



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“MATRICI DI ELETTRODI MICROMETRICHE (MICROELECTRODE  
ARRAYS, MEAs) STAMPATE PER IL MONITORAGGIO DI CELLULE  
ELETTRICAMENTE ATTIVE: STATO DELL'ARTE ED ESEMPI  
APPLICATIVI”**

**Relatore: Prof.ssa Sarah Tonello**

**Laureanda: Anna Casellato**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea: 19 luglio 2023**



*Alla mia famiglia,  
per avermi sempre sostenuto e supportato con affetto.*



# INDICE

Introduzione.....	5
CAPITOLO 1: .....	8
Cenni di fisiologia e biologia: cellule elettricamente attive .....	8
1.1 Potenziale d'azione.....	8
1.2 Particolarità dei neuroni e della loro elettrofisiologia .....	10
1.3 Particolarità delle cellule muscolari e della loro elettrofisiologia .....	11
CAPITOLO 2: .....	13
Design e tecniche di fabbricazione dei MEAs.....	13
2.1 Tipologie di MEAs e terminologia.....	13
2.2 Principali tecniche di microfabbricazione .....	14
2.3 Materiali utilizzati .....	21
CAPITOLO 3: .....	23
Condizionamento dei MEAs .....	23
CAPITOLO 4: .....	27
Circuiti di trasduzione .....	27
4.1 Elettrodi utilizzati .....	27
4.2 Trasduttori utilizzati .....	29
CAPITOLO 5: .....	31
Possibili interferenze: rumore.....	31
CAPITOLO 6: .....	34
Caratterizzazione dei MEAs.....	34
6.1 Misure di impedenza .....	34
6.2 Misure di potenziale .....	37
6.3 Segnali rilevati e loro analisi .....	39
CAPITOLO 7: .....	41
Applicazioni pratiche: stato dell'arte.....	41
7.1 Applicazioni in vitro.....	41
7.2 Applicazioni in vivo .....	43

CAPITOLO 8: .....	44
Un esempio sperimentale: caratterizzazione in vitro di elettrodi stampati.....	44
8.1 Materiali e metodi.....	44
8.2 Esecuzione delle misure .....	47
8.3 Risultati e conclusioni .....	50
Conclusioni e prospettive future.....	54
BIBLIOGRAFIA .....	55

## **Abstract**

Le matrici di elettrodi micrometriche, conosciute anche con l'acronimo MEAs (Microelectrode Arrays), sono dei particolari dispositivi costituiti da griglie di elettrodi di dimensione micrometrica che permettono di misurare l'attività elettrica della membrana cellulare delle cellule elettricamente attive. Tra le principali applicazioni di tali strumenti ci sono le misure di impedenza cellulare, volte all'analisi della variazione di impedenza della membrana cellulare in determinate condizioni o al monitoraggio della proliferazione di colture cellulari, e le misure di potenziale, consistenti nella stimolazione delle cellule elettricamente attive e alla successiva analisi del potenziale d'azione da loro generato in risposta. Tra le varie tecniche che si possono utilizzare per la produzione delle matrici micrometriche, la stampa costituisce un buon compromesso tra precisione e costi di produzione, garantendo in aggiunta la riproducibilità accurata dei dispositivi e la possibilità di realizzarli con materiali sempre più sostenibili e con proprietà meccaniche specifiche (e.g. flessibilità, deformabilità). Grazie poi alle tecniche di elaborazione, è possibile acquisire segnali accurati e precisi, eliminando eventuali interferenze che possono compromettere la misura.

Le applicazioni in ambito biomedico delle matrici di elettrodi micrometriche sono innumerevoli e in costante espansione, grazie alla versatilità e alla notevole precisione che questi dispositivi forniscono.





## Introduzione

Sin dalla scoperta della presenza dell'attività elettrica nel corpo umano, l'evoluzione degli studi nel campo della bioingegneria ha permesso la realizzazione di dispositivi in grado di rilevare l'attività elettrica che caratterizza particolari cellule del corpo umano, dette per questo motivo cellule elettricamente attive. Alcune di queste tecnologie sono largamente utilizzate e fanno uso di tecniche consolidate, come la rilevazione dell'attività elettrica del cuore tramite l'elettrocardiogramma (ECG) e la rilevazione della risposta di vari muscoli sottoposti a diversi stimoli con l'elettromiogramma (EMG). Più recentemente, invece, gli studi si stanno maggiormente concentrando sull'implementazione di metodi volti a misurare l'attività elettrica dei tessuti in maniera molto dettagliata, mirando all'analisi delle singole cellule elettricamente attive e della differenza di potenziale elettrico che si crea ai capi della loro membrana plasmatica.

Per misurare la differenza di potenziale ai capi di una membrana cellulare è necessario rilevare il potenziale intracellulare e il potenziale extracellulare, per poi sottrarre uno all'altro per enfatizzarne la differenza in termini di potenziale elettrico. Questo metodo, che prende il nome di tecnica "patch-clamp", risulta tuttavia invasivo, in quanto necessita dell'accesso diretto all'interno del neurone; tale procedimento può essere usato per rilevare le proprietà elettriche dei canali ionici di uno specifico frammento di membrana, dove vengono posti gli elettrodi, con estrema precisione. Grazie a metodi simili a quello appena descritto, si possono rilevare i cambiamenti di correnti ioniche e di voltaggio della membrana di una singola cellula.

Esistono però altri metodi di misura, che consistono in misure extracellulari invece che intracellulari, che risultano particolarmente utili per rilevare i cambiamenti delle concentrazioni ioniche di un gruppo che comprende più di una cellula neuronale. L'attività elettrofisiologica esterna dei neuroni può essere infatti rilevata grazie all'utilizzo di microelettrodi posti in prossimità del punto in cui ha origine il segnale stesso, fino a circa 100  $\mu\text{m}$  di distanza, solitamente nella zona dell'assone più vicina al corpo della cellula. Questo tipo di sistema sfrutta il movimento di ioni, causato dal verificarsi del potenziale d'azione, e il campo elettrico da essi generato, il quale può essere direttamente rilevato dai microelettrodi metallici. Grazie allo stesso dispositivo si possono rilevare anche i cosiddetti potenziali locali, che rappresentano il risultato dell'integrazione dei segnali sinaptici in un volume di circa 300  $\mu\text{m}$  attorno alla superficie dell'elettrodo.

Questi metodi, inizialmente pensati per trovare applicazione a livello del sistema nervoso, possono essere utilizzati per indagare il comportamento elettrico di tutte le cellule elettricamente attive, e quindi anche delle cellule muscolari; le conoscenze acquisite possono essere di notevole interesse in campo medico, con implicazioni cliniche per quanto riguarda la diagnosi e la terapia di patologie legate all'ambito neurologico e muscolare.

Gli strumenti che permettono di effettuare misure extracellulari sono le matrici di elettrodi micrometriche, abbreviate con l'acronimo MEAs, dall'inglese "Microelectrode Arrays". Diverse tipologie di MEAs possono essere usate per molteplici applicazioni, sia in vitro che in vivo. A differenza dei metodi "patch-clamp", l'utilizzo di matrici di elettrodi costituisce un metodo meno invasivo, permettendo di rilevare misure anche in un arco di tempo prolungato e con un'elevata risoluzione spazio-temporale. [1]

I temi trattati nell'elