e che garantiscono maggiore risoluzione spaziale e temporale. [7], [15]

## 2.5 Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dei *MEAs*

Grazie all'enorme sviluppo delle tecnologie di fabbricazione e di condizionamento elettronico osservate negli ultimi decenni, l'utilizzo dei microelectrode *array* risulta spesso preferibile rispetto ad altri sensori presenti sul mercato, per ragioni che spaziano dalle caratteristiche geometriche e morfologiche a quelle più propriamente di performance elettroniche.

Tra i vantaggi dell'uso dei *MEAs* vi sono:

- La possibilità di effettuare misurazioni indirette, data dalla natura non invasiva del sensore. I *MEAs* sono infatti sensori extracellulari, che permettono di percepire le variazioni di concentrazione ionica sulla membrana cellulare (il passaggio di potenziali d'azione) in maniera indiretta, secondo il meccanismo spiegato approfonditamente nel Capitolo 1 – Premesse. Questa caratteristica è di vitale importanza soprattutto nelle applicazioni *in vivo* dove è essenziale non nuocere al paziente, motivo per cui molte altre tecnologie più invasive non vengono applicate permanentemente al paziente.
- La capacità di misurare e/o stimolare colonie cellulari, non solo singole cellule. È infatti possibile ricavare informazioni utili su intere colonie ed addirittura tessuti grazie all'utilizzo di *array* planari e, grazie allo sviluppo delle matrici tridimensionali, è stato possibile persino studiare approfonditamente reti neurali e aggregati di cellule muscolo-scheletriche per valutarne la funzionalità tissutale.
- L'impiantabilità. Essendo non invasivi e realizzabili in materiali flessibili ed elastici si prestano (come già visto) benissimo all'utilizzo *in vivo*.
- La possibilità di fare registrazioni e stimolazioni di lunga durata. Questo è dovuto sia alla loro non invasività, sia alla loro stabilità: confrontati infatti con la tecnica del patch-clamp, ad esempio, risulta chiaro come inserire un ago in una cellula porti a registrazioni molto più brevi (perdita di liquido cellulare, rottura membrana per troppa pressione o movimenti ecc.) di quelle che si potrebbero avere semplicemente appoggiando la cellula su una superficie inerte (*MEA*).
- L'abilità di acquisire più segnali contemporaneamente, dati i molteplici elettrodi. Essendo presenti anche centinaia di elettrodi, con le attrezzature adeguate è

possibile captare moltissimi segnali allo stesso tempo, utile per la misura di attività in coltura.

Ovviamente, nonostante per specifiche applicazioni i *MEA* rimangano la scelta più adeguata, esistono alcuni casi in cui essi non rappresentano la migliore scelta, a causa per esempio di richieste stringenti in termini di qualità del segnale oppure in caso di particolari cellule target.

Tra gli svantaggi principali legati all'utilizzo dei *MEAs* si ricordano infatti:

- Minor qualità del segnale rispetto alle alternative più invasive. Essendo sensori non invasivi viene sacrificata la qualità del segnale raccolto per poter agire senza nuocere alle cellule.
- Non adeguati alla misura di cellule in via di sviluppo, per le quali è preferibile utilizzare la microscopia ottica. Vengono infatti analizzate principalmente cellule già mature.
- Complicata gestione del SNR e quindi della qualità del segnale (impedenza tende ad aumentare). Deve esserci infatti una buona aderenza tra substrato e cellula in ogni momento (motivo per cui spesso i substrati vengono funzionalizzati, vedi Capitolo 4 – *surface - micropatterned MEAs*) per garantire bassa impedenza, alto rapporto segnale-rumore e una maggiore qualità del segnale. Questi sono i problemi su cui ad oggi si sta lavorando maggiormente in ambito di ricerca. [10], [13]

## Capitolo 3: Realizzazione di un MEA

Come già visto, esistono *MEAs* delle più svariate tipologie che vengono prodotti con altrettante tecniche differenti.

In generale, tutti i *MEAs* condividono alcune fasi di realizzazione:

1. Progettazione e scelta dei materiali realizzativi
2. Fabbricazione
3. Copertura isolante e apertura dell'isolante

In questo capitolo verranno approfonditi singolarmente i vari step che consentono di realizzare un *MEA*.

### 3.1 Scelta del substrato e dei materiali realizzativi

Nella realizzazione di un *MEA* la progettazione è una fase essenziale, forse la più importante dell'intero processo, che definisce la strada da percorrere per ottenere il sensore desiderato.

Appurato che il *MEA* sia il miglior sensore possibile per la nostra applicazione, per scegliere la sua conformazione finale si rende necessario tenere conto di svariati fattori:

- Scopo del *MEA*  
Identificare l'obiettivo per il quale viene realizzato l'*array* di microelettrodi è essenziale per poter determinare i materiali e le tecniche più adeguate alla fabbricazione delle varie componenti, e nel farlo devono essere considerate anche biocompatibilità, necessità di impedire o facilitare la conduzione elettrica nei vari elementi, durabilità, flessibilità e molte altre caratteristiche [14].
- Tecnica di fabbricazione  
A seconda della tecnologia di fabbricazione scelta variano molto materiali utilizzabili e risultati ottenibili; ad esempio, un *MEA* realizzato con la tecnologia di fabbricazione VLSI (*very large scale integration*) avrà una densità di elettrodo e quindi una risoluzione spaziale molto maggiore di un *MEA* realizzato con la tipica tecnica fotolitografica.
- Costi di realizzazione  
Materiali e procedure diverse avranno un impatto economico diverso tra loro, ed è necessario per questo essere consci del budget disponibile durante la scelta.
- Tempi di realizzazione  
È importante tenere conto anche del tempo che alcune tecniche impiegano nella fabbricazione per avere il sensore pronto entro gli eventuali termini prefissati.

Ad oggi i substrati per *rMEAs* vengono scelti principalmente in silicio, vetro e materiali affini, ma anche materiali ceramici, mentre per *fMEAs* vengono utilizzati substrati in PDMS e altri polimeri flessibili (parilene, poliimmide, ecc.).

Le tracce, gli elettrodi metallici e le piastre di contatto con l'esterno (*metal pattern*) sono invece normalmente realizzati al di sopra del substrato scelto in inchiostri conduttivi o in metalli come l'oro, il platino, l'ossido di indio-stagno (ITO), l'argento ed il nitrato di titanio (TiN), tramite una delle tecniche di fabbricazione che verranno approfondite nella prossima sezione. La parte destinata agli elettrodi viene spesso ricoperta di particolari materiali resistivi (vedi ultima parte Sezione 3.2) in grado di aumentare la conduttività e ridurre l'impedenza degli elettrodi, ottenendo così segnali di qualità migliore. [14]

### 3.2 Fabbricazione

La realizzazione della geometria degli elementi metallici è un altro step essenziale della creazione di un *MEA*, e può avvenire tramite tecniche anche molto diverse. Si ricorda inoltre che, essendo i *MEA* sensori miniaturizzati, le tecniche di realizzazione sono specifiche per lavorazioni micrometriche.

Di seguito verranno elencate le principali soluzioni tra cui è possibile scegliere per la fabbricazione di un *MEA*.

a. Fotolitografia (*photolithography*)

La fotolitografia è una tecnica proveniente dal *surface micromachining* di circuiti integrati, microchip e MEMS. È la tradizionale tecnica di microfabbricazione di *MEAs* sia in 2D che 3D in quanto molto versatile, ed è stata la prima in assoluto ad essere utilizzata data la possibilità di riutilizzare macchinari usati per la produzione di micro-macchine e microchips.

Vi sono svariate varianti di questa tecnica, le cui più diffuse sono la litografia ottica e la litografia UV (tecniche top-down). [13]

Il processo di fotolitografia è tuttavia preceduto dalla posa di un sottile strato del metallo scelto sul substrato di vetro o silicio tramite *sputtering*, evaporazione termica o evaporazione a fascio di luce (*ebeam*).

Fatto questo, la fotolitografia si basa sull'utilizzo di raggi ottici o UV che, colpendo un *fotorezist* protetto da fotomaschera, andranno a creare il pattern desiderato. È importante distinguere tra *fotorezist* positivi e negativi: i positivi vengono resi più solubili dall'esposizione alla luce, mentre i negativi vengono induriti (polimerizzati) tramite l'esposizione ai raggi ottici/UV (*patterning* sottrattivo o additivo).

La fotolitografia è per questo un processo molto versatile, che permette di sfruttare a proprio piacimento l'uso dei diversi *fotorezist* per la creazione dei pattern. Alcuni esempi di utilizzo di *fotorezist* positivo e negativo sono riportati nelle Figure 3.1 e 3.2.

È importante ricordare che, oltre all'esposizione ai raggi, per il completamento dei sensori sono necessarie operazioni successive (deposizione, incisione, impiantazione o crescita) e che i *fotorezist* devono venire rimossi tramite *etch-back* (il metal pattern si forma sotto il *fotorezist*, il quale viene rimosso dopo la fotoesposizione e l'*etching*) o *lift-off* (la deposizione dello strato di metallo avviene sopra il *fotorezist* e la fotomaschera usata presenta l'opposto del *pattern* desiderato; dopo la fotoesposizione ed il lavaggio, sollevando il *fotorezist* rimane la *pattern* corretta) se necessario.

Infine, viene normalmente svolto un *hard-baking* per indurire il *fotorezist* rimasto e migliorarne l'adesione al substrato.

Per i *MEAs* 3D la tecnica della fotolitografia/incisione viene comunque utilizzata, ripetendo il procedimento per svariati livelli, creando così strutture tridimensionali. [13], [16]

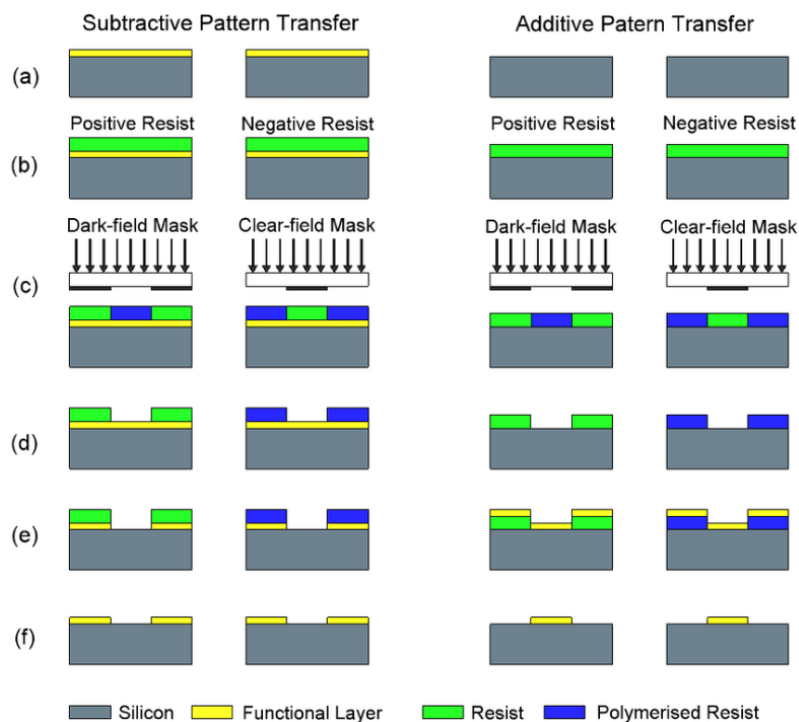


Figura 3.1 – Esempi di *patterning* sottrattivo (a sinistra) e additivo (a destra).

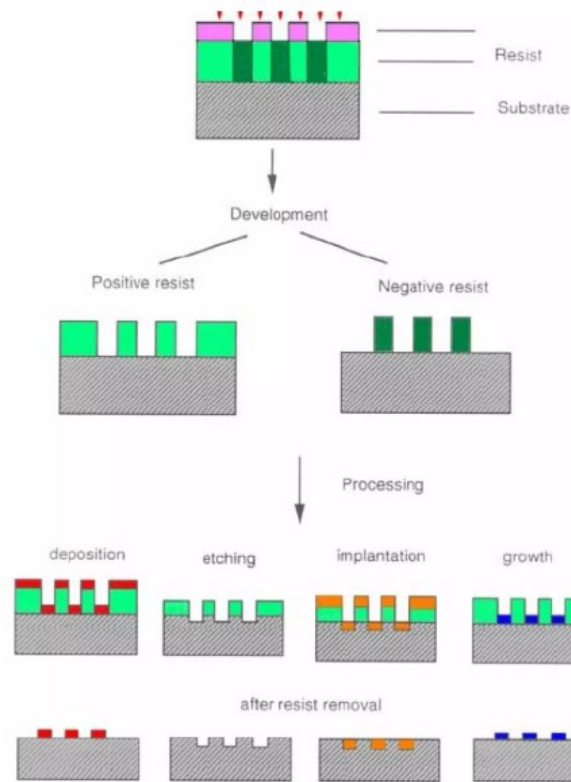


Figura 3.2 – Altri esempi di *patterning* sottrattivo ed additivo.

b. Modellazione e ablazione laser (*laser patterning and ablation*)

Utilizzata per la realizzazione di *MEAs* sia planari che tridimensionali, la modellazione/ablazione laser è un'alternativa molto più rapida, flessibile ed economica al processo di fotolitografia.

È una tecnica particolarmente utilizzata negli ultimi anni per realizzare *MEAs* in ITO (ossido di indio-stagno), un ossido trasparente conduttivo molto utilizzato nella realizzazione di *pads* e linee di conduzione, che gode di buone proprietà ottiche ed elettroniche.

Ad oggi sul mercato sono disponibili diverse tipologie di *laser patterning* (LDP – *laser digital patterning*, PLD – *pulsed laser deposition*, ecc.), ma il più utilizzato per versatilità, efficienza e riduzione dei costi è il laser a CO<sub>2</sub> (anche se non permette lavori di precisione micrometrica).

Il generico processo di realizzazione di un *MEA* per ablazione laser consiste nell'avere un macchinario che punta un raggio laser fisso direttamente sul materiale conduttivo depositato sul substrato e, seguendo un modello specifico, rimuove lentamente le parti indesiderate del materiale per lasciare solamente il design scelto, con danni irrilevanti. Viene riportata in Figura 3.3 una rapida schematizzazione del processo. [13], [17]

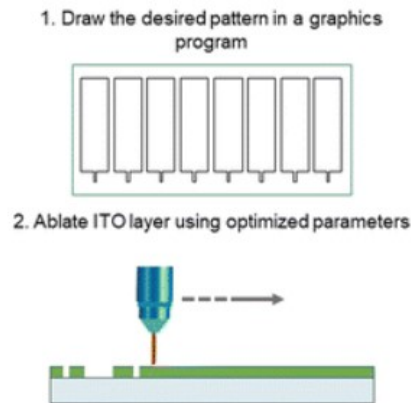


Figura 3.3 – Ablazione laser di uno strato di ITO seguendo un modello.

c. Stampa serigrafica (*screen printing*)

La stampa serigrafica è un metodo alternativo alla fotolitografia per la realizzazione di *MEAs*, in particolare *fMEAs*. È una tecnica molto affidabile che permette di lavorare su un'ampia area con alta resa, di garantire semplicità e versatilità (molti inchiostri diversi) di realizzazione, leggerezza ed economicità del sensore. [18]

Questa tecnica consiste nell'utilizzo di una *screen printer* (stampante serigrafica), una particolare tipologia di stampante che procede in vari step: prima dispone una maschera (stencil) sulla superficie del substrato (spesso flessibile), dopodiché si occupa di versare una pasta o un inchiostro conduttivo (il componente principale del *metal pattern*) al di sopra dello stencil, per poi distribuirlo. Infine, rimuovendo lo stencil, sul substrato rimarrà solamente il pattern desiderato. In Figura 3.4 si riportano i vari step appena elencati.

Prima di poter essere utilizzato il *MEA* deve normalmente venire curato ad alte temperature per permettere all'inchiostro di indurirsi e diventare conduttivo. [13]

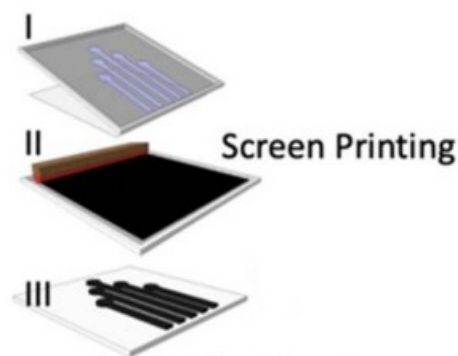


Figura 3.4 – Stampa serigrafica di un *MEA* in vari step: I posa dello stencil, II distribuzione dell'inchiostro, III rimozione dello stencil e realizzazione del motivo metallico.

d. Lavorazione a scarica elettrica o elettroerosione (*electrical discharge machining* – EDM)

La tecnica dell'EDM consiste nell'utilizzare una scarica elettrica o una scintilla per rimuovere il metallo depositato sul substrato scelto e plasmare così il motivo metallico, un po' come avveniva con l'ablazione laser, ma in maniera più disordinata.

Nonostante sia una tecnica molto efficiente, non è per niente accurata ed ha bassa precisione di realizzazione, oltre ad alta usura degli utensili. Per questo è relativamente poco utilizzata e, se viene scelta, viene solitamente accompagnata da altre tecniche per completare la formazione dell'elettrodo.

In anni recenti sono stati fatti studi per migliorarne la precisione e diminuire l'usura degli strumenti, ad esempio usando la tecnica LS-WEDM (*low speed wire electrical discharge machining*) combinata con modelli di alimentazione ottimizzati, o anche integrando la EDM originale con galvanizzazione e ablazione laser. [13], [19]

e. Stereolitografia (*stereolithography*)

In generale, la stereolitografia (SLA) è una tecnica di stampa 3D che permette di realizzare oggetti tridimensionali con speciali resine UV, partendo da un modello digitale. Questa tecnica è stata applicata negli ultimi anni anche a livello microscopico (3D-mSLA e 3D- $\mu$ SLA) per la realizzazione di microelettrodi tridimensionali, ed ha il potenziale per diventare uno standard nella produzione di 3D *MEAs* altamente sensibili e riproducibili, battendo le tradizionali tecniche di fotolitografia in velocità, personalizzabilità, semplicità e costi. [13]

f. Tecnica dei semiconduttori complementari a ossidi metallici (*complementary metal oxide semiconductor* – CMOS – technique)

Questa tecnica è utilizzata per realizzare i CMOS-type *MEAs*, che possono essere HD (*high density*) *MEAs* o addirittura UHD (*ultra-high density*) *MEAs*, così denominati poiché la tecnica di fabbricazione in questione garantisce, a parità di dimensione del substrato, la presenza di un numero molto maggiore di elettrodi ravvicinati (16-32  $\mu$ m) rispetto agli *MEAs* realizzati con altre tecnologie (grazie all'utilizzo dei transistor). Nella Figura 3.7 è possibile confrontare un CMOS-type *MEA* ed uno standard *MEA* con le rispettive scale.



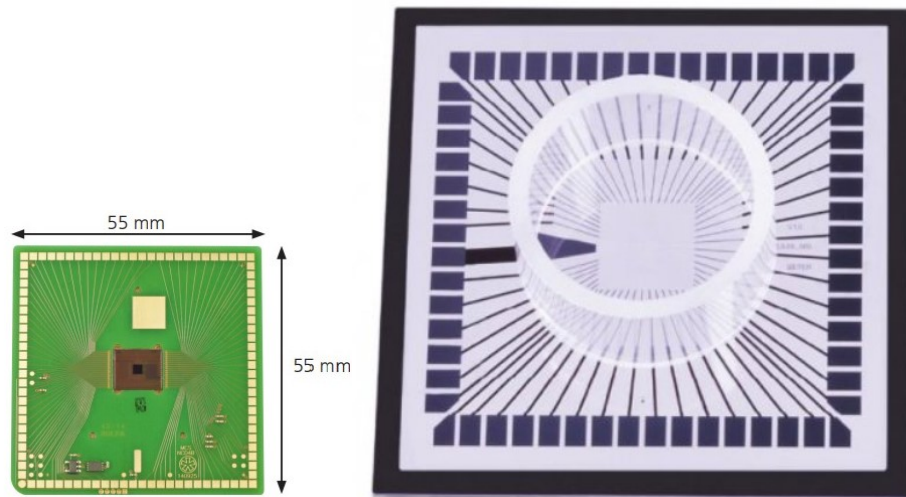


Figura 3.5 – A sinistra un CMOS MEA da 4225 elettrodi da registrazione e 1024 elettrodi da stimolazione, spaziati tra loro 16  $\mu\text{m}$ . A destra invece un MEA standard da 60 elettrodi, spaziati tra loro 200  $\mu\text{m}$ .

Questa tecnica di fabbricazione si basa sulla realizzazione della tecnologia CMOS (riportata in Figura 3.6), che incorpora in uno stesso circuito integrato coppie simmetriche di PMOS ed NMOS, garantendo maggiore flessibilità di progettazione del circuito, minore complessità e riducendo il rumore.

PMOS ed NMOS sono due tipi di MOSFETs (transistor a effetto di campo basati su semiconduttori di ossido metallico), interruttori o amplificatori che grazie al materiale semiconduttore in cui sono fabbricati riescono a condurre elettricità tra source e drain solo se viene superata una certa tensione di soglia tra gate e source. [20]

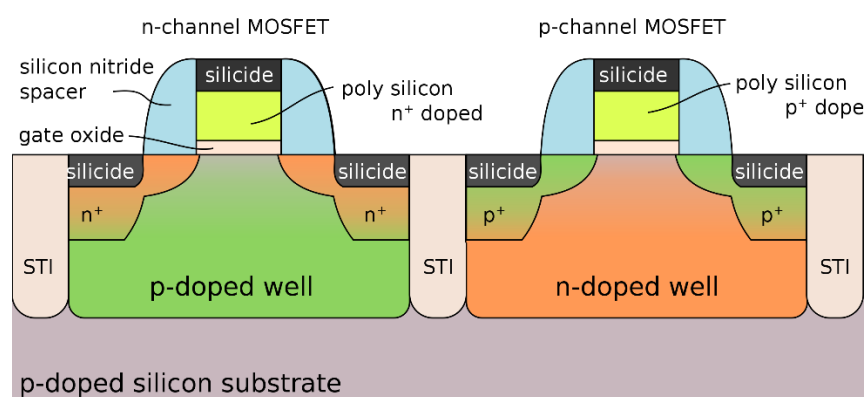


Figura 3.6 – Schema e composizione di un CMOS (PMOS a destra, NMOS a sinistra).

L'applicazione di questa tecnologia agli MEAs ha permesso un aumento esponenziale della risoluzione spatio-temporale delle registrazioni acquisite, permettendo oltre ad una maggiore precisione nella lettura dei potenziali d'azione di singole cellule, anche una

migliore interpretazione delle attività di colture cellulari ed addirittura tessuti, campi in cui vengono tipicamente molto utilizzati.

Ad oggi la fabbricazione di questo tipo di *MEA*, in particolare gli HD e UHD, utilizza la tecnologia VLSI (*very large scale integration*), che integra milioni di elementi circuitali su un singolo chip di silicio.

La realizzazione di un tipico HD/UHD *CMOS MEA* si divide in due fasi:

1. Fabbricazione di circuiti tramite VLSI su chip, di competenza di un servizio di fonderia commerciale che realizza la circuiteria includendo spesso nel substrato un amplificatore, un filtro, un ADC, un multiplexer e i circuiti digitali necessari; viene lasciato lo spazio per l'*MEA* che verrà applicato nella post-elaborazione;
2. Fabbricazione dell'*array* di microelettrodi (post-elaborazione), in cui i microelettrodi vengono fabbricati a distanze micrometriche e le linee di conduzione passivate.

Come si è capito, la tecnologia *CMOS* non viene utilizzata solo nella realizzazione di *MEAs*, ma anche per la maggior parte dei circuiti integrati sul mercato. [13], [14]

g. Stampa a getto d'inchiostro (*Ink-jet printing*)

La stampa a getto d'inchiostro è una particolare tecnica di fabbricazione additiva che si propone come alternativa alla fotolitografia che, per quanto abbia risoluzione maggiore della stampa *Ink-jet* (anche se comunque si riescono a costruire pattern micrometriche abbastanza complesse), risulta molto meno versatile sia in termini di materiali utilizzabili che di *pattern* realizzabili. [13], [21]

Essa permette la deposizione in fase liquida dei materiali desiderati sul substrato scelto, partendo da modelli digitalizzati invece di utilizzare stampi e fotomaschere.

La stampa inkjet può avvenire tramite due modalità:

- la stampa a flusso continuo (CIJ: *Continuous Ink-jet*);
- la stampa *Drop-On-Demand* (DOD), sfruttata da stampanti piezoelettriche, elettrostatiche e termiche.

Nelle Figure 3.7 e 3.8 viene esposto il funzionamento di entrambe le tecniche.

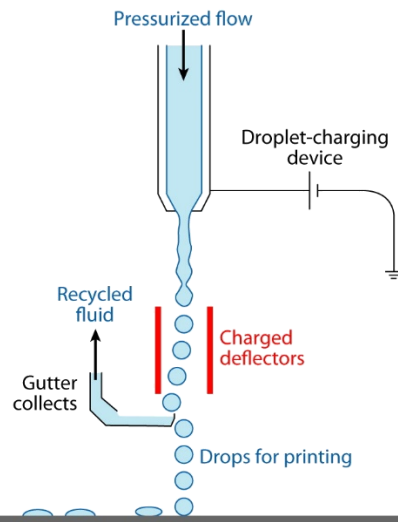


Figura 3.7 – Esempio di stampa *Ink-jet* CIJ.

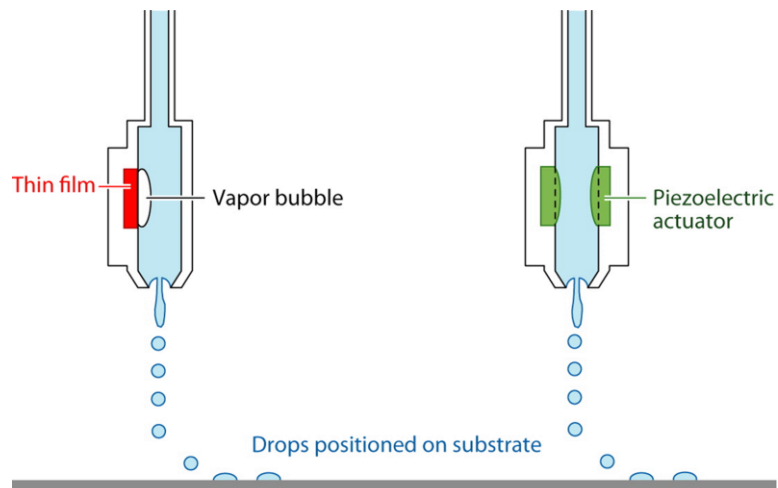


Figura 3.8 – Due tipologie di stampa *Ink-jet* DOD.

I tipici microelettrodi metallici vengono così sostituiti con microelettrodi stampati composti di inchiostro conduttivo (come il PEDOT:PSS o gli inchiostri a nanoparticelle d'argento, di carbonio ecc., che spesso sono dei conduttori migliori anche dei metalli), così come le piastre di contatto e le tracce.

Questa tipologia di stampa di *MEA* garantisce alta velocità di fabbricazione, produzione in presenza di gas inerte, realizzazione di elettrodi a basse temperature, in poco tempo e soprattutto a basso costo. Inoltre, permette la creazione di *MEA* flessibili e leggeri. [13], [22], [23]

#### h. *Aerosol-jet printing (AJP)*

Inventata alla fine degli anni Novanta, l'*Aerosol-jet printing* è una tecnica di stampa contactless innovativa e molto valida. In figura 3.9 è possibile vedere un generale schema dell'processo AJP.

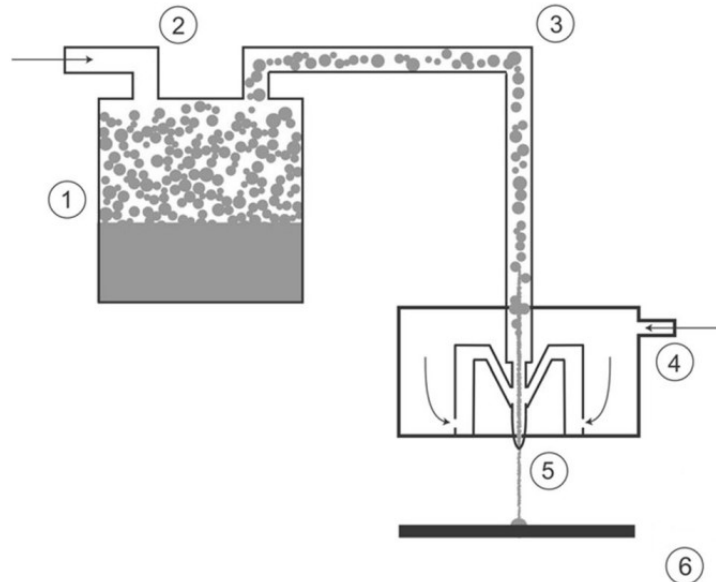


Figura 3.9 – Schema generale della stampa Aerosol: (1) generazione dell'aerosol tramite atomizzazione ultrasonica o pneumatica, (2) introduzione di un gas vettore per il trasporto dell'aerosol, (3) trasporto, (4) messa a fuoco, (5) deposizione e (6) traslazione computerizzata del substrato.

Essa consiste nella deposizione di materiali tramite un flusso continuo e stabile di particelle atomizzate sul substrato scelto, una tecnica rivoluzionaria in quanto rende possibile la stampa su moltissime basi diverse, risultando particolarmente vantaggiosa per la possibilità di lavorare su substrati irregolari o di creare 3D *MEAs* con una stampante non 3D (risultato impossibile da ottenere con l'*Ink-Jet printing*).

Essa ha minori restrizioni per quanto riguarda la viscosità dell'inchiostro utilizzato rispetto alle altre tipologie di stampa e consente di produrre *pattern* a risoluzione molto alta (10 micron) e con grande complessità geometrica rispetto anche alle tecniche tradizionali.

Inoltre, rende possibile la stampa con una grande varietà di materiali (proprio per le minori restrizioni sulla viscosità degli inchiostri) e rende possibile orientare e distanziare a piacimento la stampa.

Tutte queste caratteristiche garantiscono alla stampa *Aerosol* un grande vantaggio teorico contro le altre tecniche di stampa presenti sul mercato, che però non si riflette nella pratica: ad oggi rimane infatti una tecnica poco sfruttata a causa della sua recente nascita e del poco studio e sviluppo che le è stato dedicato. [13], [24]–[26].

### 3.3 Passivazione degli elettrodi

Una volta realizzato il *metal pattern*, per evitare la decomposizione sotto attacco ionico del metallo in soluzione, risulta necessaria la passivazione delle linee di conduzione tramite un isolante inerte, che per essere considerato efficace deve inoltre evitare il più possibile l'attenuazione ed il cross-talk tra segnali.

La passivazione delle linee di conduzione può avvenire sfruttando tecniche tradizionali, e ricorrendo quindi a due passaggi successivi: il primo consiste nella stesura dell'isolante ed il secondo nella sua apertura.

Questo può avvenire depositando del materiale isolante come il biossido di silicio, il nitruro di silicio o l'ONO (composito  $\text{SiO}_2\text{-Si}_3\text{N}_4\text{-SiO}_2$ ) tramite la CVD (*chemical vapor deposition*), che può essere a bassa pressione o potenziata dal plasma, e realizza strati isolanti di spessore 500-3000 nm. Per ottenere strati più spessi (2-5  $\mu\text{m}$ ) si utilizzano isolanti polimerici come la resina polisilossanica, il poliimmide, l'immide acrilica, il parilene e il polidimetilossano (PDMS), materiali utilizzati anche nella fabbricazione del substrato costruttivo dei *fMEAs*.

Infine, per creare delle aperture nell'isolante in corrispondenza dei microelettrodi e delle piastre di contatto in modo da rendere l'elettrodo funzionante, negli anni sono state sviluppate svariate tecniche a seconda del materiale utilizzato.

In generale, viene utilizzata la fotolitografia per segnalare le zone da rimuovere e successivamente viene fatta l'incisione con una delle seguenti:

- a. Soluzione tampone di acido fluoridrico per incidere il  $\text{SiO}_2$ .
- b.  $\text{SF}_6$  e ioni fluoro per incidere reattivamente il  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .
- c.  $\text{CF}_4$  e  $\text{CHF}_3$  realizzano incisione reattiva nello strato ONO.
- d. Esposizione ai raggi UV e sviluppo per incidere polimeri fotosensibili come il SU-8.
- e. Plasma di ossigeno per incisione di poliimmide e parilene.
- f. Per il PDMS è stato utilizzato un processo di sollevamento di SU-8.

In alternativa, oggi è possibile passivare le linee di conduzione utilizzando tecniche di *addictive manufacturing*, che si basano sulla stampa (*Ink-jet*, *Aerosol* ecc.) dello strato isolante direttamente dove serve, grazie ad un file CAD su cui vengono indicate le zone predefinite di stampa.

Così il processo di passivazione si semplifica molto e, grazie all'utilizzo di inchiostri isolanti, è possibile ottenere in un solo passaggio un *MEA* che non risente della corrosione ionica.

Per riassumere, viene riportato in Figura 3.10 il work-flow da seguire per realizzare un *MEA*. [13], [14]

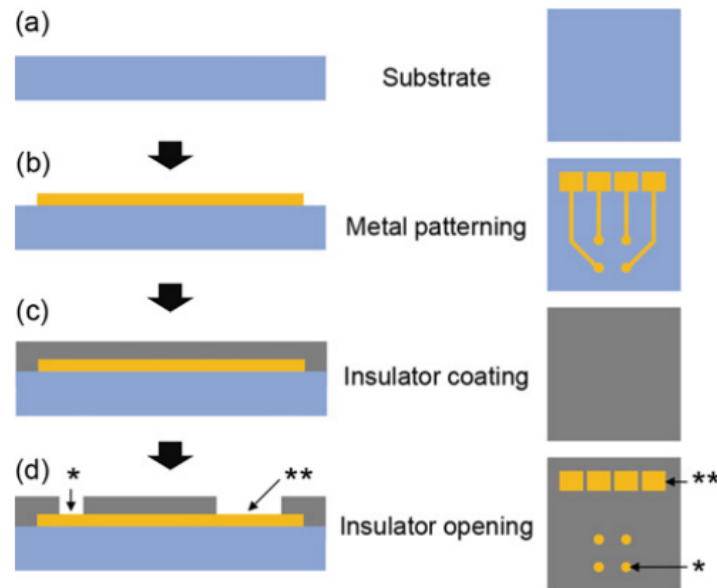


Figura 3.10 – Processo realizzativo di un *MEA*.

Infine, possono esserci due step aggiuntivi:

- Il *packaging*, che consiste nell'installazione del *MEA* appena realizzato su di una scheda che funge da adattatore e che permette la presenza ed il lavoro di più *array* contemporaneamente.
- L'aggiunta di camere di coltura, anelli in vetro o teflon in grado di contenere il mezzo di coltura cellulare. Questi devono essere attaccati saldamente al substrato per prevenire la perdita di materiale e devono venire ricoperti da una membrana trasparente in FEP (*fluorinated ethylene-propylene*) permeabile ai gas ma impermeabile all'acqua, per evitare l'evaporazione del citosol.

### 3.4 Tecniche per aumentare l'area di elettrodo

I microelettrodi di un *MEA* hanno una dimensione variabile tra i 5 ed i 100  $\mu\text{m}$  di diametro, e sviluppano quindi un'area troppo piccola per garantire all'interfaccia un'impedenza sufficientemente bassa; per questo motivo la loro superficie viene spesso modificata con materiali conduttivi in grado di aumentare l'area totale dell'elettrodo e diminuirne così l'impedenza.

I materiali e le tecniche utilizzate per diminuire l'impedenza di elettrodo sono stati principalmente:

- Deposizione elettrochimica di platino (*platinum black*) sugli elettrodi in grado di creare nanostrutture porose (*nanoporous platinum* – vedi Figura 3.11 (a)) che diminuiscono efficacemente l'impedenza, essendo però meccanicamente non resistenti e facilmente

danneggiabili durante l'utilizzo. Questo problema è stato recentemente risolto da Chung et al. che, con una soluzione di platino elettro-depositata, ottenne una struttura porosa resistente anche al diamante.

- Deposizione elettrochimica di oro per creare:
  - *Gold nanoflakes* (vedi Figura 3.11 (b))
  - *Gold nanograins* (vedi Figura 3.11 (c))
  - *Fuzzy gold structures*

Anche non formando nanostrutture porose (come nel caso del platino), questa tecnica genera superfici ruvide che aumentano molto la superficie e quindi l'impedenza.

Queste hanno il vantaggio di essere meccanicamente più resistenti delle nano-coperture porose in platino standard.

- Creazione di microelettrodi a nano-cavità, microelettrodi con piccola apertura e grande superficie in oro su cui viene poi depositato TiN tramite *sputtering* reattivo in atmosfera di argon/azoto, con formazione di piccole strutture colonnari a livello nanometrico in grado di ridurre di molto l'impedenza.
- Deposizione chimica a vapore (CVD – *chemical vapor deposition*), elettrodeposizione e/o stampa a micro-contatto per la formazione di nanotubi in carbonio (CNTs – *carbon nanotubes* – vedi Figura 3.11 (d)). È possibile catalizzare la crescita dei CNTs su elettrodi in nitrato di titanio tramite uno strato di nickel o di ferro, aumentando così la rugosità ed ottenendo un SNR migliore.
- Polimeri conduttivi come il poli(3,4-etilenediossiofene) (PEDOT) ed il polipirrolo garantiscono una bassa impedenza, rumore di fondo ridotto e una piattaforma versatile per l'aggiunta di vari materiali.
- CNTs, grafene e biomolecole possono essere fuse in strutture polimeriche conduttive utilizzate per migliorare la qualità di registrazione del segnale e aumentare la capacità di iniezione di carica.
- Nanofili conduttivi (in Figura 3.11 (e)) sono stati aggiunti alla superficie dei microelettrodi per controllare l'interfaccia elettrodo-membrana, sfruttando l'effetto di penetrazione di cellula garantito dai nanofili ed aumentando così l'SNR.
- Creazione sulla superficie dei microelettrodi di nanopilastrini in platino e nanotubi in ossido di iridio (vedi Figura 3.11 (f)) per garantire alto SNR e aumentare il tempo di registrazione del segnale.

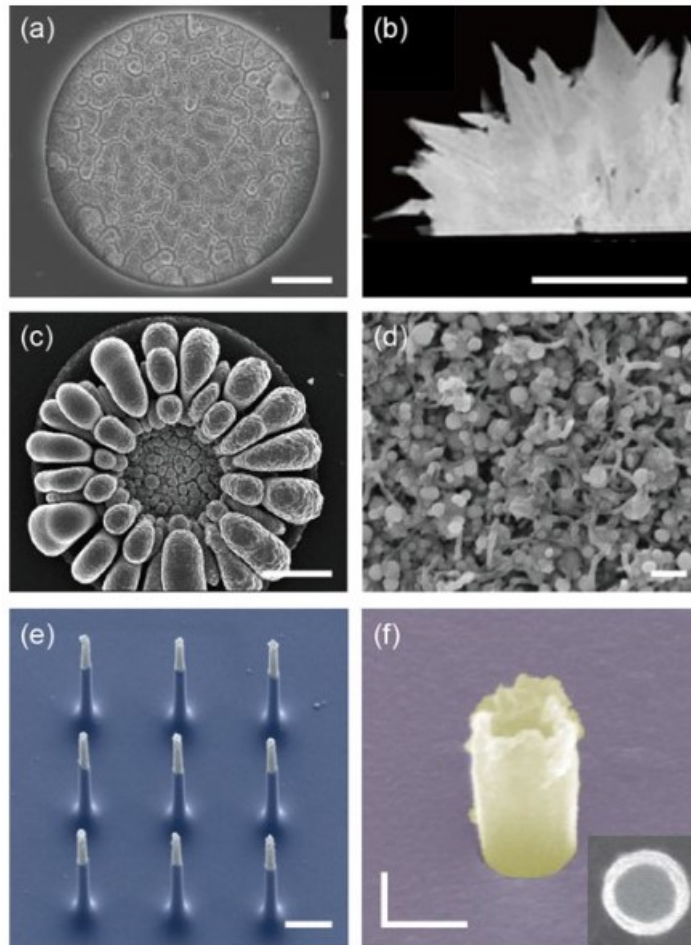


Figura 3.11 – Nanostrutture utilizzate per diminuire l'impedenza aumentando l'area totale. (a) platino nanoporoso, (b) *nanoflake* d'oro, (c) *nanograin* d'oro, (d) nanotubi di carbonio (CNT), (e) nanofili di silicio, (f) nanotubo di ossido d'iridio.



## Capitolo 4: Geometrie più utilizzate

Dopo aver visto cosa sono e come vengono realizzati i *MEAs*, in questo capitolo si darà una panoramica generale sui design più utilizzati nel settore di analisi cellulare, in particolar modo concentrando la trattazione sulle geometrie monopolari per il monitoraggio del potenziale d'azione e per l'analisi d'impedenza.

Anzitutto, è possibile distinguere i *MEAs* in quattro grandi macrocategorie in base alla loro struttura:

### 1. Standard *MEAs*

Gli standard *MEAs* sono gli *array* con la generica struttura descritta finora, spesso accompagnati da camere di coltura per contenere il *medium* cellulare.

Nel caso di *MEAs* per *action potential monitoring*, presentano normalmente dai 16 ai 256 elettrodi (in rari casi anche 512), i quali sono disposti con geometria tabellare ed hanno un diametro tra i 5 ed i 100  $\mu\text{m}$ , con distanza da elettrodo a elettrodo variabile tra i 30  $\mu\text{m}$  ed 1 mm.

È sempre presente almeno un elettrodo di riferimento (RE) posizionato sul limitare del gruppo di elettrodi, il cui numero cresce al crescere del numero di elettrodi.

Oltre all'RE, gli elettrodi presenti possono essere *sensing electrodes* (elettrodi per la registrazione di segnale), *stimulating electrodes* (elettrodi per la stimolazione cellulare) o elettrodi in grado di svolgere entrambe le attività.

Il design di un microelectrode *array* può presentare molteplici pozzi (*multiple-wells*), all'interno dei quali il numero di elettrodi si riduce (al massimo 64 elettrodi per *well*, mentre le loro dimensioni e distanze rimangono le stesse), ma garantendo così misurazioni multiple e maggiore produttività.

Vengono di seguito riportati alcuni esempi di geometrie di *array* standard per la misura del PA di cellule *in vitro* di uno dei più grandi venditori, Multi Channel Systems GmbH (utilizzati sia per colture cellulari che per singole cellule).

Anzitutto, è facilmente visibile che su tutti i *MEAs* mostrati sono montate delle camere di coltura cellulare.

In Figura 4.1.(1) è riportato un tipico *MEA single-well* con 59 elettrodi da misurazione ed un elettrodo di riferimento in titanio organizzati con geometria tabellare, mentre in Figura 4.1.(2) ne è esposto uno molto simile con 120 elettrodi da misurazione e 4 di riferimento (sempre in titanio).

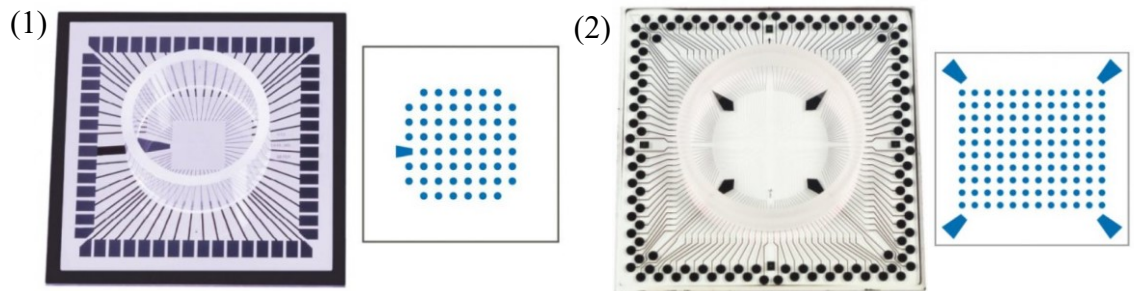


Figura 4.1 – (1) 60MEA100/10iR-Ti e la disposizione schematica dei suoi elettrodi,  
 (2) 120MEA1000-1500/30iR-Ti e la disposizione schematica dei suoi elettrodi.

In Figura 4.2.(1) ne viene raffigurato uno da 256 elettrodi (252 di misurazione, 4 di riferimento) realizzati in ITO, ed in Figura 4.2.(2) è possibile apprezzare un *MEA* per registrazione (32 elettrodi) e stimolazione (12 elettrodi) con geometria più rettangolare, con un solo elettrodo di riferimento.

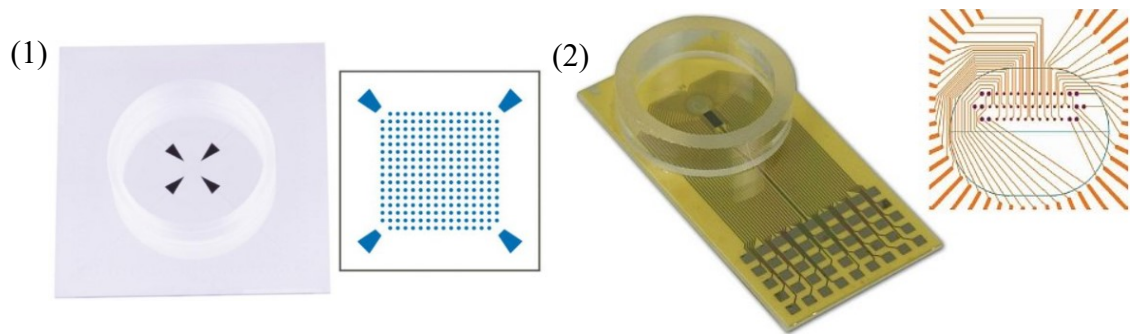


Figura 4.2 – (1) 256MEA30/8iR-ITO e la disposizione schematica dei suoi elettrodi,  
 (2) pMEA32S12-L2 e la disposizione schematica dei suoi elettrodi.

Infine, nella Figura 4.3 si hanno due geometrie di *MEA multi-well*: la prima (1) rappresenta un *array* con singola camera di coltura divisa in 6 sezioni da 42 elettrodi da registrazione e 1 elettrodo di riferimento in ITO ciascuna, mentre la seconda (2) rappresenta un *MEA multi-well* montato su una scheda per il monitoraggio avanzato con 24 o 96 pozzi da 3 elettrodi d'oro (eventualmente ricoperti in PEDOT) ciascuno. [27]

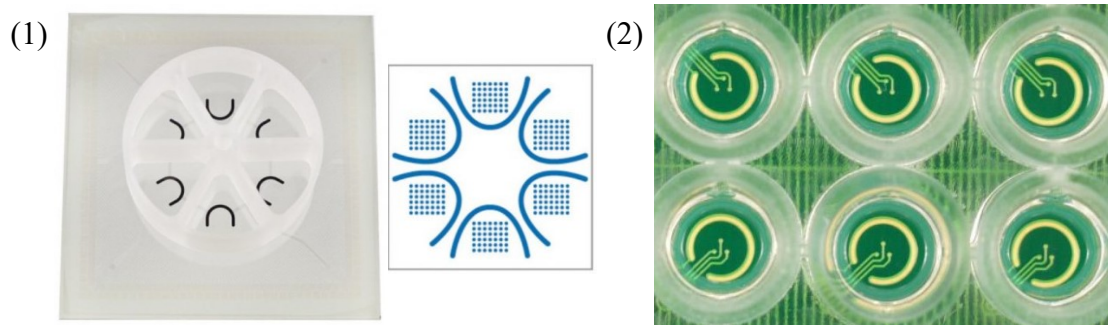


Figura 4.3 – (1) 256-6wellMEA200/30iR-ITO e la disposizione schematica dei suoi elettrodi nei vari pozzi, (2) Multiwell Plates for Multiwell-MEA-Systems.

Nel caso di *MEAs* per misura d'impedenza cellulare i design sono invece leggermente diversi: vengono infatti realizzati molto più spesso piccoli cluster formati da pochi elettrodi che vengono disposti sul substrato a seconda dell'utilizzo che verrà fatto del *MEA*. Gli elettrodi scelti mantengono distanze e dimensioni coerenti con quelle indicate per l'analisi del PA e vengono organizzati in piccoli gruppi appositamente per permettere l'analisi d'impedenza di una cellula sola (massimo 10-15 elettrodi per ogni gruppo), essendo i microelettrodi utilizzati monopolari (molto piccoli).

Per permettere l'attività di spettroscopia d'impedenza, ogni cluster deve contenere sempre anche un controelettrodo.

È importante ricordare inoltre che ogni elettrodo di lavoro deve essere vicino (non devono esserci altri elettrodi nel mezzo) al controelettrodo per poter permettere l'utilizzo della tecnica EIS.

In letteratura si possono individuare alcuni esempi di *MEAs* per *impedance sensing* con elettrodi monopolari, tra cui due esempi di *UF-MEAs* (*ultra flexible MEAs*) per registrazione di attività neurale sia *in vitro* che *in vivo* (anche tramite analisi di impedenza) realizzati da Luca Pazzini et al. e riportati in Figura 4.4, un *PEA* (*polymeric electrode array*) per l'interfacciamento neurale *in vivo* che, tra le varie tecniche, utilizza anche l'analisi d'impedenza, il cui schema è esposto in Figura 4.5, ed infine un *MEA* per *impedance sensing* formato da 8 elettrodi in ITO il cui processo di fabbricazione viene illustrato in Figura 4.6. [17], [28], [29]

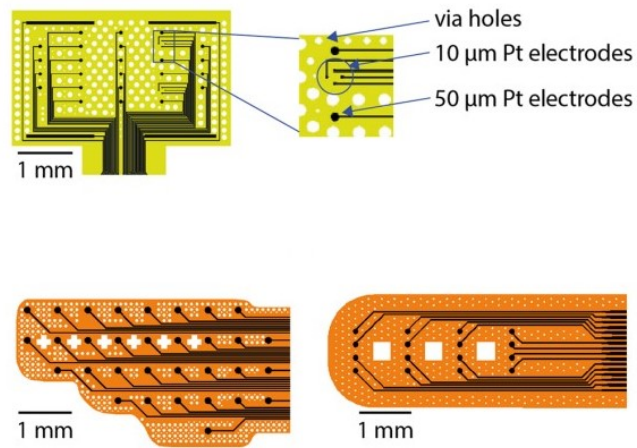


Figura 4.4 – Esempi di UF-MEAs per analisi d'impedenza.

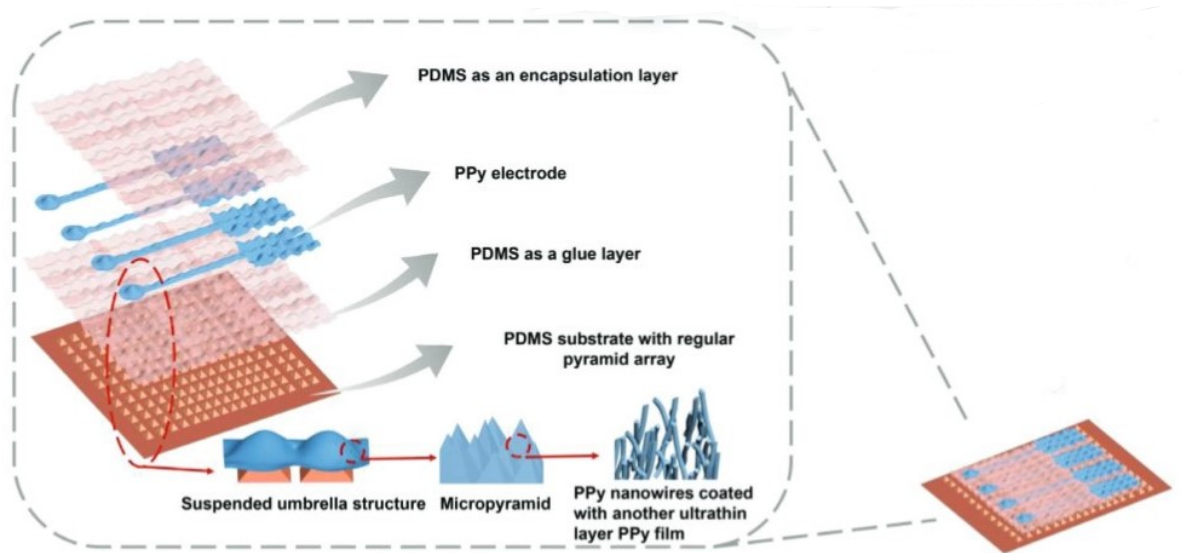


Figura 4.5 – Esempio di *MEA* completamente polimerico e flessibile per l'analisi d'impedenza cellulare.

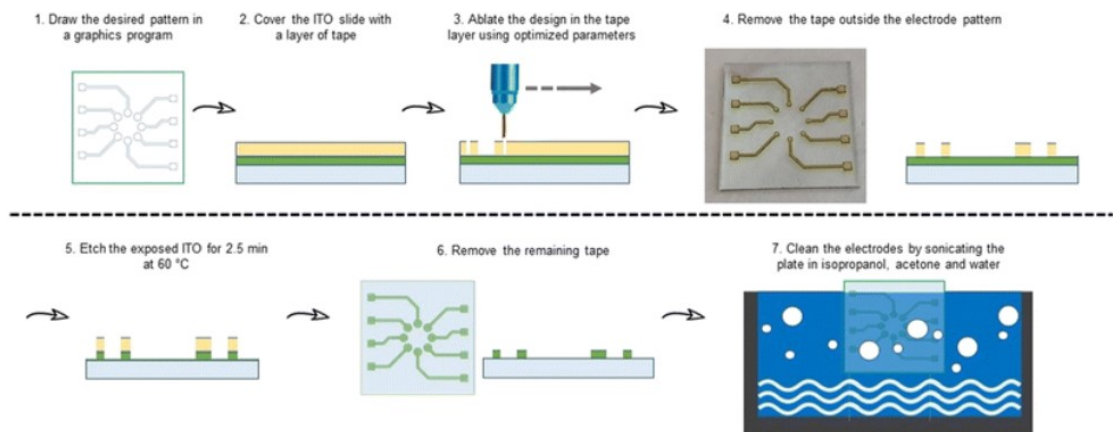


Figura 4.6 – Processo di fabbricazione tramite un plotter CO<sub>2</sub> laser di un *MEA* per *impedance sensing* con elettrodi in ITO.

## 2. *HD e UHD CMOS-type MEAs*

Gli *High Density* e *Ultra-High Density CMOS-type MEAs* (*HD* e *UHD CMOS-MEAs*) sono particolari *MEAs* in cui si concentrano un numero molto più elevato di elettrodi rispetto ai tipici *array*, che permettono registrazioni a risoluzione spaziale molto più alta e necessitano di alimentazione per funzionare (rientrando per questo nei *MEAs* attivi).

I loro predecessori, i *CMOS-type MEAs*, sono stati creati con le stesse finalità ma presentando una densità di elettrodo minore. Essi avevano geometrie tali da integrare su uno stesso chip di silicio, oltre a microelettrodi in numero maggiore rispetto agli standard *MEAs*, anche amplificatori, filtri, buffer di stimolazione, multiplexer, circuiti logici digitali e circuiti di conversione analogico-digitale (ADC).

Con lo sviluppo e la ricerca tecnologica i *CMOS-type MEAs* divennero successivamente multistrato, garantendo maggiore densità di microelettrodo e introducendo la tecnica del multiplexing on-chip, rendendo possibile l'accesso a migliaia di elettrodi utilizzando un numero inferiore di canali di uscita o la selezione del preciso gruppo di elettrodi di nostro interesse.

Con l'ulteriore avanzare della tecnologia i modelli *HD* e *Ultra HD* hanno permesso il trasferimento ad alta velocità dei dati raccolti al PC, l'indirizzamento degli elettrodi ed il controllo della temporizzazione, il tutto grazie ad un bus dati ad alta velocità e alla programmazione tramite un FPGA (*field programmable gate array*), elemento ad oggi essenziale per la raccolta di dati in tempo reale nei *CMOS-type MEAs*.

Come è già stato esposto nel capitolo 3, questi sensori potenziati vengono realizzati con la tecnologia VLSI, che si basa sulla tecnologia *CMOS* e permette di integrare migliaia di elettrodi in uno spazio microscopico.

L'utilizzo di questa tipologia di sensore ha permesso di aumentare moltissimo la risoluzione spazio-temporale delle misurazioni ed ha permesso di fare una prima analisi del segnale real-time integrando alcune componenti direttamente all'interno del sensore, portando con sé una risoluzione in ambito di ricerca biomedica. Ha permesso inoltre uno studio molto più dettagliato sia di colture cellulari che di singole cellule.

Vengono riportati di seguito alcuni esempi di *HD CMOS-MEAs* e *CMOS-MEAs* per analisi e stimolazione del PA di cellule cardiache e neuronali provenienti da due dei migliori produttori di *MEAs* sul mercato: Multi Channel Systems GmbH e 3Brain AG.

[14]

Anzitutto viene riportato in Figura 4.7 un *chip CMOS-MEA single-well* progettato per essere utilizzato con uno specifico sistema di gestione di *array*, che presenta 4225 elettrodi da registrazione distanziati tra loro 16 o 31  $\mu\text{m}$  organizzati in una griglia da 65x65 e 1024 elettrodi da stimolazione in griglia 32x32. [27]

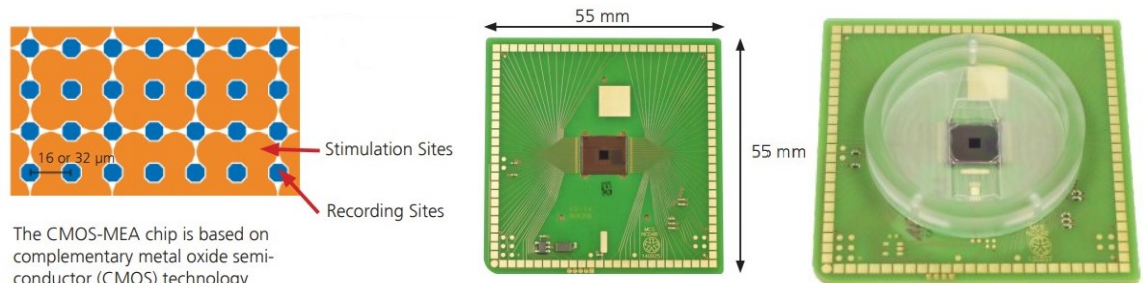


Figura 4.7 - *CMOS-MEA Chip* da utilizzare con il CMOS-MEA5000-System, Multi Channel Systems GmbH.

Viene poi esposto poi lo Stimulo *HD-MEA*, un *single-well HD CMOS-MEA* che presenta 4096 elettrodi da registrazione distanziati di 81  $\mu\text{m}$  l'uno dall'altro e 16 elettrodi da stimolazione distanziati di 1.3 mm. È possibile vederlo in Figura 4.8. [30]

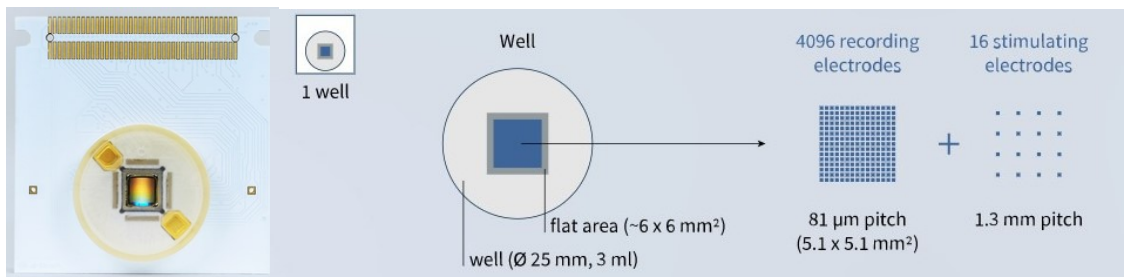


Figura 4.8 - Stimulo *HD-MEA* di 3Brain AG.

Infine, viene presentato in Figura 4.9 un *multi-well HD CMOS-MEA* con tre differenti configurazioni possibili per ogni pozzo, ovvero 2304 o 1024 elettrodi da registrazione e stimolazione. Va normalmente utilizzato all'interno di un sistema di gestione di matrici *multi-well*. [30]

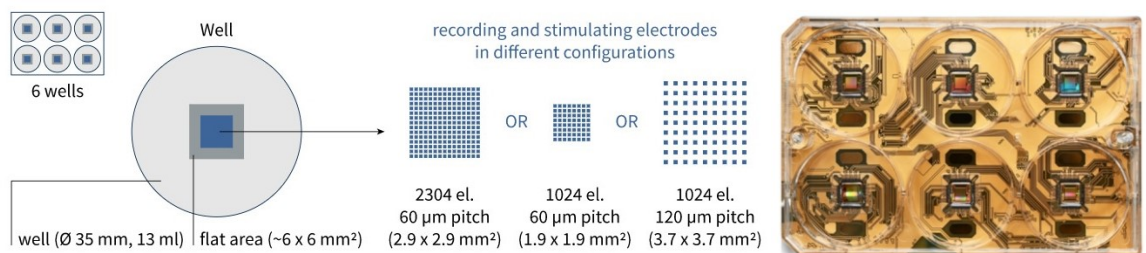


Figura 4.9 - 6-well CorePlate™ di 3Brain AG.

I *CMOS-type MEAs* per analisi di impedenza cellulare sfruttano la stessa tecnologia di fabbricazione (VLSI) per realizzare raggruppamenti di controelettrodi ed elettrodi di lavoro (come nella versione standard).

Viene riportata di seguito (in Figura 4.10) la struttura di un *HD MEA multi-purpose* che dispone di sei modalità, tra cui si ricordano, oltre alla registrazione dell'attività elettrica di una singola cellula, anche l'analisi e l'imaging cellulare tramite impedenza. In questo *array* sono stati realizzati 16384 elettrodi organizzati in sedici zone con 1024 elettrodi l'una, suddivise a loro volta in 256 pixel da quattro elettrodi ciascuno. Questi quattro elettrodi si possono occupare alternativamente di una delle attività di analisi disponibili. [31]

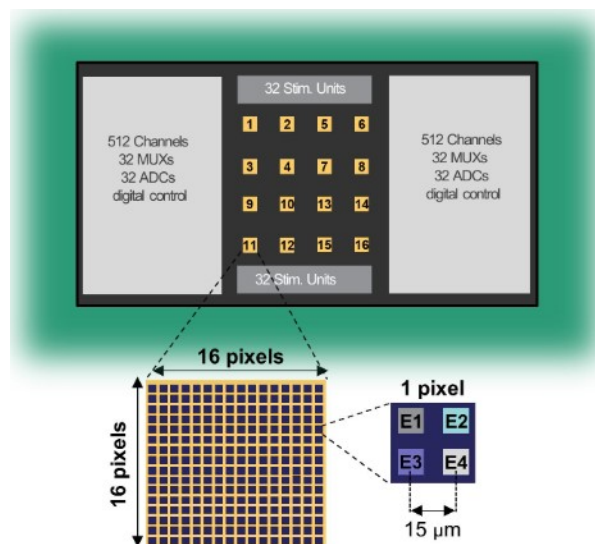


Figura 4.10 – Struttura di un *High-Density multi-modal MEA*.

Infine, viene illustrato in Figura 4.11 un altro interessante esempio di *CMOS MEA* nel quale è presente una griglia 4x8, con quattro elettrodi di posizionamento e due per l'analisi d'impedenza per ogni casella della griglia. È interessante notare come questi quattro elettrodi di posizionamento si occupino di centrare la cellula sopra ai *center-electrode* dediti all'*EIS* tramite l'applicazione di un campo elettrico, che è meno forte proprio nella zona centrale della cella. [32]

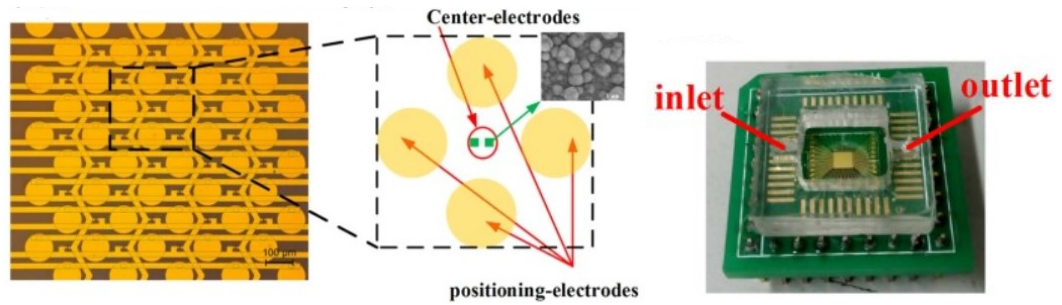


Figura 4.11 – CMOS-type MEA con elettrodi di posizionamento e *center-electrodes* per analisi d'impedenza.

### 3. *Microfluidic MEAs*

I *microfluidic microelectrode arrays (MMEAs)* sono particolari *MEAs* che hanno l'obiettivo di creare microambienti simili a quelli *in vivo* per la coltura di neuroni *in vitro*, e per farlo utilizzano un dispositivo PDMS a due o più compartimenti (*wells*) tra loro collegati che funge da piattaforma di coltura cellulare, detto struttura microfluidica (vedi Figura 4.12 (a) per uno schema).

Jean ed i suoi collaboratori furono i primi ad utilizzare dispositivi composti da due o più compartimenti polimerici collegati tra loro da micro-canali per disporre e studiare cellule neuronali in crescita, e dalla loro ricerca ottennero due risultati contrapposti: capirono che i micro-canali da loro realizzati erano troppo piccoli per la migrazione cellulare (sezione di  $3 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ ), ma abbastanza grandi da far passare attraverso gli assoni, permettendo loro di estendersi in altri compartimenti. Questa scoperta permise di ottenere buoni risultati nell'utilizzo di questi dispositivi per separare gli assoni dal soma e dai dendriti, per creare sistemi di co-coltura neurone-astroglia e per la costruzione di un circuito funzionale partendo da due popolazioni di neuroni provenienti da regioni cerebrali diverse.

Pochi anni più tardi queste strutture vennero integrate alle matrici di microelettrodi (*MMEAs* – vedi Figura 4.12 (b)) rendendo possibile la registrazione e l'analisi di segnali assonici (in particolare consentendo la misurazione di piccoli segnali generati da un singolo fascio ed analizzando la velocità di propagazione del segnale nei vari fasci), allineando ciascun micro-canale a dei microelettrodi.

Venne poi dimostrato che i micro-canali riuscivano a potenziare il segnale grazie alla loro elevata resistenza *end-to-end*, permettendo così la registrazione di segnali relativamente elevati anche da assoni isolati, impossibili da registrare con i tipici *MEAs*.



È stato infine compreso come questo tipo di struttura possa rappresentare un ambiente di coltura *long-term* (fino a cinque settimane) in cui costruire reti neurali, con cui è stata dimostrata l'unidirezionalità del segnale per neuroni in compartimenti vicini e l'influenza che questi hanno tra loro anche se non facenti parte della stessa coltura. [14]

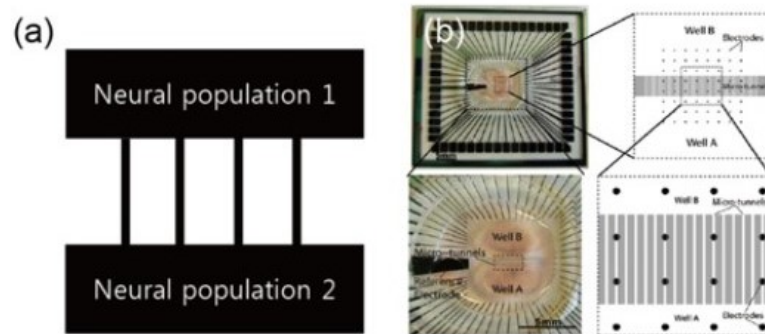


Figura 4.12 – (a) Schema di una struttura microfluidica, (b) esempio di un MMEA con relativa schematizzazione, in cui sono visibili anche micro-canali e microelettrodi.

#### 4. *Surface-micropatterned MEAs*

Le varie superfici dei *MEA* possono essere caratterizzate con specifiche molecole in grado di aumentare (*cell-adhesive area*) o diminuire (*cell-prohibitive area*) la capacità di adesione cellulare al substrato o ad altre parti dell'*array*, offrendo l'opportunità di indirizzare lo sviluppo cellulare come desiderato. Nella Figura 4.13 viene riportato uno schema di un *MEA* biofunzionalizzato.

Per riuscire a ottenere zone adesive e proibitive per le colture cellulari vengono utilizzate tecniche di *micropatterning* fisico o chimico, il cui primo esempio è stato realizzato con la tecnica del *lift-off*, ancora oggi utilizzata (realizzabile tramite fotolitografia dell'intero sensore e applicazione di molecole adesive alla superficie durante il processo). Un altro metodo è il *microcontact printing* che, usando uno stampo in PDMS, stampa sullo strato superficiale un *micropattern* di biomolecole, svolgendo così un *micropatterning* chimico.

Per facilitare il fissaggio delle biomolecole ai *MEAs* sono state utilizzate tecniche di modifica delle superfici a base di alcanetiolato, organosilano e polidopamina.

Infine, sono da ricordare Spira et al. per aver utilizzato una procedura di cross-linking proteico per immobilizzare peptidi RGD terminanti con cisteina su elettrodi a spina d'oro (vedi Figura 4.14) e Nam et al. per aver sintetizzato polidopamina sui microelettrodi tramite deposizione elettrochimica. [14], [33]

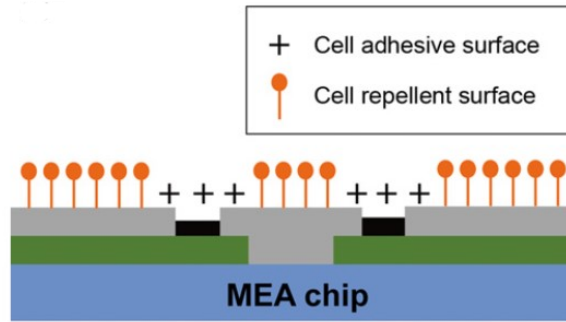


Figura 4.13 – Schema di un MEA biofunzionalizzato.

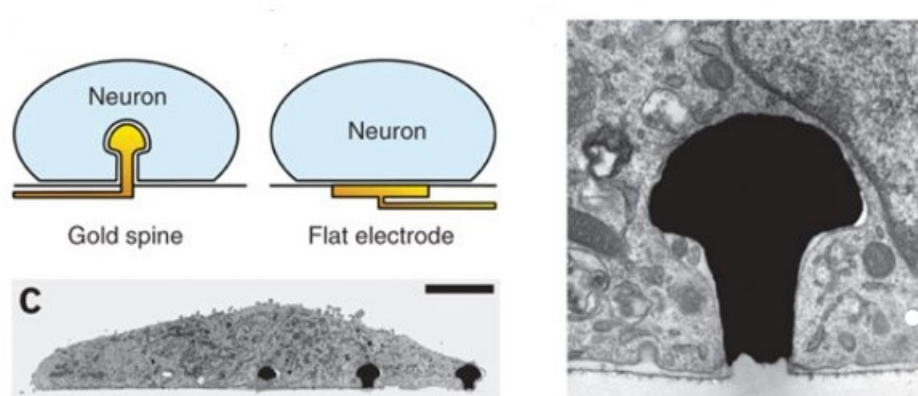


Figura 4.14 – Peptidi RDG immobilizzati su elettrodi 3D a fungo da Spira et al.

## Capitolo 5: Caso pratico: realizzazione di un *MEA*

Dopo aver ampiamente descritto i *MEAs* dal punto di vista teorico, è ora possibile introdurre un caso pratico di realizzazione di un *MEA multi-purpose* con elettrodi monopolari in layout da 2, partendo dalla progettazione dell'elettrodo, passando per la scelta dei materiali realizzativi, arrivando alla scelta dello strumento di realizzazione e infine alla stampa del sensore vero e proprio.

### 5.1 Progettazione

Dopo aver visionato alcuni articoli in cui veniva discussa la progettazione di *MEAs* ([24], [34]) si è deciso di procedere alla progettazione di un *MEA multi-purpose* in grado di misurare sia l'impedenza che il PA cellulare.

È stato quindi progettato un *MEA* con un singolo elettrodo di riferimento per la misura di PA posizionato centralmente ed otto microelettrodi di lavoro per la misura e stimolazione di PA, disposti circolarmente attorno allo stesso, realizzando così otto layout da due elettrodi per l'analisi d'impedenza e otto coppie di elettrodi conduttivi per la misura del PA.

Le specifiche geometriche relative alle dimensioni di RE e WE sono state definite basandosi sulle informazioni trovate in letteratura [34], che suggeriscono:

- un contro elettrodo centrale almeno cinque volte più grande degli elettrodi di lavoro (per rendere possibile la misura d'impedenza);
- una dimensione dei microelettrodi di lavoro paragonabile a quella di una singola cellula (decine di micrometri);
- una separazione inter-elettrodo maggiore della dimensione della cellula stessa e quindi delle dimensioni dei singoli elettrodi.
- delle tracce conduttive per la connessione degli elettrodi alle piastre di collegamento esterne simmetriche e di lunghezza molto simile, per rendere più semplici i collegamenti e per garantire massima simmetria durante le misurazioni.
- delle piazzole di contatto di dimensioni e distanze adeguate, in modo da permettere di effettuare agevolmente i collegamenti con la strumentazione. [24]

A partire da queste indicazioni generali, si è proceduto al dimensionamento delle varie componenti (Figura 5.1) come segue:

- piastre di collegamento di 4.5 mm × 4.5 mm;
- distanza tra piastre di almeno 2 mm;
- contro elettrodo centrale di 4 mm di diametro;

- distanza tra microelettrodi di lavoro e piastre di collegamento almeno di 2 cm;
- distanza tra controelettrodo centrale e rispettiva piastra di collegamento almeno di 3 cm;
- 8 microelettrodi di lavoro da realizzare in diverse dimensioni:
  - diametro 0.3 mm;
  - diametro 0.6 mm;
  - diametro 1 mm.

ed a diverse distanze:

- distanza inter-elettrodo di 1 mm;
- distanza inter-elettrodo di 2 mm.

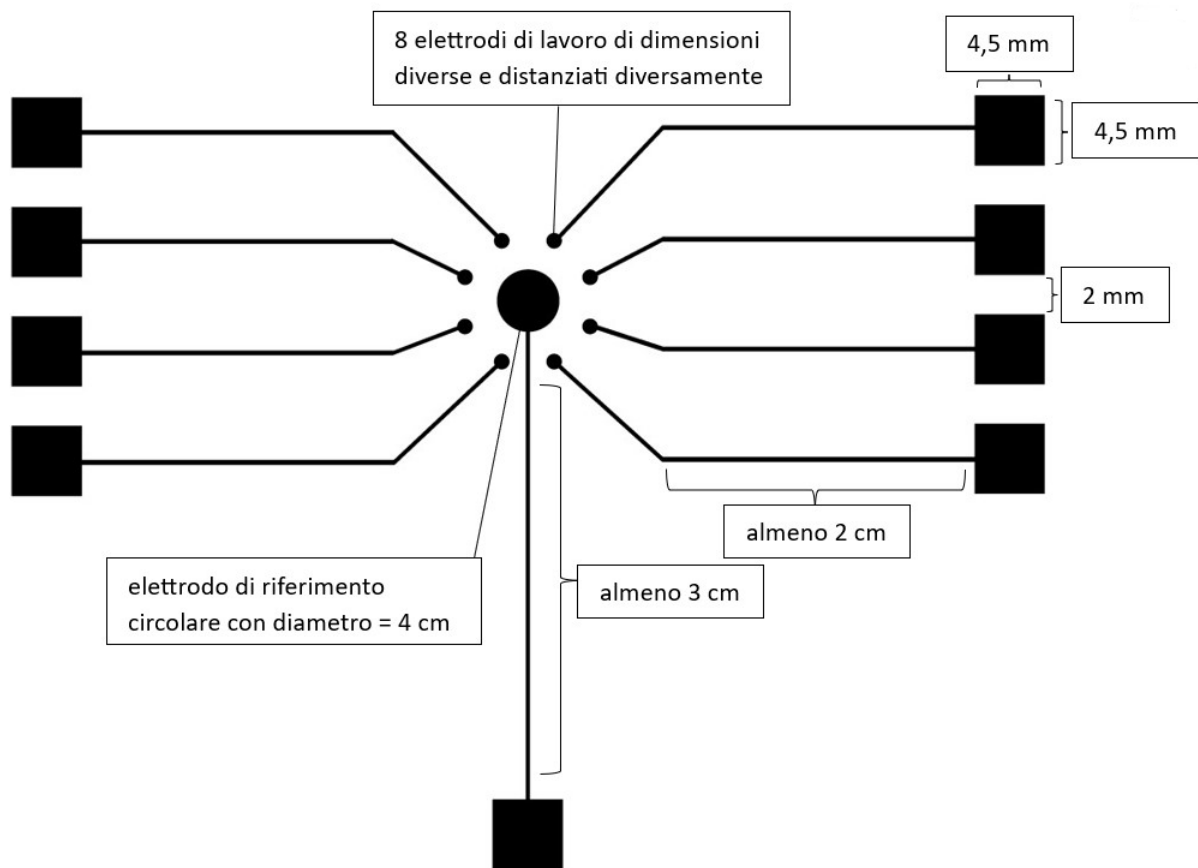


Figura 5.1 – Rappresentazione schematica, comprensiva di misure, del *MEA* realizzato.

Dopo aver completato il dimensionamento di tutte le componenti, la geometria delle varie tipologie di *MEA* è stata disegnata utilizzando software da disegno tecnico Inkscape, molto comodo per creare e modificare geometrie lavorando anche sul singolo pixel, permettendo modifiche a livello millimetrico e micrometrico. Questo risulta particolarmente utile tenendo conto della specifica stampante utilizzata per la fabbricazione, la stampante Ink-Jet Dimatix (Fujifilm), la quale è una

tipica stampante a stampa digitale che riceve in ingresso, come verrà approfondito successivamente, progetti in pixel.

Proprio per facilitare questa compatibilità tra software di disegno tecnico e applicativo della stampante, Inkscape permette di esportare le immagini realizzate nella risoluzione più adatta alle nostre esigenze.

Poiché infatti la stampante non tiene conto delle dimensioni effettive del file ma associa ad ogni pixel una goccia di inchiostro, è necessario prestare molta attenzione al numero di pixel che le compongono (quindi alla risoluzione).

Conoscendo il *drop spacing* (ovvero la distanza tra una goccia di inchiostro depositata e la successiva) della stampante, che nel caso degli inchiostri utilizzati è fissato a 20  $\mu\text{m}$ , è quindi possibile risalire al numero esatto di pixel necessari per formare una certa lunghezza, così da poter controllare che la scala del design da stampare sia effettivamente quella che desiderata.

Viene riportata in Figura 5.2 la schermata principale dell'applicativo.

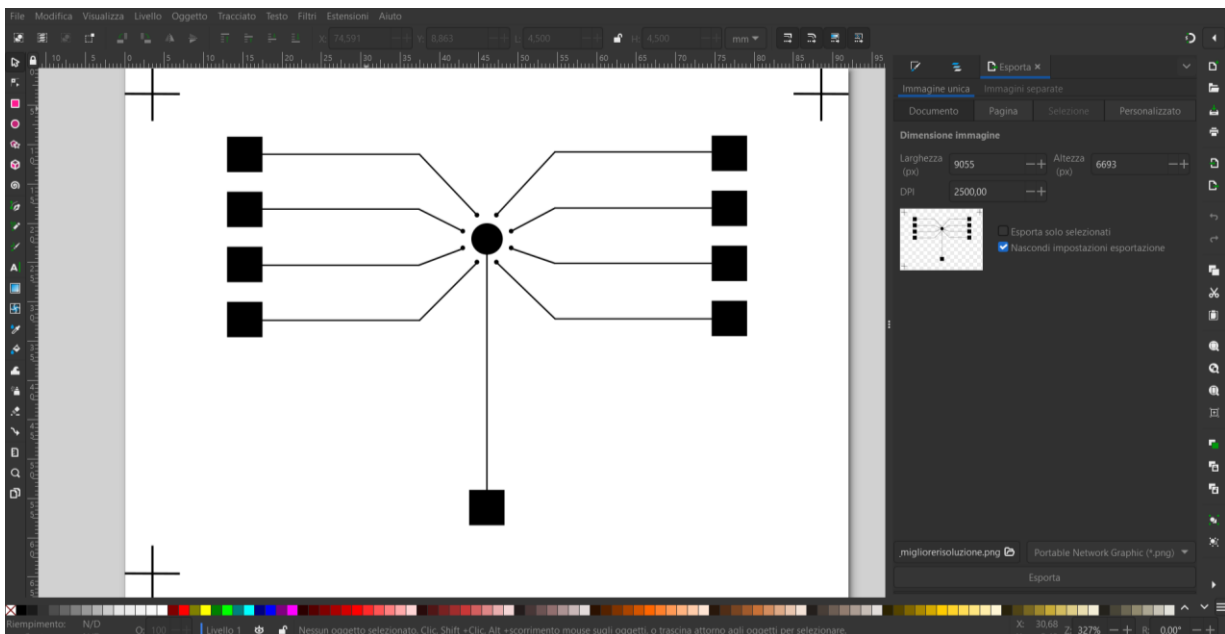


Figura 5.2 – Schermata principale del software da disegno Inkscape.

Altre accortezze sono state necessarie nella fase di progettazione, per ottimizzare l'accuratezza del processo di stampa a più strati.

Tra queste troviamo la necessità di apporre dei *fiducial marker* (le tre croci visibili in Figura 5.2) sui tre angoli di ciascuna geometria, per consentire un riallineamento efficace della stampante nel caso di stampe multiple.

Tale operazione viene tipicamente svolta in due situazioni:

- per migliorare spessore e area di copertura di inchiostri poco viscosi, con conseguente aumento della conducibilità e decrescita della resistenza;
- nei casi in cui è necessario realizzare pattern diversi sovrapposti, come avviene appunto per la copertura degli elettrodi di lavoro dei *MEA* con materiali meno ossidanti e più biocompatibili dell'argento (e.g. carbonio o PEDOT:PSS).

Altra accortezza necessaria per ottimizzare il trasferimento della geometria al software della stampante è il formato del file in cui le geometrie vengono salvate, ovvero il bitmap monocromatico (.bmp).

Seguendo le specifiche fin qui indicate, sono stati quindi realizzati i disegni sia per la realizzazione delle tracce in argento che per la copertura in carbonio, facendo variare le dimensioni e distanze degli elettrodi specificate sopra.

Vediamo in Figura 5.3 un esempio di queste geometrie.

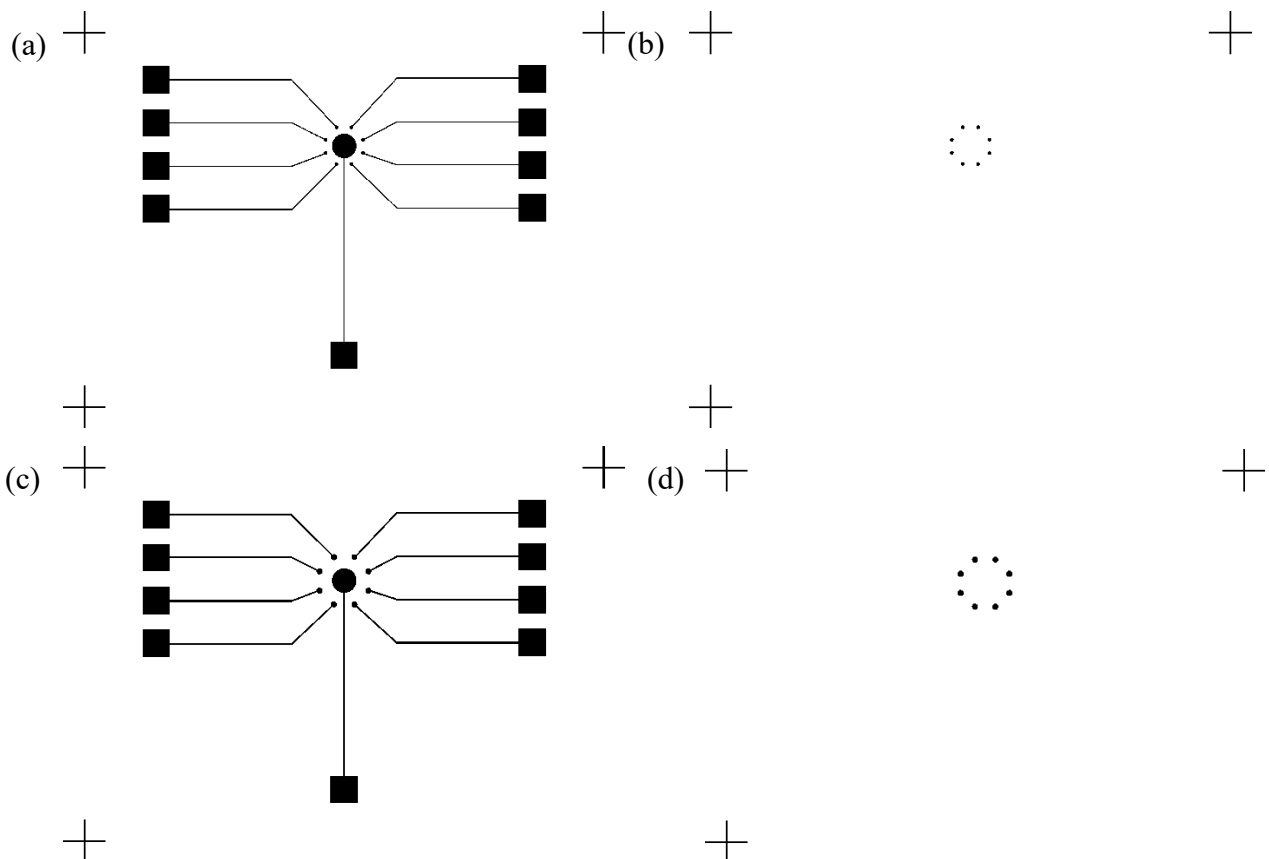


Figura 5.3 – (a) Geometria del *MEA* con microelettrodi di diametro 0.6 mm, distanziati tra loro di 1 mm, per la stampa del motivo in argento; (b) Geometria del *MEA* con microelettrodi di diametro 0.6 mm, distanziati tra loro di 1 mm, per la stampa del motivo in carbonio; (c) Geometria del *MEA* con microelettrodi di diametro 1 mm, distanziati tra loro di 2 mm, per la stampa del motivo in argento; (d) Geometria del *MEA* con microelettrodi di diametro 1 mm, distanziati tra loro di 2 mm, per la stampa del motivo in argento.

## 5.2 Stampa

Dopo aver progettato le geometrie, è stato possibile passare al processo di stampa vero e proprio. Verranno di seguito illustrati i materiali con cui è stato realizzato l'*array* ed il processo di stampa utilizzato.

### 5.2.1 Materiali utilizzati: Kapton® ed inchiostri conduttivi

Per la realizzazione del substrato del microelectrode *array* è stato scelto un film di Kapton®, un poliimmide sviluppato da DuPont ottenuto polimerizzando una dianidride aromatica e una diammina aromatica.

Il film utilizzato era spesso 25 µm, ed è stato scelto, oltre che per la sua notevole flessibilità, per la stabilità termica (rimane resistente ad un intervallo di temperature molto ampio, da -269° C a 400° C), per la leggerezza, per le notevoli proprietà isolanti e di inerzia chimica che lo caratterizzano, per le buone proprietà di adesione alle tracce metalliche depositate e, infine, per l'inerzia che ha dimostrato nelle applicazioni sia *in vitro* che *in vivo*.

Ad oggi viene ampiamente utilizzato come substrato per circuiti stampati flessibili e isolamento di trasformatori, condensatori, bobine ecc.

È riportato in Figura 5.4 il film di Kapton® utilizzato per la realizzazione del substrato. [35]–[37]

Per la realizzazione delle tracce metalliche sono invece stati utilizzati due inchiostri compatibili con la stampante *Ink-Jet* scelta. Per la realizzazione di piastre, elettrodi e collegamenti è stato usato un inchiostro conduttivo a nanoparticelle d'argento a cristallo singolo, il Sicrys™ I40DM-106, disciolto in glicole dietilenico monometiltere (sostanza organica incolore ed inodore). Per la copertura in carbonio dei microelettrodi è stato invece utilizzato un inchiostro resistivo a nano particelle di carbonio, il Sicrys™ RI-6DM-3, con particelle disciolte nella stessa soluzione organica.

Questi inchiostri sono progettati specificatamente per la stampa *Ink-Jet* digitale, offrendo infatti bassa viscosità, lunga conservazione a temperatura ambiente e buona qualità di stampa. [38], [39]

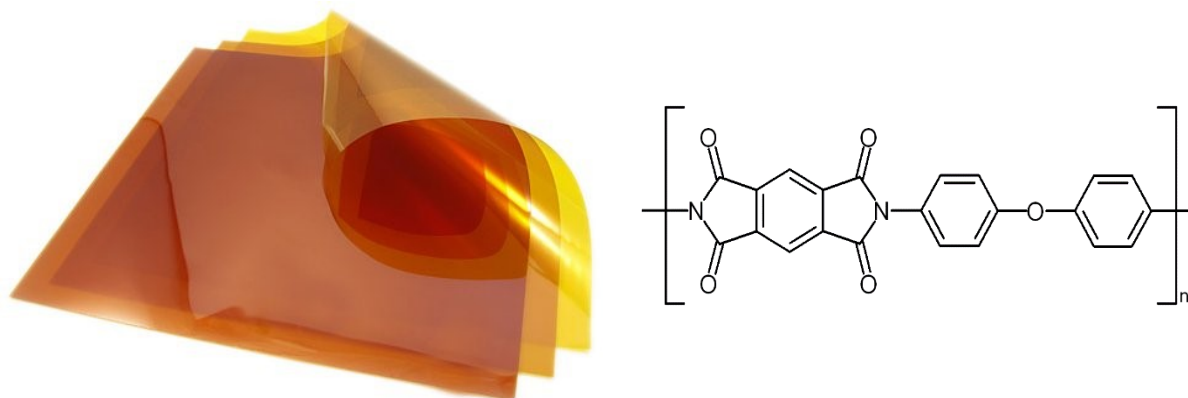


Figura 5.4 – Formula chimica del Kapton® (a destra) e pellicola utilizzata come substrato (a sinistra).

### 5.2.2 *Ink-Jet* printing: stampante Dimatix Materials Printer

Come già detto, la tecnologia scelta per la realizzazione dei sensori è la stampa *Ink-Jet* digitale, già vista nel Capitolo 3, Sezione 3.2, che verrà approfondita qui per lo specifico caso trattato. La stampante scelta è la Dimatix Materials Printer DMP-2800 Series, uno strumento a produzione limitata da usare in laboratorio per consentire a ricercatori, scienziati e ingegneri di applicare la tecnologia *Ink-Jet* a nuovi processi analitici, produttivi e di sperimentazione. È possibile vederla in Figura 5.5. [40]

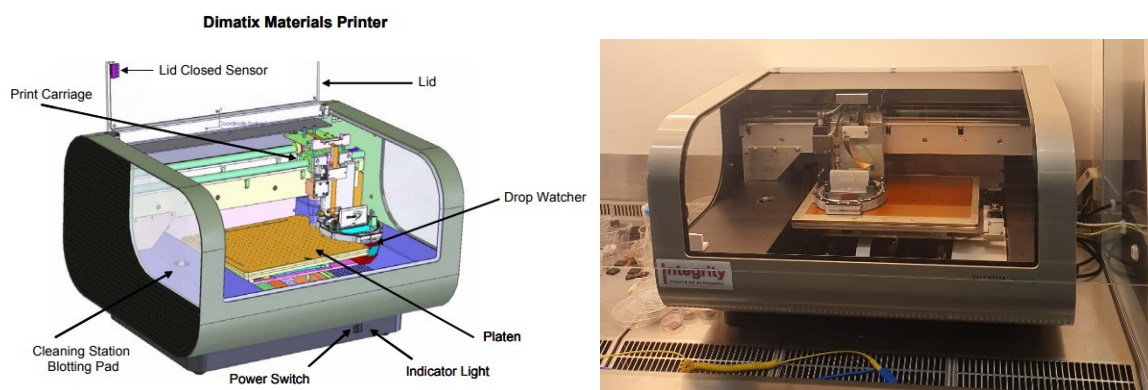


Figura 5.5 – Rappresentazione schematica della stampante (sinistra) e foto reale dal laboratorio (destra).

La DMP è una stampante piezoelettrica *Ink-Jet* DOD (*drop-on-demand*), ovvero un dispositivo in cui la deposizione delle gocce avviene solo su richiesta, ed il meccanismo che la governa si basa su un piccolo attuatore meccanico che, modificando rapidamente il volume della camera di pompaggio (processo visibile in Figura 5.6), genera un impulso di pressione che costringe una certa quantità di liquido a fuoriuscire dall'ugello. Le gocce generate da questo tipo di stampa possono avere una dimensione variabile tra i 10 ed i 50  $\mu\text{m}$ , con una frequenza di uscita tra 1 e 20 kHz.



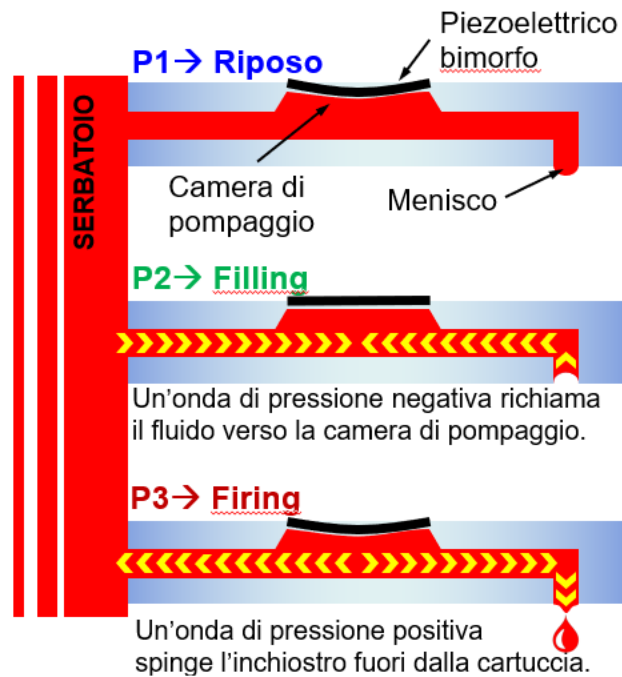


Figura 5.6 – Processo di creazione dell'onda di pressione in grado di far fuoriuscire la goccia.

È importante ricordare che, per far sì che la goccia fuoriesca dall'ugello, l'impulso di pressione deve superare le forze capillari e di adesione che mantengono il liquido all'interno della cartuccia. Per questo motivo l'impulso di pressione deve essere ottimizzato in modo da causare una risonanza acustica costruttiva all'interno del canale, ottenendo una *waveform* (forma d'onda) da applicare all'elemento piezoelettrico corretta (vedi Figura 5.7).

In particolare, risulta essenziale che la frequenza di *jetting* (ovvero la frequenza con cui le gocce toccano il substrato) assuma valori sensati, per poter avere una deposizione finale di qualità. Infatti, un parametro necessario per avere un *jetting* corretto è che il tempo di realizzazione della *waveform* sia minore del tempo di *jetting*.

In Figura 5.8 si riporta la *waveform* ed il tempo di *waveform* e di *jetting*.

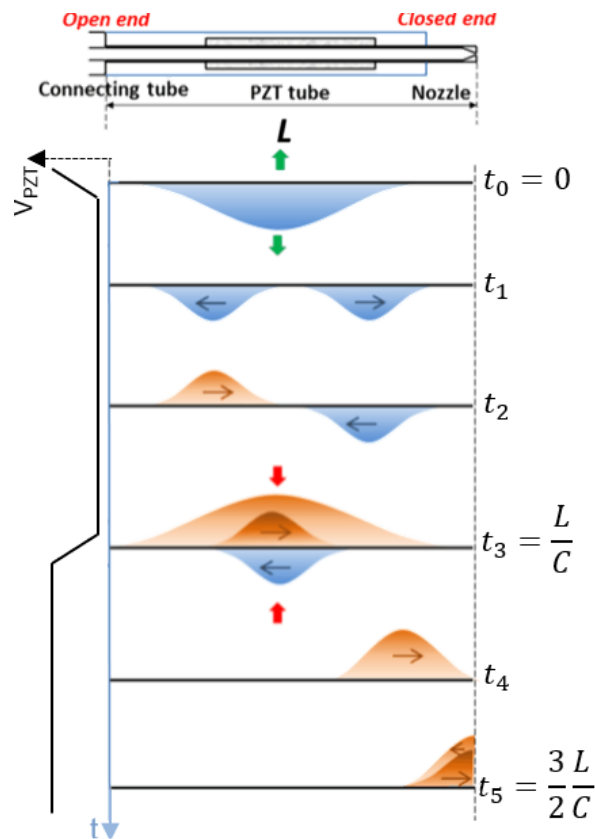


Figura 5.7 – Processo di generazione dell'impulso di pressione e della waveform.

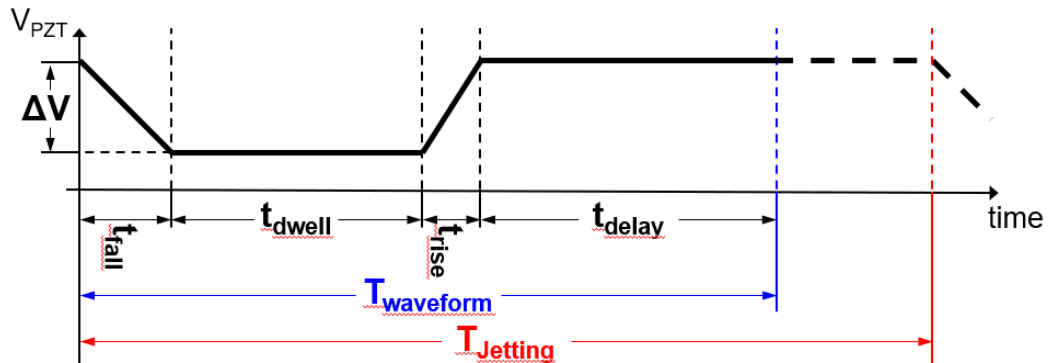


Figura 5.8 – Waveform e parametri importanti: tempo di waveform ( $T_{\text{waveform}}$ ) minore del tempo di jetting ( $T_{\text{jetting}}$ ).

Lo strumento ha diverse risoluzioni di stampa possibili, e presenta una telecamera detta *Fiducial Camera* in grado di osservare il substrato prima e dopo la deposizione (non durante) per controllare l'operato della stampante. Presenta inoltre cartucce piezoelettriche a basso costo, flessibili e riempibili dall'utente con comode siringhe, formate da 16 ugelli distanziati di  $254 \mu\text{m}$ . [22], [40]

Questo dispositivo rende possibile non solo la stampa di semplici modelli predefiniti, ma anche quella di design propri, importandoli in formato bitmap *monochrome*.

Per procedere alla stampa di un modello personale, è stato prima necessario caricarlo nel sistema. Fatto questo, una schermata si è aperta (quella che troviamo in Figura 5.9), da cui è stato possibile variare i parametri presenti nelle varie sezioni. Ricordandone alcuni:

- In *Substrate* è stato possibile cambiare le dimensioni del substrato, il *drop spacing* e decidere se e quante volte ri-stampare la geometria sul substrato.
- In *Placement* è stato possibile definire la posizione di origine della stampa e verificare la dimensione del modello da stampare, mentre in *Tilting* è stato possibile definire quante copie della geometria si vogliono realizzare e la distanza di una dall'altra.
- In *Reference Point* è stato possibile definire l'origine della stampa posizionando il *Reference Point* su un punto a piacere del substrato (punto selezionato sul substrato grazie all'ausilio della *fiducial camera*, che deve rimanere aperta finché non inizia la stampa per permettere l'identificazione del punto d'origine). [40]

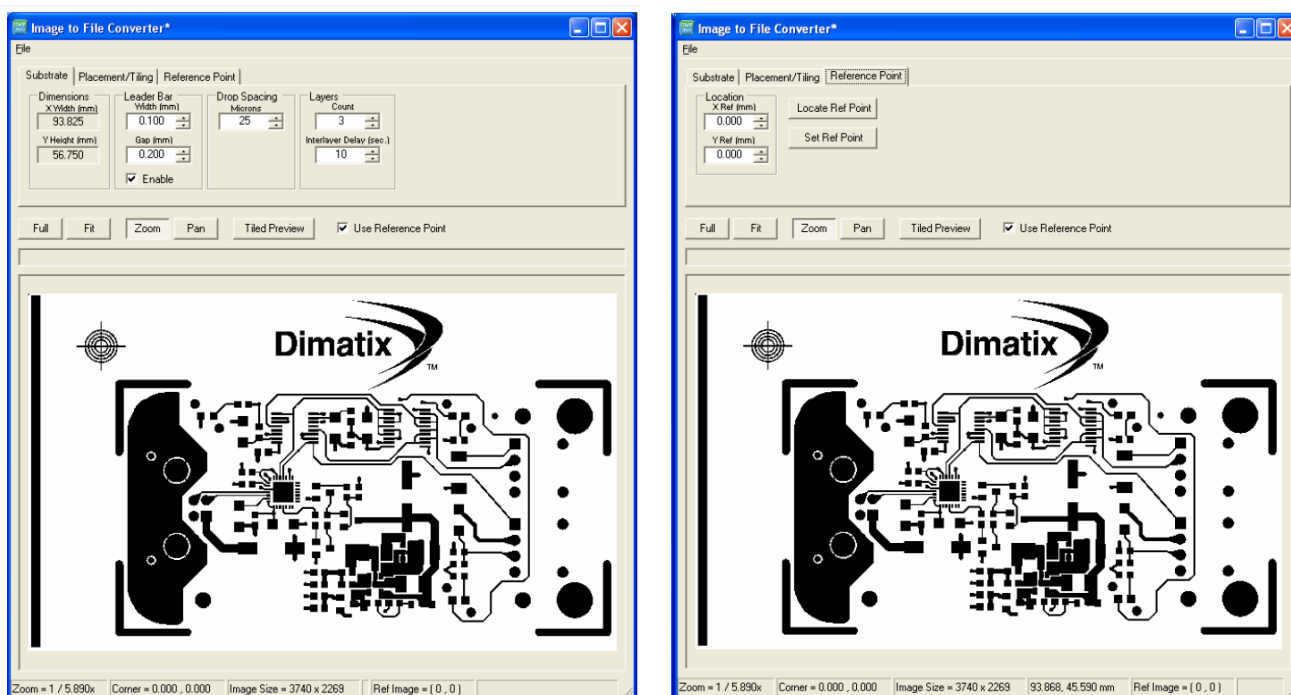


Figura 5.9 – Finestra per la stampa del modello creato: a sinistra le opzioni per il substrato, a destra quelle per la scelta del *Reference Point*.

Dopo aver definito tutti i parametri del caso, il file è stato salvato come *pattern file* e riaperto nel *main form* (o nel *fiducial form*) per poter essere stampato.

Prima di procedere alla stampa è possibile vedere una *preview* del modello tramite la finestra *Print Preview*, dove controllare che grandezza, posizionamento ecc. siano impostati correttamente; è inoltre possibile controllare che le gocce fuoriescano correttamente da tutti

gli ugelli grazie al *Drop Watcher*, una telecamera posizionata sul lato della stampante. Quando invece la cartuccia risulta già in posizione, è possibile visionare gli ugelli uno per volta grazie al tool *Viewing Nozzle*.

È anche consigliabile fare una o più pulizie prima di ogni stampa e tra una stampa e l'altra grazie al *Cleaning Box (Run Now)*, per avere ugelli sempre funzionanti, non occlusi e con una deposizione di gocce continua. [40]

Infine, è importante ricordare che il substrato è mantenuto in posizione da una serie di vacuum, e che il piatto dove poggia lo stesso è riscaldato (a circa 60° C) per permettere una prima veloce asciugatura dell'inchiostro depositato.

Dopo aver preparato le geometrie e controllato che le impostazioni scelte fossero quelle corrette, è stato possibile far partire la stampa.

Il primo strato stampato è stato quello dell'inchiostro a nanoparticelle d'argento, per andare a realizzare il *metal pattern*. Questa stampa è stata ripetuta più volte, riallineando il *reference point*, in modo da ottenere un'opacità maggiore e una migliore copertura dell'inchiostro conduttivo.

Dopo aver finito la stampa, si è proceduto con la necessaria sinterizzazione (i.e. *curing*) dell'elettrodo utilizzando la piastra riscaldante Stuart US150 impostata a 250° C per 30 minuti, in modo da rendere l'inchiostro conduttivo. [38]

Solamente dopo aver completato il *curing* del sensore è stato possibile caricare nel software la geometria per la copertura in carbonio e stampare lo strato resistivo sui microelettrodi (questo poiché l'inchiostro dev'essere completamente asciutto per permettere l'aderenza dello strato successivo), anche in questo caso facendo eventuali stampe multiple per ottenere l'opacità desiderata.

Fatto questo, l'elettrodo è stato curato un'ultima volta ad una temperatura di 150°C per 60 minuti per rendere effettivamente resistivo lo strato di carbonio. [39]

Nelle Figure 5.10, 5.11, 5.12 si possono trovare il processo di stampa, il *curing* del sensore sulla piastra riscaldante ed il sensore con il metal pattern completato.

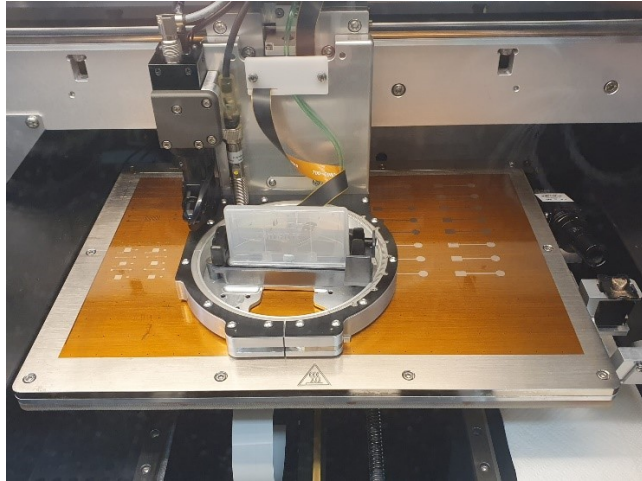


Figura 5.10 – Processo di stampa della *metal pattern* del MEA.



Figura 5.11 – *Curing* della *metal pattern* del MEA sulla piastra riscaldante Stuart US150.

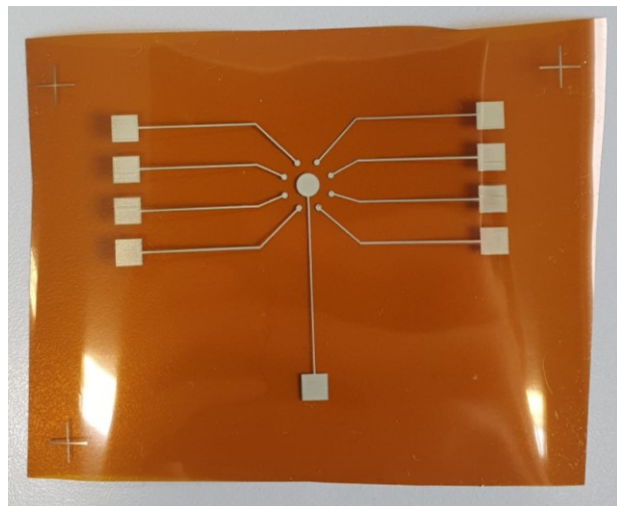


Figura 5.12 – *Microelectrode array* completato e pronto per l'uso.



## Capitolo 6: Misurazioni e Risultati

Dopo aver realizzato le varie geometrie del personalizzato con la procedura descritta nel capitolo precedente, è stato necessario testare le sue proprietà.

Per farlo, è stato delineato un protocollo di caratterizzazione, ovvero una lista organizzata di tutte le procedure da svolgere in laboratorio per testare il *microelectrode array*.

L'attività di caratterizzazione, in particolare, consiste nell'osservare e studiare le risposte di un sensore agli stimoli, non curandosi dei processi chimico-fisici che avvengono al suo interno per la trasformazione dell'energia.

Dal protocollo sono emerse due macro-fasi in cui è possibile distinguere la caratterizzazione (statica) del sensore, che sono:

- Caratterizzazione strutturale, che analizza la struttura e la geometria del sensore e controlla che questo sia integro e correttamente formato; in questo caso è stata realizzata tramite una caratterizzazione ottica (morfologica) (1).
- Caratterizzazione funzionale, che analizza il funzionamento del sensore; in questo caso la conduzione elettrica è stata controllata tramite una caratterizzazione elettrica (2) e le prestazioni del *MEA* durante un suo utilizzo standard tramite una caratterizzazione elettrofisiologica (3).

Verranno di seguito approfondite le tre caratterizzazioni appena introdotte ed esposti i risultati ottenuti con le stesse.

Per semplicità, è stata portata avanti l'analisi di un solo sensore, in particolare quello con microelettrodi da 1 mm distanziati di 2 mm: nella caratterizzazione ottica ed elettrica è stato utilizzato solamente con lo strato di argento, mentre per la caratterizzazione elettrofisiologica sono stati applicati strati di PEDOT e carbonio su alcuni degli elettrodi, per mostrare la differenza di impedenza misurata rispetto all'argento. [24]

### 6.1 Caratterizzazione ottica – caratterizzazione strutturale

Per verificare che la geometria dell'elettrodo fosse stata stampata correttamente e che le linee di conduzione non fossero interrotte è stata predisposta una caratterizzazione ottica, durante la quale sono state usate la *fiducial camera* della stampante, un microscopio digitale e una semplice fotocamera per analizzare il sensore e ottenere prove fotografiche della sua integrità.

In particolare, subito dopo la stampa di ogni strato di inchiostro è stata utilizzata la telecamera integrata nella stampante per verificare che le tracce conduttive non si interrompessero e che gli elettrodi si fossero formati con la forma corretta.

Sul sensore in questione la stampa del motivo argentato è stata ripetuta due volte. In Figura 6.1 sono riportati due degli otto microelettrodi, uno alla prima ed uno alla seconda stampa, mentre in Figura 6.2 vi sono due tracce, prima e dopo la seconda passata.

Dalle immagini è ben visibile come la ripetizione della stampa abbia reso le tracce e gli elettrodi molto più opachi, ed è anche possibile notare come entrambe le componenti non presentino interruzioni, nemmeno dopo una sola passata. Inoltre, è curioso vedere il riflesso creato dalle nanoparticelle d'argento dopo la prima stampa.

Infine, la mancanza di gocce satellite sparse garantisce un corretto deposito dell'inchiostro, senza *splash* o *rebound* in grado di creare deformità nella geometria stampata.

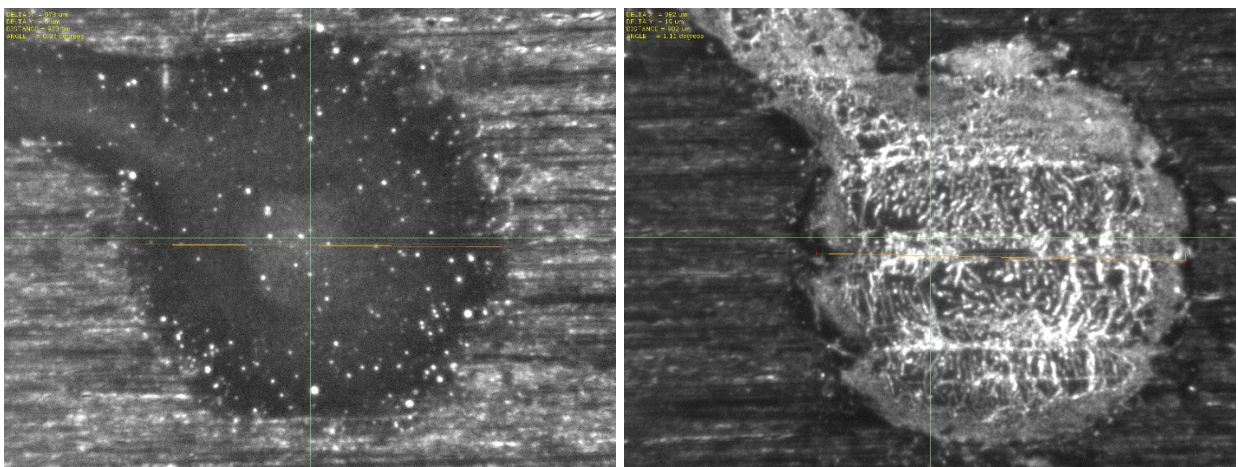


Figura 6.1 – A sinistra un microelettrodo in argento dopo una sola passata, a destra un microelettrodo dopo la seconda stampa.

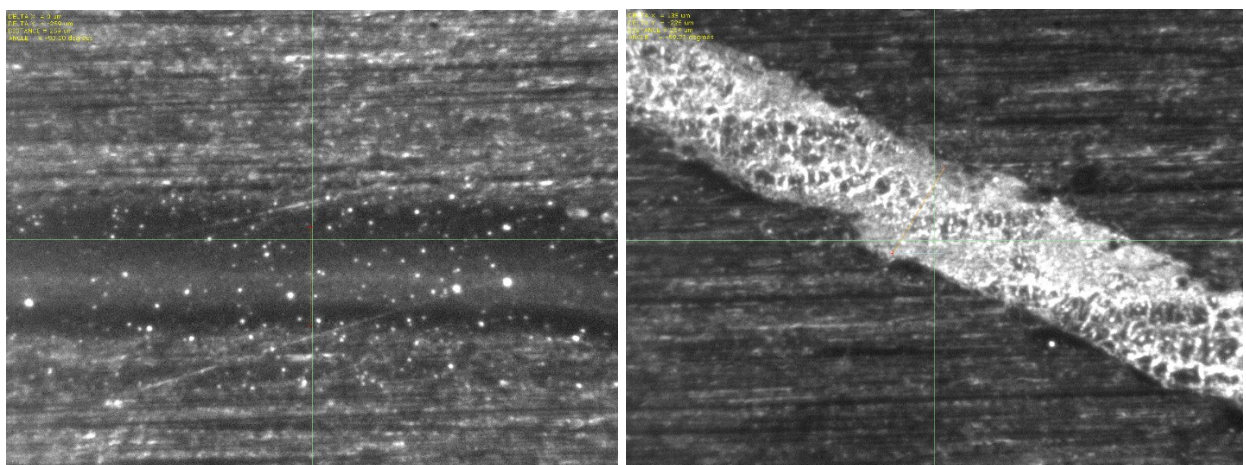


Figura 6.2 – A sinistra una traccia in argento dopo la prima stampa, a destra un'altra dopo la seconda.

Confermata l'integrità e la correttezza della geometria riportata sul sensore, quest'ultimo ha subito il processo di *curing*, dopo il quale ci si è sincerati che il *MEA* non avesse subito danni durante la



sinterizzazione e gli spostamenti. Per fare questo è stato utilizzato il microscopio portatile digitale inskam, con cui sono poi state scattate anche delle foto di testimonianza (Figure 6.3 e 6.4). Come è possibile vedere dalle Figure 6.3 e 6.4 sottostanti, infatti, tutte le sezioni riportate del *MEA* apparivano prive di interruzioni o compromissioni; i segni che si possono notare su microelettrodi, *pads* ed elettrodo di riferimento sono stati causati dalla caratterizzazione elettrica (che verrà illustrata nella sezione seguente), che allo scattare delle foto era stata appena effettuata.

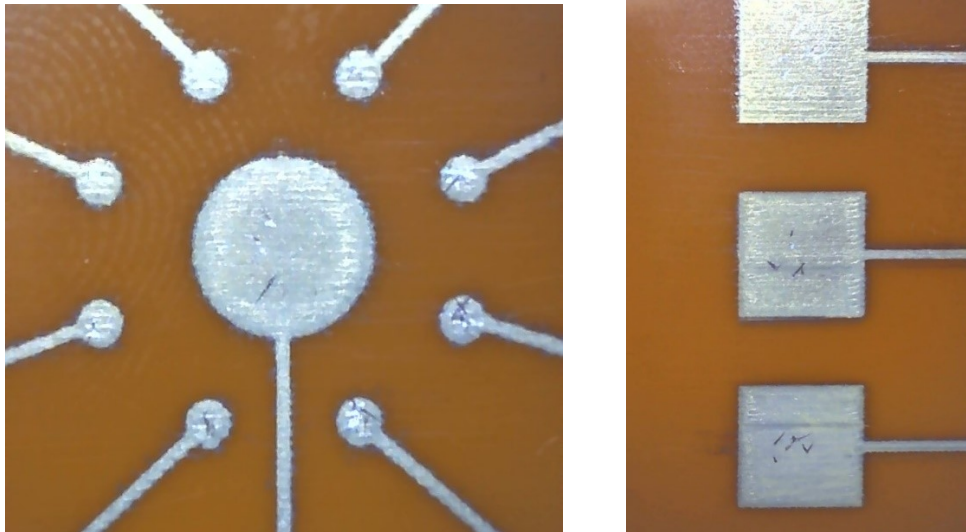


Figura 6.3 – Sulla sinistra viene riportata la sezione centrale del *MEA*, in cui sono visibili i microelettrodi di lavoro ed il controelettrodo; sulla destra è invece possibile vedere le piastre di collegamento con l'esterno.

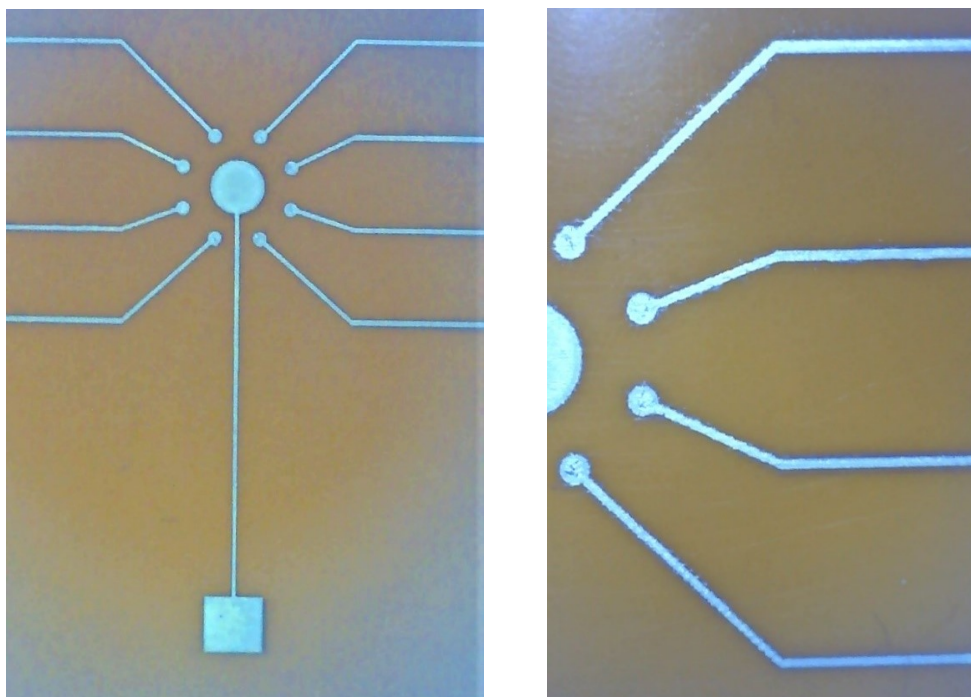


Figura 6.4 – Vista della sezione centrale del *MEA* sulla sinistra; immagine che raffigura quattro linee di conduzione ed i rispettivi microelettrodi sulla destra.

## 6.2 Caratterizzazione elettrica – caratterizzazione funzionale

Dopo aver verificato continuità e completezza del sensore con la caratterizzazione ottica, si è passato alla prima parte del suo controllo funzionale con la caratterizzazione elettrica.

L'obiettivo di questo stadio è verificare che le linee di conduzione conducano e non generino un'impedenza troppo alta: dei valori considerati accettabili sono solitamente sotto i 300-400  $\Omega$ , e più bassi sono maggiore sarà l'ampiezza del segnale registrato (minore riduzione di ampiezza dovuta alla resistenza della traccia conduttrice).

Per comprendere a quali elettrodi ci si riferirà nel corso della caratterizzazione, verrà introdotta qui una convenzione, rappresentata in Figura 6.5, nella quale i microelettrodi di lavoro sono stati numerati dall'1 all'8 partendo dall'alto e il contro elettrodo centrale ha mantenuto il suo nome.

Anche le tracce, per comodità, verranno d'ora in poi identificate col numero o nome del microelettrodo a cui si riferiscono.

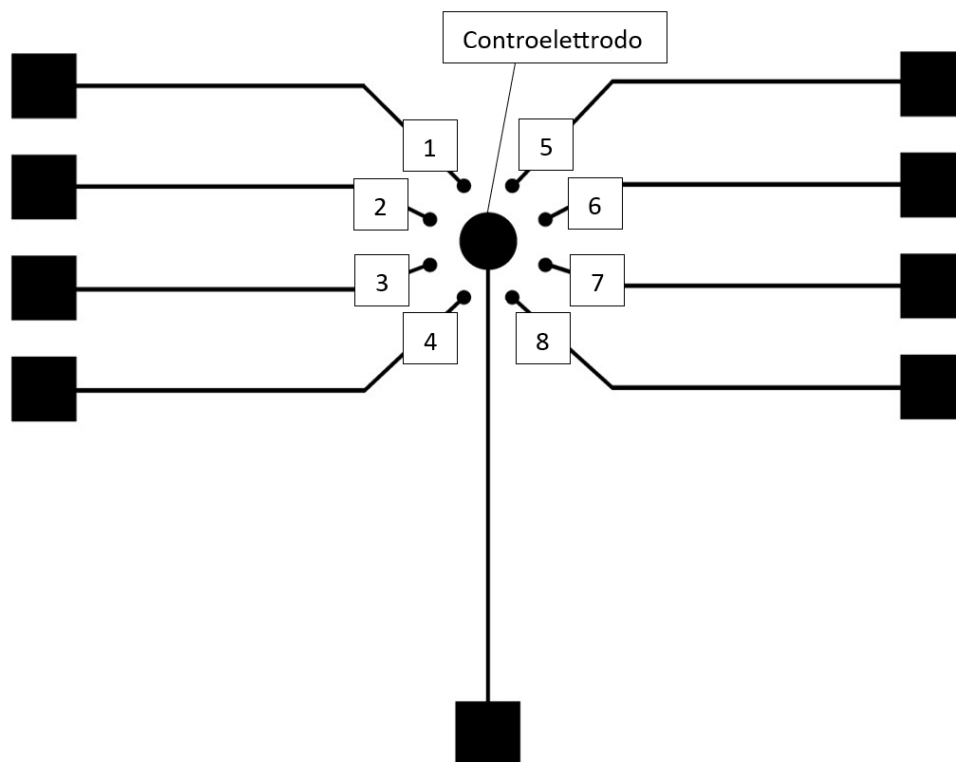


Figura 6.5 – Legenda elettrodi che verrà utilizzata d'ora in poi nella trattazione.

Per questa caratterizzazione sono stati analizzati due *MEA* stampati con stessa geometria.

I risultati del lavoro svolto sono riportati nelle Tabelle 6.1 e 6.2.

Per verificare la conduttività delle tracce metalliche è necessario avere tensione nulla su ognuna di esse, condizione confermata in entrambi i *MEA* dopo aver testato il voltaggio di ogni traccia con un multimetro digitale.

Fatto questo, si è passati alla verifica più importante per questo tipo di caratterizzazione: il controllo dei valori d'impedenza di ogni traccia utilizzando un multimetro.

Come da protocollo, sono state effettuate cinque misurazioni per ogni traccia, per un totale di quarantacinque (nove elettrodi, cinque misurazioni l'uno) misurazioni per ogni *MEA*.

Viene riportata in Figura 6.6 una foto fatta durante il processo di misura. [41]

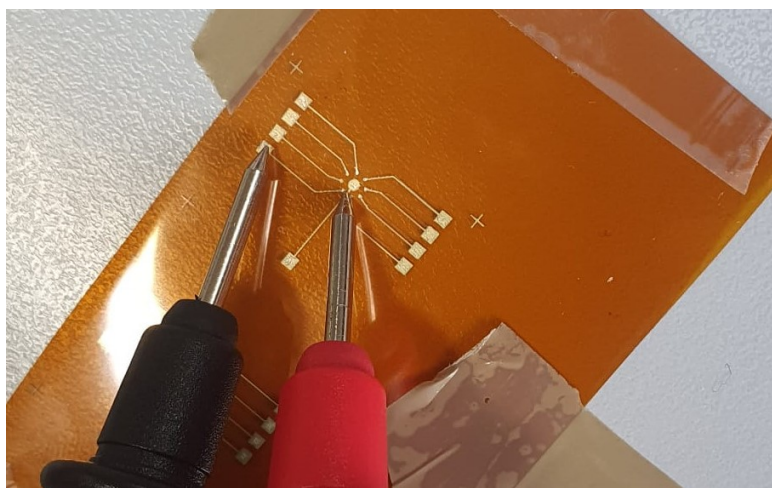


Figura 6.6 – Misurazione dell'impedenza e della tensione delle varie tracce.

Viene di seguito riportato ciò che è emerso dalla caratterizzazione elettrica dei due sensori.

IMPEDENZA GEOMETRIA CORRETTA 1 (9x7 cm)						
Elettrodo	Misura 1 (Ohm)	Misura 2 (Ohm)	Misura 3 (Ohm)	Misura 4 (Ohm)	Misura 5 (Ohm)	MEDIA
1	6,6	6,8	6,6	6,7	6,7	6,68
2	6	6	6,1	6,1	6,1	6,06
3	5,9	5,9	6	5,9	5,9	5,92
4	6,7	6,9	6,8	6,8	6,8	6,8
5	6,7	6,75	6,8	6,8	6,7	6,75
6	5	5	4,8	4,8	4,9	4,9
7	5,5	5,6	5,5	5,5	5,6	5,54
8	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	6,14
Controelettrodo	6,8	6,85	6,9	6,9	6,75	6,84

Tabella 6.1 – Tabella che riporta i valori di impedenza di tutte le tracce del primo *MEA* considerato.

Come è possibile vedere dalla tabella precedente (Tabella 6.1), il primo *MEA* analizzato presentava dei valori di impedenza molto bassi (mediamente inferiori a 10  $\Omega$ ) e stabili nel tempo (più misurazioni davano sempre circa lo stesso valore di impedenza), due caratteristiche elettriche particolarmente desiderabili per un sensore con prestazioni ottimali.

Rappresentando graficamente le rilevazioni fatte (Figura 6.6), risulta ancora più evidente la stabilità dell'impedenza di ogni traccia.

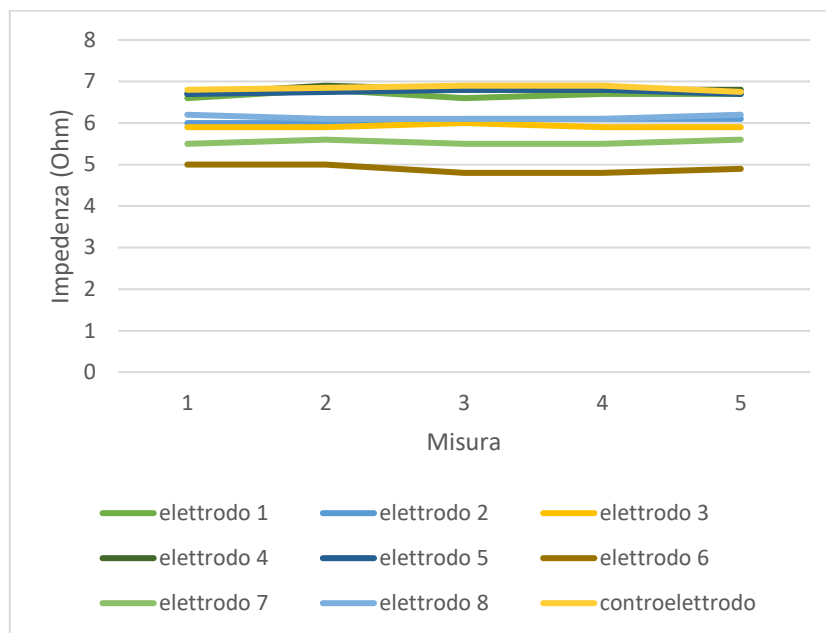


Figura 6.6 – Grafico che mostra l'andamento dell'impedenza di tutte le tracce.

Per quanto riguarda il secondo *MEA*, invece, i valori raccolti vengono riportati nella Tabella 6.2.

IMPEDENZA GEOMETRIA CORRETTA 2 (9x7 cm)						
Elettrodo	Misura 1 (Ohm)	Misura 2 (Ohm)	Misura 3 (Ohm)	Misura 4 (Ohm)	Misura 5 (Ohm)	MEDIA
1	8,1	8,2	8,1	8,2	8,15	8,15
2	14,2	14,2	14,4	14,2	14,4	14,28
3	73,1	72,7	71,2	73	72,6	72,52
4	10,4	10,6	12,1	10,4	10,7	10,84
5	72,2	72,1	72,2	72,2	72,1	72,16
6	20,4	20,3	20,3	20,5	20,5	20,4
7	14,9	15	14,9	15	14,9	14,94
8	8,1	8,3	8,1	8,3	8,1	8,18
Controelettrodo	66	66,1	66,1	66,4	66,4	66,2

Tabella 6.2 – Tabella che riporta i valori di impedenza di tutte le tracce del secondo *MEA*.

In questo caso i valori di impedenza ottenuti sono comunque buoni, ma non ottimali.

Per alcune tracce, tra cui quella del controelettrodo, l'impedenza sviluppata è infatti più elevata di quella attesa (oltre i 70  $\Omega$ ), interferendo col segnale più del dovuto. Inoltre, le fluttuazioni dei

valori nel tempo sono più consistenti del caso precedente, tanto da creare degli *outliers* (scostamenti di  $0,5 \Omega$  o più dal valore medio) evidenziati in giallo nella Tabella 6.2.

Queste anomalie derivano probabilmente da una disomogenea distribuzione dell'inchiostro durante la stampa.

Nonostante le rilevazioni non ottimali rispetto al primo caso, anche questo sensore è stato considerato buono ed utilizzabile, in funzione della semi-costanza delle misure nel grafico riportato in Figura 6.7.

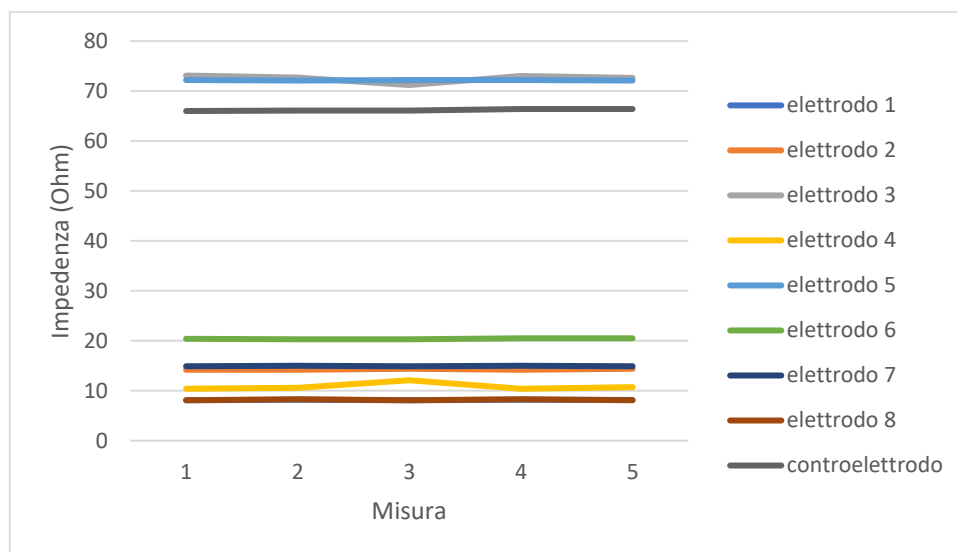


Figura 6.7 – Grafico che mostra l'andamento dell'impedenza di tutte le tracce alle varie misure.

È particolarmente evidente dal grafico la differenza dei valori di impedenza sviluppati dalle varie tracce: tali differenze non costituiscono un grosso problema se contenute nei  $200-300 \Omega$ , in quanto stanno semplicemente ad indicare che su alcune tracce è stata depositata una quantità di prodotto maggiore rispetto alle altre.

### 6.3 Caratterizzazione elettrofisiologica – caratterizzazione funzionale

Dopo aver confermato l'integrità del sensore e la conduttività delle sue tracce, si è proceduto a verificare che il *MEA* svolgesse adeguatamente le due attività per cui era stato creato: la misura d'impedenza ed il monitoraggio di PA di un medium cellulare.

Questo è stato possibile grazie alla caratterizzazione elettrofisiologica, con cui è stata verificata la capacità del sensore di svolgere questi compiti.

Al fine di facilitare la sezione successiva, vengono di seguito introdotti alcuni strumenti utilizzati per queste misurazioni.

Primo fra tutti, per l'*impedance based analysis*, è stato impiegato un circuito (rappresentato in Figura 6.8 con le specifiche di tutte le sue componenti) realizzato dai ricercatori dell'EPFL in grado di compiere automaticamente la spettroscopia di impedenza a due o quattro fili di un mezzo. [42]

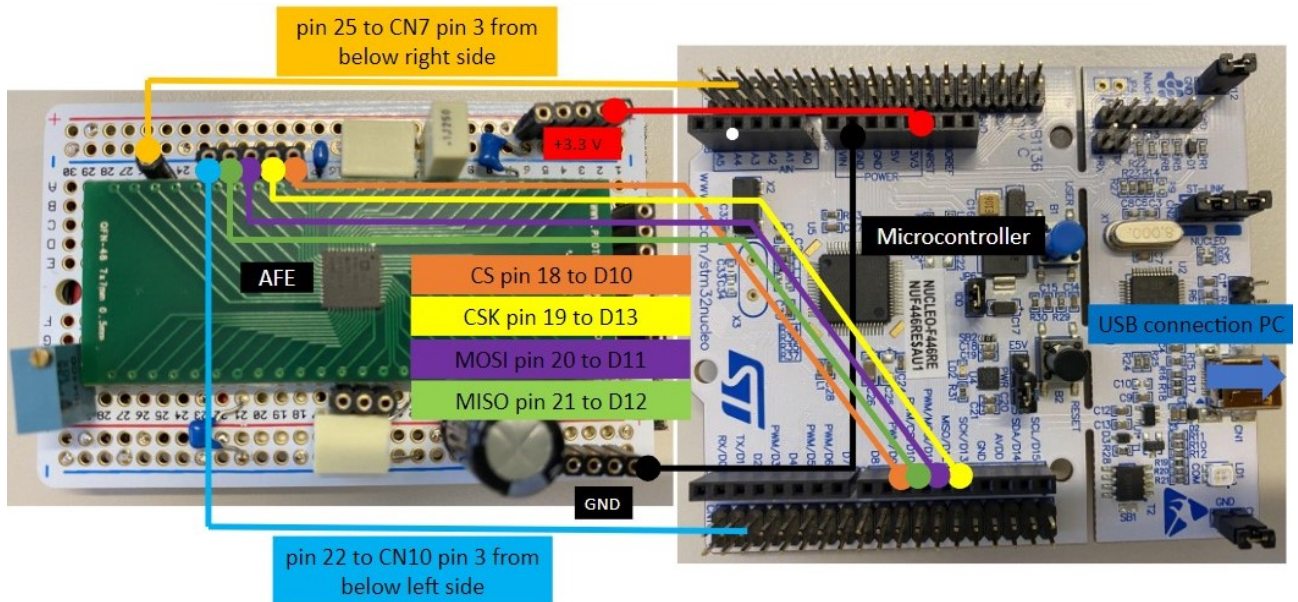


Figura 6.8 – Analizzatore d'impedenza con le sue componenti.

Questo circuito, dopo essere stato opportunamente collegato al sensore stampato (collegamenti visibili in Figura 6.9), inviava agli elettrodi degli impulsi in corrente sinusoidali con frequenza crescente dai 100 ai 10000 Hz.

Il circuito poi, se collegato ad un *personal computer* con installato un software per la lettura e registrazione dei dati (in questa esperienza è stato scelto il software CoolTerm, che consente anche la visualizzazione in tempo reale dei dati raccolti), consentiva di calcolare e inviare al PC i valori di frequenza, ampiezza e fase di ogni impulso generato.[42]

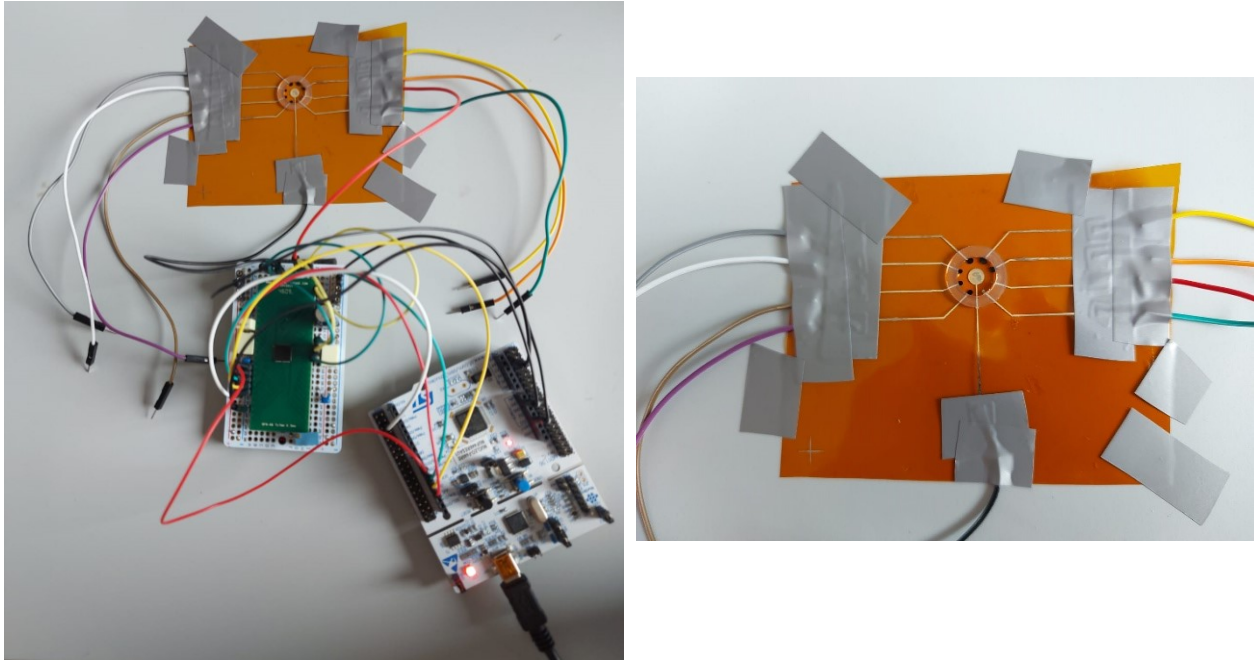


Figura 6.9 – A sinistra i collegamenti del sensore con l’analizzatore di impedenza, a destra un close-up sul sensore pronto per la misurazione (con tutte le attrezzature del caso).

Per la misura del potenziale d’azione sono stati invece impiegati due strumenti più comuni, un generatore di segnali che simulava la variazione di potenziale data dalla depolarizzazione della membrana cellulare e la applicava al mezzo, ed un oscilloscopio digitale in grado di captare il PA simulato e memorizzarlo su un supporto USB.

Risulta inoltre essenziale sapere che il sensore utilizzato in questa caratterizzazione è lo stesso di quelle precedenti, ma che è stato preparato a dovere per affrontare le numerose misurazioni del caso. Le superfici degli elettrodi dal primo al quarto sono state infatti modificate con del PEDOT, il quinto e il sesto elettrodo hanno subito la deposizione di inchiostro a nanoparticelle di carbonio, mentre il settimo e l’ottavo sono stati lasciati senza copertura (in argento).

Il sensore ha subito inoltre delle modifiche strutturali: sono stati applicati dei cavi per il collegamento alla strumentazione su ciascuna piazzola tramite del nastro adesivo conduttivo e sono stati poi fissati tramite del nastro isolante. Questa modalità è stata adottata per impedire spostamenti dei conduttori e per isolare al meglio il circuito.

Come è possibile vedere in Figura 6.9, è stato poi impiegato del grasso alimentare (biocompatibile) per applicare un o-ring di 10 mm (vedi Figura 6.10) attorno ai microelettrodi, questo al fine di evitare la dispersione sulle tracce degli elettroliti utilizzati nelle varie misurazioni non essendo disponibile in loco la passivazione delle tracce. Infatti, se il mezzo fosse fuoriuscito dalla guarnizione andando a toccare le linee di conduzione (argomento già affrontato parlando di isolamento di linee di conduzione nel Capitolo 3, Sezione 3.3) avrebbe rischiato di decomporsi.



Figura 6.10 – Grasso alimentare (sinistra) utilizzato per attaccare l'O-ring (destra) al sensore.

Dopo aver introdotto la strumentazione impiegata ed aver spiegato come è stato preparato il sensore per le misurazioni, è possibile passare alla trattazione delle misure vere e proprie.

Seguendo il protocollo si sono infatti svolte due attività per portare a termine questo tipo di caratterizzazione:

1. Analisi di impedenza del mezzo di simulazione di coltura cellulare.
2. Registrazione del PA del mezzo di simulazione di coltura cellulare.

Verranno di seguito illustrate le procedure seguite per entrambe le caratterizzazioni e verranno successivamente esposti i risultati ottenuti da tali analisi.

### 6.3.1 Spettroscopia d'impedenza

L'attività più consistente dello studio è stata l'analisi di impedenza di diversi tipi di elettroliti e mezzi, portata avanti grazie all'analizzatore di impedenza esposto nella sezione precedente. Gli step per la caratterizzazione sono stati svolti seguendo le indicazioni fornite dal protocollo [41] e prevedevano la misurazione sequenziale dell'impedenza di diversi tipi di soluzioni, come di seguito descritto:

1. Misura d'impedenza di una semplice soluzione PBS (i.e. *Phosphate Buffered Saline*, soluzione tampone utilizzata in ricerca biologica) attraverso ogni elettrodo di lavoro del sensore (PEDOT, carbonio e argento); sono state effettuate otto misurazioni totali.
2. Misura d'impedenza di una soluzione salina a quattro diverse concentrazioni attraverso ogni elettrodo; sono state effettuate quattro misurazioni per elettrodo, quindi trentadue misurazioni totali.

Le concentrazioni della soluzione di NaCl utilizzate sono state:



- Soluzione con NaCl a 0.01 mol/L (= 10 mM)
  - Soluzione con NaCl a 0.1 mol/L (= 100 mM)
  - Soluzione con NaCl a 0.5 mol/L (= 500 mM)
  - Soluzione con NaCl a 1 mol/L (= 1 M)
3. Misura d'impedenza di uno strato di gelatina a due densità diverse con soluzione PBS attraverso ogni elettrodo di lavoro; sono state effettuate due misurazioni (una per la gelatina meno densa, una per la più densa) per ogni elettrodo, quindi sedici misurazioni totali.
  4. Misura d'impedenza di uno strato di gelatina su cui è stata depositata a turno la soluzione salina a quattro diverse concentrazioni (quelle specificate al punto 2) attraverso ogni elettrodo; sono state effettuate quattro misurazioni per elettrodo, quindi trentadue misurazioni totali.

La scelta delle diverse tipologie di mezzo doveva simulare le diverse condizioni in cui può presentarsi una cellula, per questo, oltre alla soluzione tampone e alla soluzione salina che dovevano simulare le diverse possibili concentrazioni e composizioni del citosol, è stata applicata sulla zona degli elettrodi della gelatina alimentare per simulare la membrana plasmatica di una cellula.

Dopo aver operato tutte le misurazioni con il setup precedentemente esposto, si è passati all'estrazione e rielaborazione dei dati con l'ausilio del software MATLAB, utile per il calcolo numerico e l'analisi di segnali.

Essendo i campioni raccolti dal circuito di misura all'interno del range considerato non uniformi, ma concentrati alle basse frequenze, per ogni tipo di misurazione frequenze e campioni sono stati opportunamente scalati e di seguito ne vengono riportati modulo e fase nei vari casi.

Premesso questo, verranno ora esposti i risultati emersi dalla caratterizzazione tramite spettroscopia d'impedenza.

Partendo dalla misura di impedenza fatta su semplice PBS, nella Figura 6.11 vengono riportati modulo e fase delle rilevazioni ottenute con i vari tipi di microelettrodi.

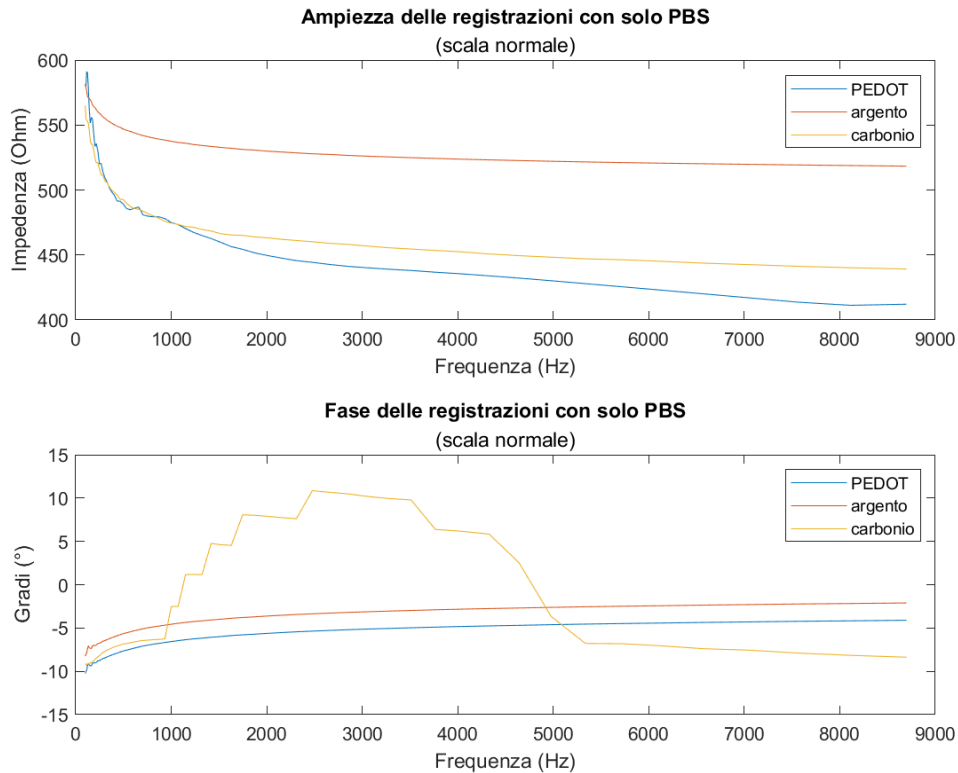


Figura 6.11 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su PBS.

Dalle rappresentazioni grafiche è possibile constatare come l'impedenza registrata dagli elettrodi la cui superficie era stata modificata con carbonio e/o PEDOT risulti minore (403,05 Ohm e 459,15 Ohm contro 531,66 Ohm, come è visibile in Figura 6.12), confermando che aggiungendo uno strato resistivo all'elettrodo il valore di impedenza misurato si abbassi (vedi Capitolo 3, Sezione 3.4).

Inoltre, è possibile rilevare che, all'aumentare della frequenza, l'impedenza tende a diminuire verso un valore limite asintotico.

Per quanto riguarda la fase, ci si aspetterebbe (grazie a ciò che è stato dedotto dalla letteratura) una fase costante a zero, che ritroviamo più o meno corretta in tutti casi, con piccole variazioni dovute alla strumentazione.

Media del segnale raccolto dall'elettrodo in PEDOT in presenza di PBS: 403.0486 Ohm  
 Media del segnale raccolto dall'elettrodo in carbonio in presenza di PBS: 459.1525 Ohm  
 Media del segnale raccolto dall'elettrodo in argento in presenza di PBS: 531.6559 Ohm

Figura 6.12 – Media dei vari segnali ricavati dalla spettroscopia dai microelettrodi per il PBS.

Verranno ora esposti i risultati dell'analisi di impedenza fatta su soluzione salina alle concentrazioni precedentemente introdotte. In questo caso, per ogni tipo di microelettrodo, i

dati sono stati organizzati in modo da avere due grafici, uno per il modulo ed uno per la fase, ed in ciascuno di questi compariranno i valori d'impedenza della soluzione alle varie concentrazioni (per lo specifico tipo di elettrodo).

Tali evidenze sono rappresentate nelle Figure 6.14 (elettrodi ricoperti in PEDOT), 6.15 (elettrodi ricoperti in carbonio) e 6.16 (elettrodi in argento).

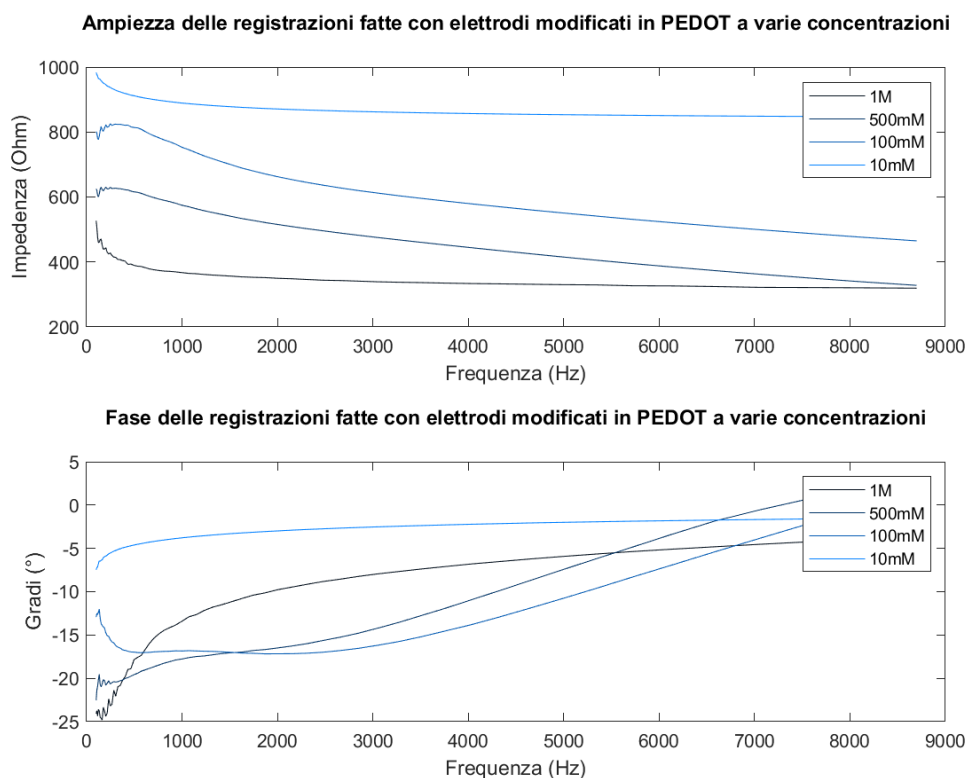
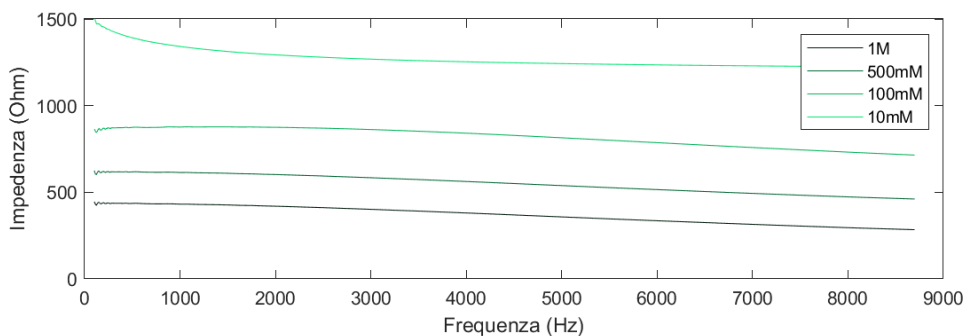


Figura 6.14 – Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su soluzione salina a varie concentrazioni da elettrodi in PEDOT.

**Ampiezza delle registrazioni fatte con elettrodi modificati con carbonio a varie concentrazioni**



**Fase delle registrazioni fatte con elettrodi modificati con carbonio a varie concentrazioni**

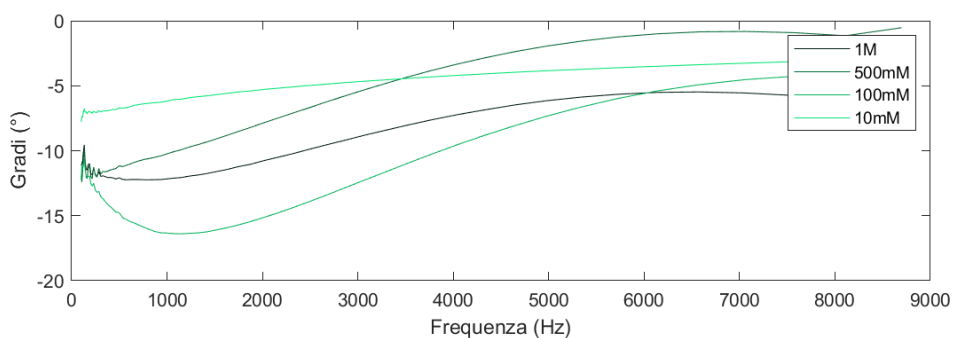
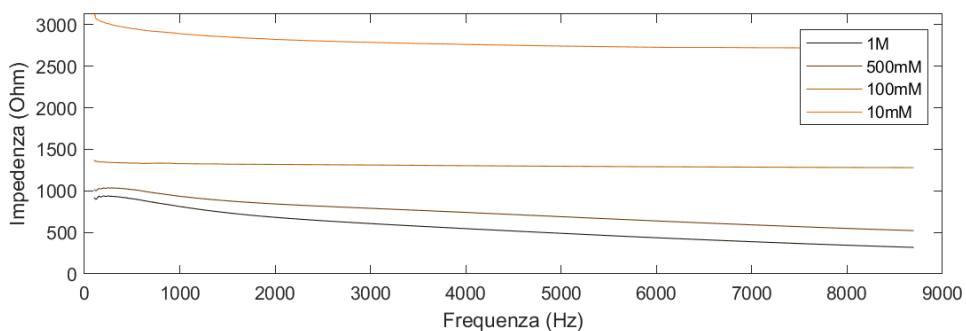


Figura 6.15 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su soluzione salina a varie concentrazioni da elettrodi in carbonio.

**Ampiezza delle registrazioni fatte con elettrodi in argento a varie concentrazioni**



**Fase delle registrazioni fatte con elettrodi in argento a varie concentrazioni**

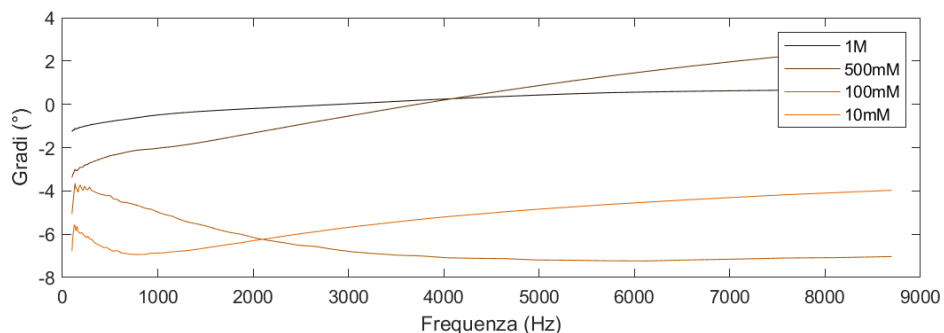


Figura 6.16 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su soluzione salina a varie concentrazioni da elettrodi in argento.

Analizzando i grafici sopra esposti, viene confermato quanto detto precedentemente, ovvero che la copertura in carbonio o PEDOT garantisce lo sviluppo di un'impedenza generalmente minore di quella generata dall'elettrodo non modificato (argento). A favore di questo vengono inoltre riportati in Figura 6.17 i valori ricavati tramite una rapida analisi quantitativa dei vari segnali in MATLAB, con cui analizzando i valori massimi dei vari segnali è possibile notare la sostanziale differenza di ampiezze misurate con elettrodi modificati e non.

Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in PEDOT a concentrazione 1M:	527.0342 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in carbonio a concentrazione 1M:	445.3638 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento a concentrazione 1M:	940.3713 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in PEDOT a concentrazione 500mM:	630.3451 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in carbonio a concentrazione 500mM:	624.7572 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento a concentrazione 500mM:	1036.4729 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in PEDOT a concentrazione 100mM:	825.2299 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in carbonio a concentrazione 100mM:	878.0009 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento a concentrazione 100mM:	1373.9004 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in PEDOT a concentrazione 10mM:	983.1535 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo ricoperto in carbonio a concentrazione 10mM:	1500.4299 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento a concentrazione 10mM:	3125.8781 Ohm

Figura 6.17 – Massimi dei vari segnali ricavati dalla spettroscopia, raggruppati per concentrazione.

Dai grafici è inoltre possibile notare come il modulo dell'impedenza dei vari segnali aumenti al diminuire della concentrazione della soluzione: questo è dovuto alla presenza di cariche libere (gli ioni che determinano appunto la concentrazione) che, essendo in numero via via inferiore nelle soluzioni a minore concentrazione, comportano una conducibilità sempre minore del mezzo, condizione che determina il conseguente aumento dell'impedenza misurata.

Infine, nei grafici di fase è possibile notare come i valori siano tutti intorno allo zero, per quanto con andamenti diversi.

Vengono ora presentati i test effettuati con liquido ed aggiunta di gelatina, in grado di simulare la membrana plasmatica cellulare. Quest'ultima, essendo approssimabile ad un parallelo tra resistenza e capacità (come è stato visto nei modelli equivalenti elettrodo-pelle riportati nel Capitolo 1), andrà sicuramente ad aumentare il valore in modulo dell'impedenza misurata.

In Figura 6.18 viene riportato il confronto tra le acquisizioni fatte su PBS singolo e su PBS con gelatine a due differenti densità.

Qui è possibile constatare come il solo PBS garantisca un'impedenza minore rispetto a quella che si realizza dall'analisi di entrambe le gelatine con PBS, le quali presentano a loro volta un

valore d'impedenza diverso a seconda della densità della gelatina utilizzata: infatti, nel caso di analisi della gelatina a densità maggiore l'impedenza è risultata essere più elevata rispetto a quelli rilevati in presenza gelatina a densità minore.

La fase si mantiene invece piuttosto stabile, fatti salvi alcuni salti di qualche grado, e all'aumentare della frequenza tende al valore limite zero.

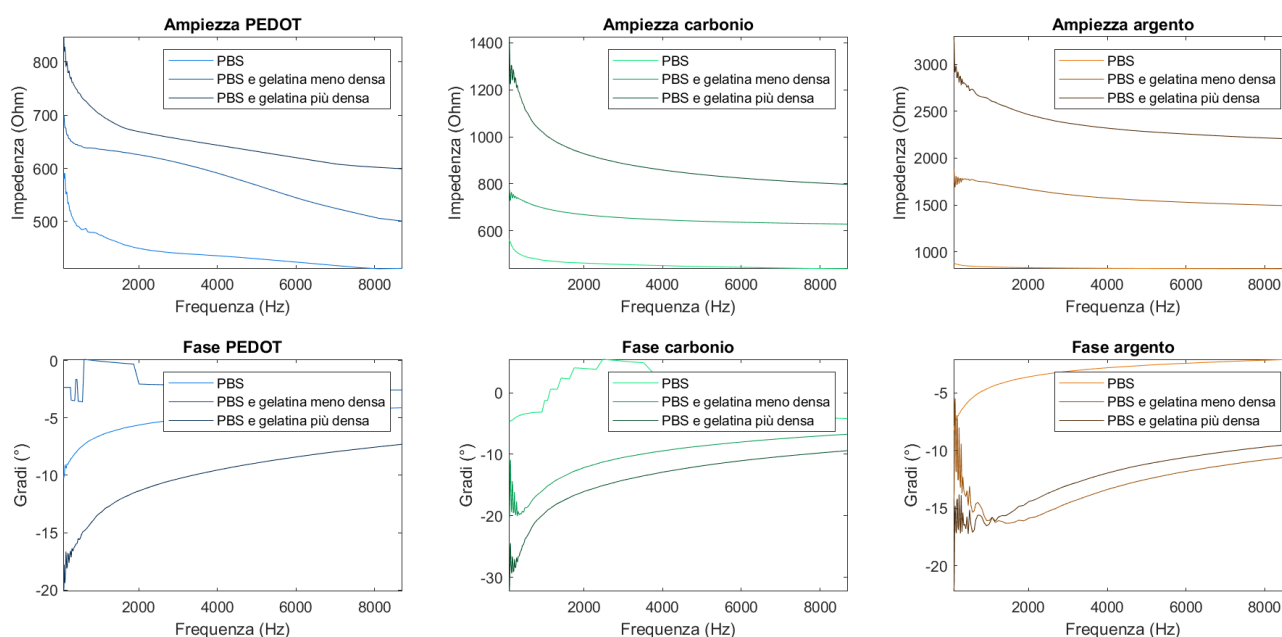


Figura 6.18 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su solo PBS, gelatina densa e PBS e gelatina meno densa e PBS messi a confronto.

Quanto detto viene confermato anche dall'analisi dei massimi dei vari segnali (in Figura 6.19), che riconfermano come utilizzando un elettrodo non modificato (quello in argento) si abbia un aumento sostanziale d'impedenza (valori in aumento dal 50 al 100%, 881.59 Ohm per solo PBS, 1881,48 Ohm per gelatina meno densa e PBS e 3297,57 Ohm per gelatina più densa e PBS) rispetto all'utilizzo di elettrodi modificati.

Massimo del segnale con PBS con elettrodo modificato in PEDOT:	591.1639 Ohm
Massimo del segnale con PBS con elettrodo modificato in carbonio:	565.0482 Ohm
Massimo del segnale con PBS con elettrodo in argento:	881.5919 Ohm
Massimo del segnale con gelatina meno densa e PBS con elettrodo modificato in PEDOT:	700.8708 Ohm
Massimo del segnale con gelatina meno densa e PBS con elettrodo modificato in carbonio:	777.3328 Ohm
Massimo del segnale con gelatina meno densa e PBS con elettrodo in argento:	1881.4838 Ohm
Massimo del segnale con gelatina più densa e PBS con elettrodo modificato in PEDOT:	847.3884 Ohm
Massimo del segnale con gelatina più densa e PBS con elettrodo modificato in carbonio:	1425.8886 Ohm
Massimo del segnale con gelatina più densa e PBS con elettrodo in argento:	3297.5707 Ohm

Figura 6.19 – Massimi dei vari segnali ricavati dalla spettroscopia, raggruppati per tipo di mezzo utilizzato.

Infine, vengono illustrati i risultati ottenuti dall'analisi di impedenza di gelatina e soluzione salina alle diverse concentrazioni.

In Figura 6.20 sono riportati modulo e fase di gelatina e soluzione salina alle varie concentrazioni registrata con microelettrodi modificati in PEDOT, nella Figure 6.21 quelli di gelatina e soluzioni varie ottenuti con microelettrodi modificati in carbonio, nella Figura 6.22 quelli di gelatina e soluzioni registrati da microelettrodi in argento non modificati.

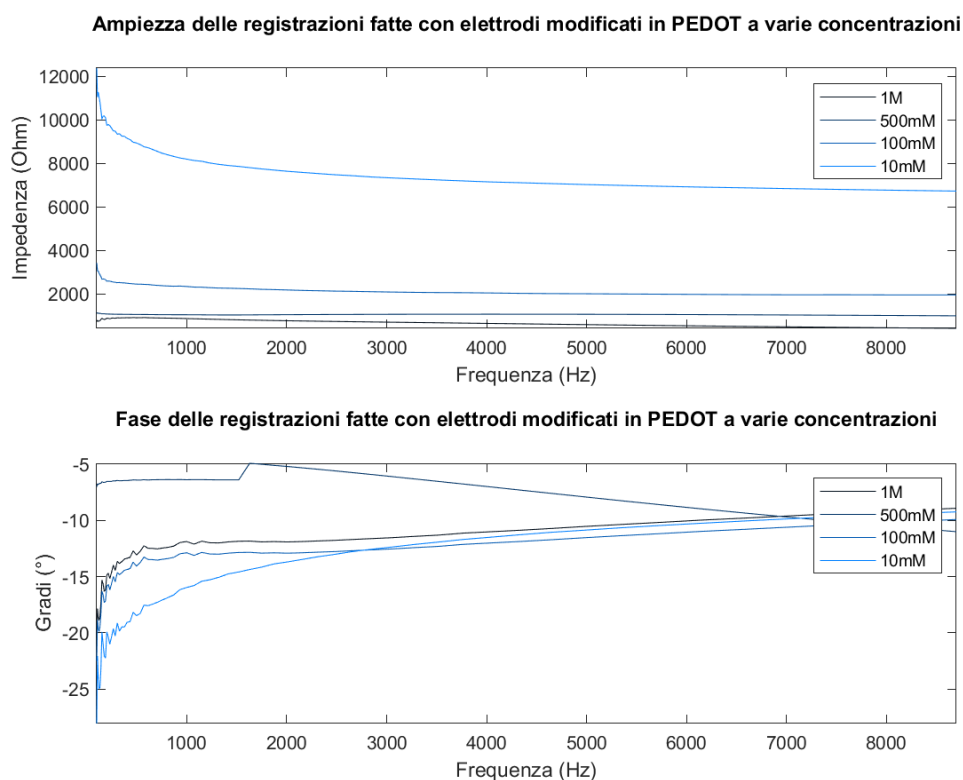
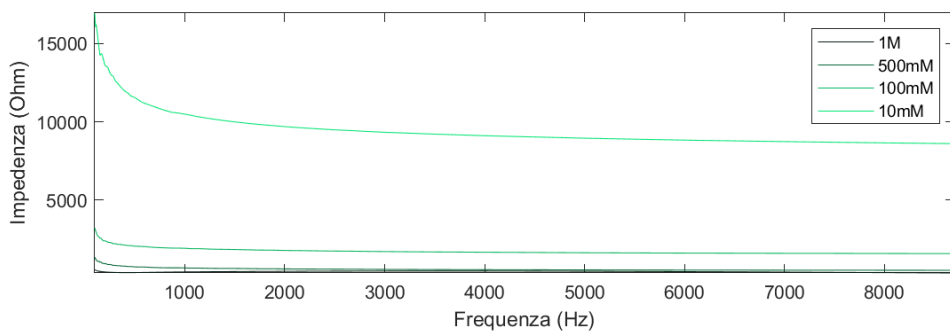


Figura 6.20 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su gelatina e soluzione salina a varie concentrazioni da elettrodi in PEDOT.

**Ampiezza delle registrazioni fatte con elettrodi modificati con carbonio a varie concentrazioni**



**Fase delle registrazioni fatte con elettrodi modificati con carbonio a varie concentrazioni**

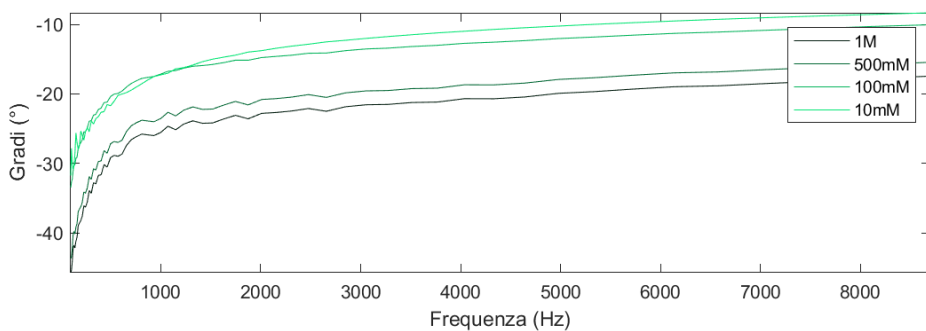
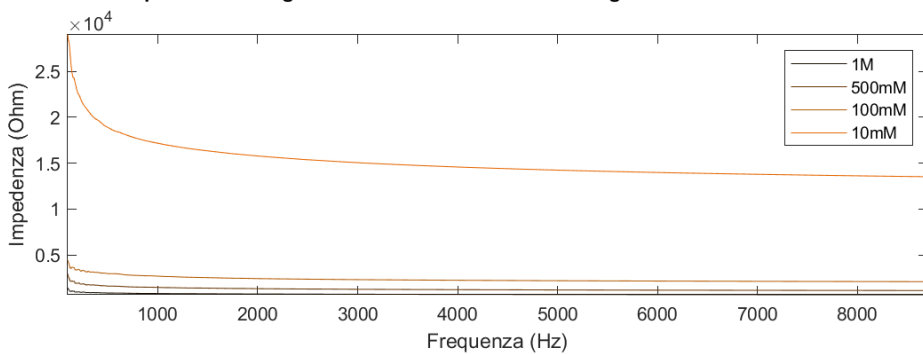


Figura 6.21 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su gelatina e soluzione salina a varie concentrazioni da elettrodi in PEDOT.

**Ampiezza delle registrazioni fatte con elettrodi in argento a varie concentrazioni**



**Fase delle registrazioni fatte con elettrodi in argento a varie concentrazioni**

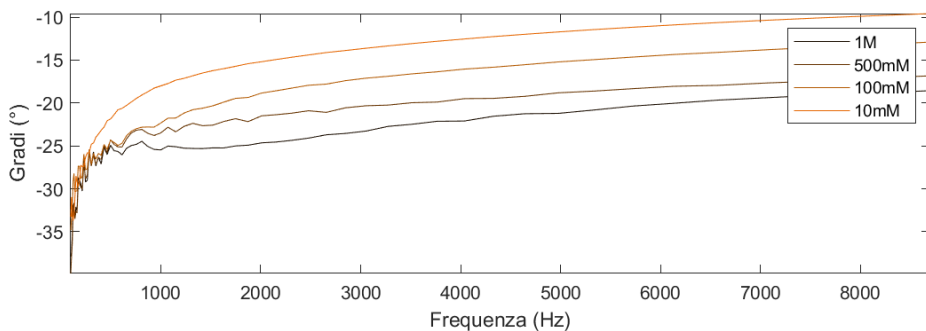


Figura 6.22 - Andamento del modulo e della fase dell'impedenza misurata su gelatina e soluzione salina a varie concentrazioni da elettrodi in PEDOT.



Osservando i grafici possiamo notare come tutte le informazioni ricavate in precedenza abbiano validità, e in particolare come più la concentrazione si abbassa più i valori di impedenza si alzano, con valori molto più alti in modulo rispetto a quelli registrati per le concentrazioni in assenza di gelatina. Questo è dovuto proprio alla maggiore difficoltà che i vari segnali di test inviati hanno nell'attraversare lo strato simulante la membrana.

Nella Figura 6.23 vengono riportati i valori di massimo trovati per i vari segnali raccolti in questa fase, che confermano quanto detto.

Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in PEDOT con gelatina a concentrazione 1M:	916.7026 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in carbonio con gelatina a concentrazione 1M:	538.2282 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento con gelatina a concentrazione 1M:	1409.0802 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in PEDOT con gelatina a concentrazione 500mM:	1154.4253 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in carbonio con gelatina a concentrazione 500mM:	1349.3342 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento con gelatina a concentrazione 500mM:	2930.1346 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in PEDOT con gelatina a concentrazione 100mM:	3427.0161 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in carbonio con gelatina a concentrazione 100mM:	3229.5725 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento con gelatina a concentrazione 100mM:	4408.6201 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in PEDOT con gelatina a concentrazione 10mM:	12368.8143 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in carbonio con gelatina a concentrazione 10mM:	16955.9623 Ohm
Massimo del segnale raccolto dall'elettrodo in argento con gelatina a concentrazione 10mM:	28983.2318 Ohm

Figura 6.23 - Massimi dei vari segnali ricavati dalla spettroscopia, raggruppati per concentrazione.

Si riassumono infine le informazioni ricavate dalla caratterizzazione per spettroscopia d'impedenza appena esposta:

- l'impedenza maggiore è stata registrata dagli elettrodi in solo argento, mentre quelli che avevano subito deposizione di carbonio o PEDOT avevano valori minori e più stabili;
- con l'aggiunta della gelatina i valori di impedenza sono aumentati a parità di soluzione utilizzata;
- con la diminuzione del contenuto ionico di una soluzione diminuiva anche la sua conducibilità, portando ad un aumento dell'impedenza registrata.

### 6.3.2 Registrazione del PA cellulare

Completata la parte di caratterizzazione elettrofisiologica dedicata alla spettroscopia d'impedenza, si è proceduto alla rilevazione di un PA simulato.

Per fare questo è stato scelto, tra quelli disponibili, un segnale che simulasse la depolarizzazione di membrana di una cellula neuronale, e collegando dei cavi al generatore questo segnale è stato iniettato nel mezzo a contatto coi microelettrodi del sensore.

Il mezzo scelto per questa attività è stato il PBS prima senza e poi con gelatina, scelta fatta per avere una soluzione neutra che potesse trasmettere il potenziale normalmente generato da movimenti ionici.

Le misurazioni del segnale recepito sono state fatte collegando ad un oscilloscopio digitale (KEYSIGHT DSOX1102G) i cavi di due microelettrodi alla volta (WE e RE), dal quale era possibile salvare in tempo reale le misurazioni fatte su una chiavetta USB.

L'oscilloscopio in questione ha raccolto il segnale con una frequenza di campionamento (sampling frequency) di 2000 Hz (2000 Sa/s).

Oltre al segnale misurato, è stato anche possibile salvare il segnale originale prodotto dal generatore per poter effettuare un confronto con quello acquisito.

Vengono mostrati in Figura 6.24 i risultati ottenuti dalla registrazione del PA tramite elettrodi in argento, modificati con PEDOT e con carbonio, su solo PBS, mentre nella Tabella 6.3 vengono riportati alcuni valori ricavati dall'analisi quantitativa del segnale raccolto dai vari elettrodi su solo PBS.

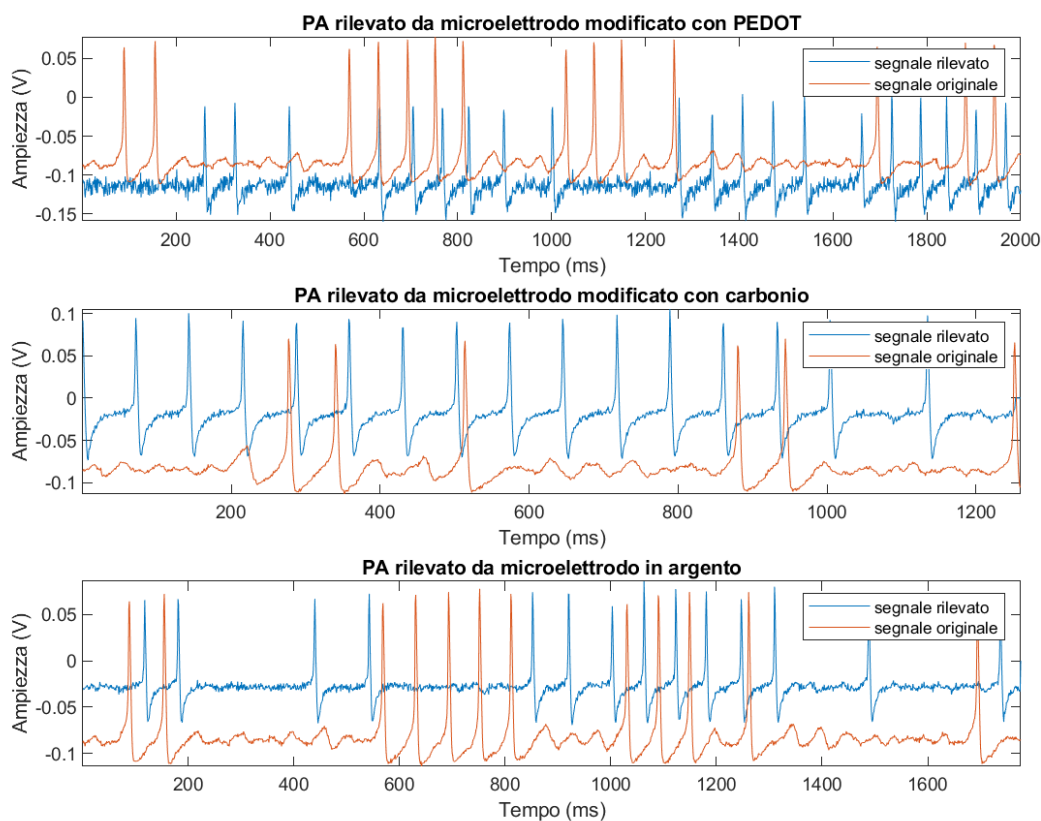


Figura 6.24 – Segnale rilevato (in blu) dai vari tipi di microelettrodi (PEDOT, carbonio, argento) confrontato con quello originale (in arancio) in presenza di PBS.

Ampiezza del segnale originale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	192,16 mV
Ampiezza del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	164,34 mV
Massimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	4,14 mV
Minimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	-160,21 mV
Offset del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	-114,07 mV
Ampiezza del segnale originale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	187,92 mV
Ampiezza del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	160,97 mV
Massimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	102,09 mV
Minimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	-58,88 mV
Offset del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	-20,29 mV
Ampiezza del segnale originale rilevato da elettrodo in argento	191,62 mV
Ampiezza del segnale rilevato da elettrodo in argento	145,34 mV
Massimo del segnale rilevato da elettrodo in argento	85,97 mV
Minimo del segnale rilevato da elettrodo in argento	-59,36 mV
Offset del segnale rilevato da elettrodo in argento	-28,68 mV

Tabella 6.3 – Valori ricavati dall’analisi quantitativa del segnale per un mezzo contenente solo PBS.

Osservando i segnali riportati nei vari grafici è immediato notare come la loro ampiezza sia minore di quella emessa del generatore. Conferma se ne ha dal confronto dei valori ricavati tramite l’analisi quantitativa del segnale in MATLAB, in cui si nota che l’ampiezza effettiva (164,34 mV per i microelettrodi ricoperti in PEDOT, 160,97 mV per i microelettrodi ricoperti in carbonio e 145,34 mV per quelli in argento) è circa l’85% di quella di origine (in modulo si aggirano tutti sui 190 mV, vedere la Tabella 6.3 per i valori specifici).

Tale scostamento è del tutto normale e dovuto all’effetto dell’impedenza di elettrodi e soluzione PBS.

Il segnale registrato dall’elettrodo in argento ha un’ampiezza leggermente inferiore (145,34 mV) di quella registrata dagli elettrodi che hanno subito deposizione (160,97 mV e 164,34 mV), a causa della maggiore impedenza generata da quest’ultimo.

Un offset di qualche mV è inoltre presente in tutti i segnali registrati, del tutto giustificabile in funzione delle condizioni in cui è stata effettuata la misura.

Vengono ora presentati i grafici riguardanti la registrazione del segnale tramite i vari microelettrodi in presenza di gelatina e PBS (Figura 6.25), e viene allegata la Tabella 6.4 contenente i valori più rappresentativi ottenuti dall’analisi del segnale tramite MATLAB.

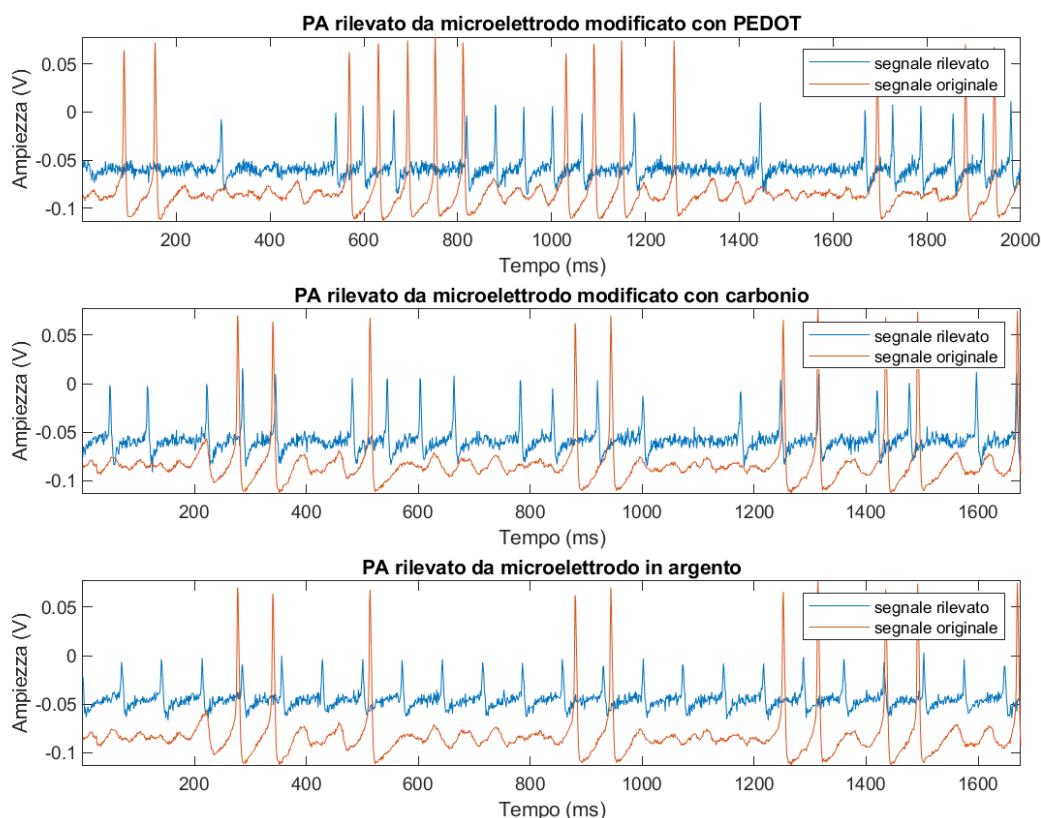


Figura 6.25 – Segnale rilevato (in blu) dai vari tipi di microelettrodi (PEDOT, carbonio, argento) confrontato con quello originale (in arancio) in presenza di gelatina e PBS.

Ampiezza del segnale originale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	191,96 mV
Ampiezza del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	99,05 mV
Massimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	11,07 mV
Minimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	-87,98 mV
Offset del segnale rilevato da elettrodo modificato con PEDOT	-59,97 mV
Ampiezza del segnale originale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	190,45 mV
Ampiezza del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	107,50 mV
Massimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	16,14 mV
Minimo del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	-91,36 mV
Offset del segnale rilevato da elettrodo modificato con carbonio	-58,44 mV
Ampiezza del segnale originale rilevato da elettrodo in argento	191,18 mV
Ampiezza del segnale rilevato da elettrodo in argento	69,79 mV
Massimo del segnale rilevato da elettrodo in argento	3,19 mV
Minimo del segnale rilevato da elettrodo in argento	-66,60 mV
Offset del segnale rilevato da elettrodo in argento	-47,03 mV

Tabella 6.4 – Valori ricavati dall'analisi quantitativa del segnale in presenza di gelatina e PBS.

I segnali nei grafici riportati in Figura 6.25 presentano un'ampiezza minore di quella ottenuta dai segnali registrati con solo PBS, oltre che di vari ordini di grandezza inferiori rispetto al segnale generato.

A riprova di ciò troviamo i valori raccolti nella Tabella 6.4.

Rispetto ai segnali originari, che si aggiravano sui 190 mV, quelli rilevati in uscita presentavano una riduzione variabile tra il 40 ed il 50% nel caso di microelettrodi in PEDOT e carbonio, e del 65% per gli elettrodi in argento puro.

Anche in questo caso risulta abbastanza marcata la differenza tra il segnale misurato da terminali in argento e microelettrodi modificati in PEDOT e carbonio, con un delta di 30-40 mV (l'elettrodo in argento ha ampiezza di 69,79 mV, quelli ricoperti in PEDOT e carbonio rispettivamente di 99,05 mV e 107,50 mV)

Si denota infine un offset più marcato rispetto al caso senza gelatina, di circa 50-60 mV, sempre dovuto alle condizioni ambientali e strumentali.

Avendo individuato tramite la valutazione dello spettro in frequenza in alcune registrazioni delle interferenze dovute probabilmente a rumore termico e circuitale, si è scelto di applicare a tutti i segnali raccolti un filtro digitale Butterworth di quart'ordine, passa basso, con banda passante 200 Hz e banda oscura 700 Hz, (la cui risposta in frequenza è riportata in Figura 6.26) per eliminare i contributi non desiderati e lasciare solo il segnale utile.

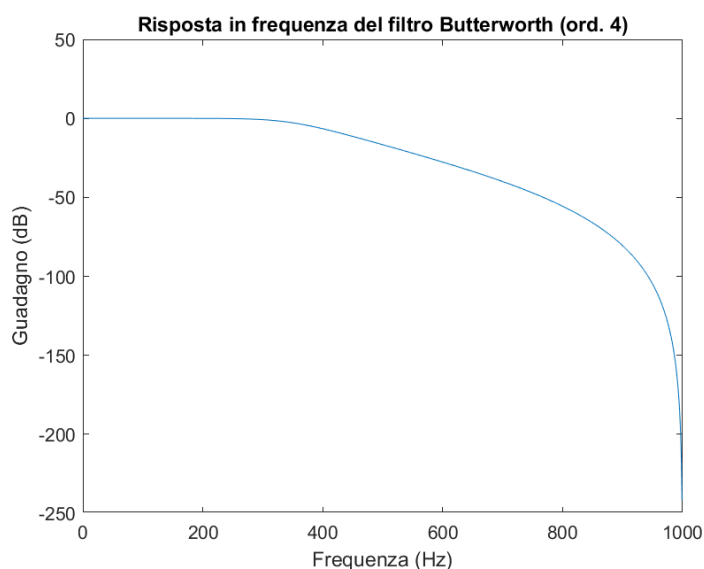


Figura 6.26 – Risposta in frequenza del filtro digitale applicato ai segnali.

Nelle Figure 6.27 e 6.28 sono quindi riportati i PA raccolti post filtraggio, in cui è ben visibile il miglioramento di qualità del segnale.

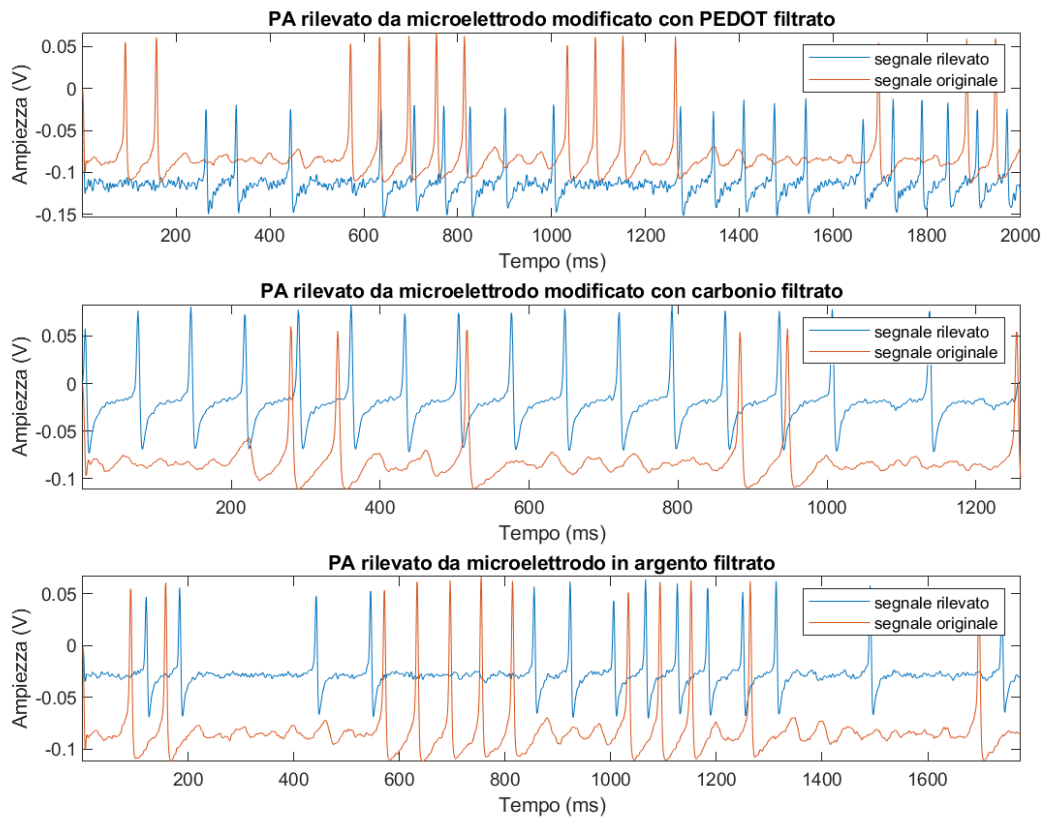


Figura 6.27 – Segnale rilevato (in blu) dai vari tipi di microelettrodi (PEDOT, carbonio, argento) confrontato con quello originale (in arancio) in presenza di PBS, entrambi filtrati con filtro Butterworth passa basso.

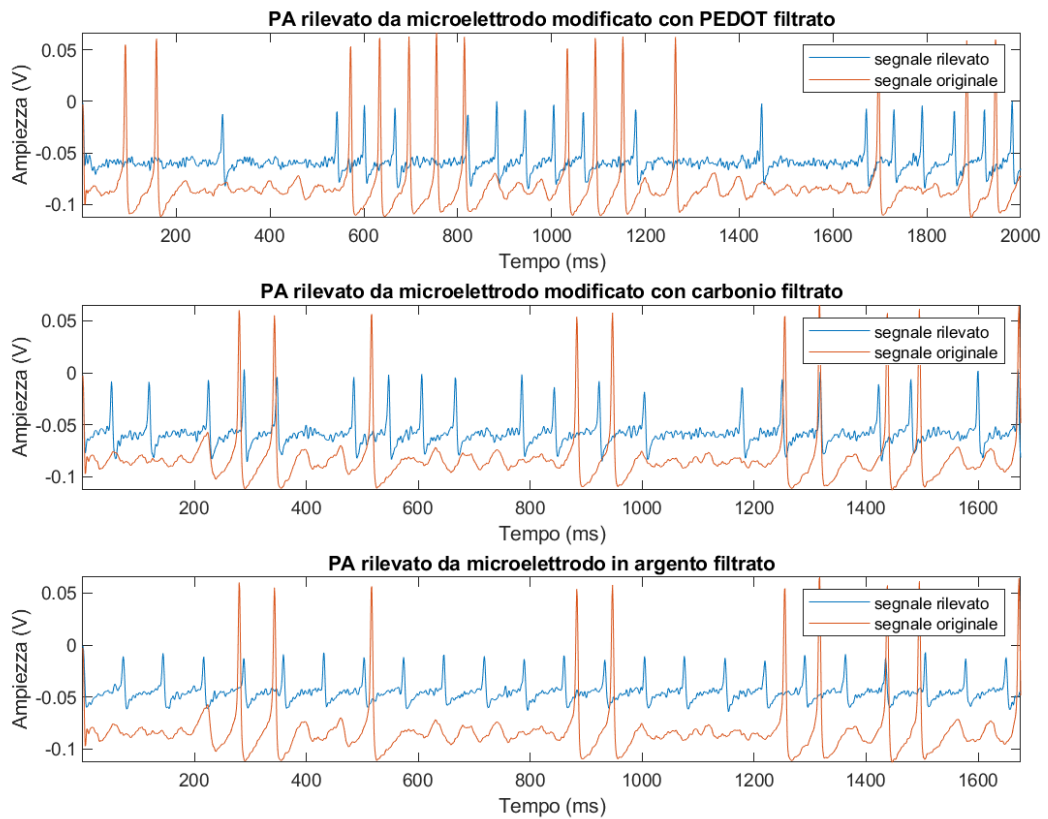


Figura 6.28 - Segnale rilevato (in blu) dai vari tipi di microelettrodi (PEDOT, carbonio, argento) confrontato con quello originale (in arancio) in presenza di gelatina e PBS, entrambi filtrati con filtro Butterworth passa basso.

#### **6.4 Discussione dei risultati ottenuti**

Per completare la trattazione, possono essere fatte alcune considerazioni riguardanti gli elettrodi utilizzati per le varie misure tenendo conto sia dei dati raccolti tramite spettroscopia d'impedenza che di quelli ricavati dall'analisi del potenziale d'azione.

Gli elettrodi modificati con materiali resistivi garantiscono un'impedenza di contatto minore rispetto a quella registrata con elettrodi non modificati, questo si ripercuote sulla qualità ed intensità del segnale misurato, ottenendo un'ampiezza maggiore dagli elettrodi che aventi impedenza minore.

Inoltre, è interessante notare che, per quanto carbonio e PEDOT sviluppino valori d'impedenza molto simili, il carbonio garantisce una stabilità del segnale molto maggiore (vedi registrazioni di PA in entrambi i casi nelle Figure 6.33 e 6.34) venendo perciò in molte occasioni preferito per la modificazione degli elettrodi (vedi *CNTs*, Capitolo 3 Sezione 3.4).





## Conclusioni

I *microelectrode arrays* hanno rappresentato negli ultimi settant'anni uno strumento essenziale per lo studio di cellule e colture cellulari, contribuendo allo sviluppo dell'elettrofisiologia grazie alla loro natura non invasiva.

Strumenti versatili e di semplice utilizzo, ad oggi i *MEAs* possono essere applicati nei più disparati ambienti, dalla ricerca *in vitro* alle applicazioni *in vivo* per il trattamento di svariate patologie.

Inizialmente fabbricati solamente grazie alle tecniche di microfabbricazione, hanno conosciuto un rapido sviluppo che ha portato alla nascita di *MEAs* tridimensionali, flessibili ed addirittura elastici, uniti a circuiti integrati o a strutture microfluidiche.

Rispetto alle tradizionali tecniche di analisi cellulare, questa tipologia di sensori è preferibile perché garantisce minore invasività (lavorano esternamente alla cellula), stimolazione e monitoraggio di intere colonie cellulari (non solo singole cellule), registrazioni di lunga durata e possibile impianto *in vivo*, tutte caratteristiche contro cui metodi come il *voltage clamp* e il *patch clamp* non possono competere.

Nonostante la grande varietà di tecnologie sviluppate nel corso del tempo per il miglioramento dei *MEAs*, vi sono ancora oggi delle sfide che tengono occupati i ricercatori di tutto il mondo: in particolare la ricerca si concentra sull'individuazione di geometrie e materiali innovativi che garantiscano minore impedenza e maggiore rapporto segnale-rumore, per ottenere segnali di qualità superiore.

Proprio per questo, nel caso pratico presentato in questo elaborato è stato realizzato un *MEA* con diverse geometrie e materiali, in modo da poter confermare quali fossero le combinazioni migliori. Per valutare le prestazioni del sensore in questione, sono state utilizzate alcune delle tipiche tecniche per l'analisi cellulare sfruttate dai *MEA*: la misurazione/stimolazione del potenziale d'azione e la spettroscopia d'impedenza.

Queste tecniche hanno permesso di effettuare la caratterizzazione funzionale del sensore stampato, con la quale è stato possibile dimostrare che la modificazione delle superfici dei microelettrodi con materiali resistivi porta ad un effettivo aumento delle prestazioni del sensore ed una diminuzione dell'impedenza.

Oltre al miglioramento delle prestazioni del sensore, la ricerca ad oggi si concentra sull'individuazione e il potenziamento di nuovi metodi di fabbricazione (in particolare quella additiva), sull'applicazione di nuovi materiali che garantiscano biocompatibilità, non intrusività e inerzia al *MEA*, soprattutto per le applicazioni *in vivo*. A questo proposito i *MEAs* vengono impiegati sempre più frequentemente come sensori terapeutici e di controllo (nuovi pacemaker

meno invasivi ed elastici, sensori per il monitoraggio dell'attività neurale in pazienti con deficit cerebrali e molto altro ancora), ma anche per approfondire lo studio *in vitro* dell'attività cellulare (analisi di farmaco-cinetica cellulare, valutazione funzionale di interi tessuti ecc.).

Questi studi hanno come fine ultimo l'approfondimento della conoscenza del corpo umano, in particolare per garantire soluzioni terapeutiche personalizzate sempre meno invasive.

## BIOGRAFIA

- [1] G. Santovito e G. Pontarin, «Corso di Biologia, Fisiologia ed Anatomia, Laurea triennale in Ingegneria Biomedica». 2020.
- [2] D. Capobianco, «Corso di Bioelettromagnetismo, Laurea triennale in Ingegneria Biomedica». 2023.
- [3] S. Del Favero, «Corso di Tecnologia e Strumentazione Biomedica, Laura triennale in Ingegneria Biomedica». 2023.
- [4] object Object, «Bioelettrodi per ECG», Consultato: 22 agosto 2023. [Online]. Disponibile su: <https://core.ac.uk/reader/11669690>
- [5] S. Tonello, «Seminario Torino».
- [6] A. Ch. Lazanas e M. I. Prodromidis, «Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial», *ACS Meas. Sci. Au*, vol. 3, fasc. 3, pp. 162–193, giu. 2023, doi: 10.1021/acsmesuresciau.2c00070.
- [7] J. Wang, C. Wu, N. Hu, J. Zhou, L. Du, e P. Wang, «Microfabricated Electrochemical Cell-Based Biosensors for Analysis of Living Cells In Vitro», *Biosensors*, vol. 2, dic. 2012, doi: 10.3390/bios2020127.
- [8] A. Accardo, «Elettrodi per biopotenziali - Strumentazione Biomedica»,
- [9] J. Hong, K. Kandasamy, M. Marimuthu, C. S. Choi, e S. Kim, «Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study», *The Analyst*, vol. 136, pp. 237–45, ott. 2010, doi: 10.1039/c0an00560f.
- [10] «Microelectrode Array (MEA)». <https://www.3brain.com/resources/microelectrode-array> (consultato 2 aprile 2023).
- [11] J. Pine, «A History of MEA Development», in *Advances in Network Electrophysiology: Using Multi-Electrode Arrays*, M. Taketani e M. Baudry, A c. di, Boston, MA: Springer US, 2006, pp. 3–23. doi: 10.1007/0-387-25858-2\_1.
- [12] J. S. Choi, H. J. Lee, S. Rajaraman, e D.-H. Kim, «Recent advances in three-dimensional microelectrode array technologies for in vitro and in vivo cardiac and neuronal interfaces», *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 171, p. 112687, gen. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112687.
- [13] A. Tanwar, H. A. Gandhi, D. Kushwaha, e J. Bhattacharya, «A review on microelectrode array fabrication techniques and their applications», *Materials Today Chemistry*, vol. 26, p. 101153, dic. 2022, doi: 10.1016/j.mtchem.2022.101153.
- [14] R. Kim, S. Joo, H. Jung, N. Hong, e Y. Nam, «Recent trends in microelectrode array technology for in vitro neural interface platform», *Biomed. Eng. Lett.*, vol. 4, fasc. 2, pp. 129–141, giu. 2014, doi: 10.1007/s13534-014-0130-6.
- [15] C. M. Didier, A. Kundu, D. DeRoo, e S. Rajaraman, «Development of in vitro 2D and 3D microelectrode arrays and their role in advancing biomedical research», *J. Micromech. Microeng.*, vol. 30, fasc. 10, p. 103001, lug. 2020, doi: 10.1088/1361-6439/ab8e91.
- [16] Sougata Pahari, «2.1 P Fotolitografia», 11:15:23 UTC. Consultato: 10 aprile 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.slideshare.net/sougatapahari/21-p-fotolitografia>
- [17] K. K. Valapil *et al.*, «Fabrication of ITO microelectrodes and electrode arrays using a low-cost CO2 laser plotter», *Lab Chip*, vol. 23, fasc. 17, pp. 3802–3810, ago. 2023, doi: 10.1039/D3LC00266G.
- [18] H. G. Gnanasambanthan e D. Maji, «Development of a Flexible and Wearable Microelectrode Array Patch Using a Screen-Printed Masking Technique for Accelerated Wound Healing», *ACS Appl. Electron. Mater.*, vol. 5, fasc. 8, pp. 4426–4436, ago. 2023, doi: 10.1021/acsaelm.3c00637.
- [19] S. Gong e Y. Sun, «Experimental study on forming consistent accuracy and tool electrode wear involved in fabricating array microelectrodes and array micro holes using electrical discharge

- machining», *Journal of Manufacturing Processes*, vol. 79, pp. 126–141, lug. 2022, doi: 10.1016/j.jmapro.2022.04.046.
- [20] «What is a complementary metal-oxide semiconductor (CMOS)?», *WhatIs.com*. <https://www.techtarget.com/whatis/definition/CMOS-complementary-metal-oxide-semiconductor> (consultato 18 aprile 2023).
- [21] P. D. Donaldson, L. Ghanbari, M. L. Rynes, S. B. Kodandaramaiah, e S. L. Swisher, «Inkjet-Printed Silver Electrode Array for in-vivo Electrocorticography», in *2019 9th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*, mar. 2019, pp. 774–777. doi: 10.1109/NER.2019.8717083.
- [22] N. Lago, «Tecniche di Fabbricazione - Part 3 (InkJet Printing)»,
- [23] N. Adly *et al.*, «Printed microelectrode arrays on soft materials: from PDMS to hydrogels», *npj Flex Electron*, vol. 2, fasc. 1, Art. fasc. 1, mag. 2018, doi: 10.1038/s41528-018-0027-z.
- [24] I. Armando, M. Borghetti, E. Sardini, e M. Serpelloni, «Preliminary study on printed microelectrode array by Aerosol Jet Printing technology», in *2022 IEEE International Workshop on Metrology for Industry 4.0 & IoT (MetroInd4.0&IoT)*, giu. 2022, pp. 261–266. doi: 10.1109/MetroInd4.0IoT54413.2022.9831775.
- [25] N. J. Wilkinson, M. A. A. Smith, R. W. Kay, e R. A. Harris, «A review of aerosol jet printing—a non-traditional hybrid process for micro-manufacturing», *Int J Adv Manuf Technol*, vol. 105, fasc. 11, pp. 4599–4619, dic. 2019, doi: 10.1007/s00170-019-03438-2.
- [26] «What is the difference between the aerosol jet printing and inkjet printing?», *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/post/What\\_is\\_the\\_difference\\_between\\_the\\_aerosol\\_jet\\_printing\\_and\\_inkjet\\_printing](https://www.researchgate.net/post/What_is_the_difference_between_the_aerosol_jet_printing_and_inkjet_printing) (consultato 30 agosto 2023).
- [27] «www.multichannelsystems.com | Innovations in Electrophysiology». <https://www.multichannelsystems.com/> (consultato 31 agosto 2023).
- [28] Q. Zhao *et al.*, «Highly Sensitive and Omnidirectionally Stretchable Bioelectrode Arrays for In Vivo Neural Interfacing», *Advanced Healthcare Materials*, vol. 12, fasc. 18, p. 2203344, 2023, doi: 10.1002/adhm.202203344.
- [29] L. Pazzini *et al.*, «An ultra-compact integrated system for brain activity recording and stimulation validated over cortical slow oscillations in vivo and in vitro», *Scientific Reports*, nov. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34560-y.
- [30] «Newest generation of HD-MEAs : Accura-3D». <https://www.3brain.com/> (consultato 31 agosto 2023).
- [31] B. Miccoli *et al.*, «High-Density Electrical Recording and Impedance Imaging With a Multi-Modal CMOS Multi-Electrode Array Chip», *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, 2019, Consultato: 1 settembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00641>
- [32] X. Guo e R. Zhu, «Controllable in-situ cell electroporation with cell positioning and impedance monitoring using micro electrode array», *Scientific Reports*, vol. 6, p. 31392, ago. 2016, doi: 10.1038/srep31392.
- [33] A. Hai, J. Shappir, e M. E. Spira, «In-cell recordings by extracellular microelectrodes», *Nat Methods*, vol. 7, fasc. 3, Art. fasc. 3, mar. 2010, doi: 10.1038/nmeth.1420.
- [34] L. Xu *et al.*, «Trends and recent development of the microelectrode arrays (MEAs)», *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 175, p. 112854, mar. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112854.
- [35] C. Didier, A. Kundu, e S. Rajaraman, «Capabilities and limitations of 3D printed microserpentes and integrated 3D electrodes for stretchable and conformable biosensor applications», *Microsyst Nanoeng*, vol. 6, fasc. 1, p. 15, apr. 2020, doi: 10.1038/s41378-019-0129-3.
- [36] X. Guimer *et al.*, «A minimally invasive microsensor specially designed for simultaneous dissolved oxygen and pH biofilm profiling», *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, fasc. 21, 2019, doi: 10.3390/s19214747.

- [37] LOstudio.it, «Film di Poliammide per Circuiti Flessibili - Kapton», *Coveme*.  
<https://www.coveme.com/it/kapton-film-a-base-di-poliammide/> (consultato 6 settembre 2023).
- [38] «General Purpose», *PV Nano Cell*. <https://www.pvnanocell.com/general-purpose.html>  
(consultato 6 settembre 2023).
- [39] «Resistor Inks», *PV Nano Cell*. <https://www.pvnanocell.com/resistor-inks.html> (consultato 6 settembre 2023).
- [40] FUJIFILM Dimatix, Inc., «Dimatix Materials Printer DMP-2800 Series User Manual». giugno 2006.
- [41] I. Colomberotto, «Protocollo di caratterizzazione MEA». luglio 2023.
- [42] EPFL, «user manual EIS analyzer», Consultato: 10 settembre 2023. [Online]. Disponibile su:  
<https://docs.google.com/presentation/d/1cevHdg-AyY8HVRsnPDtnObbvcy0g2eWQ>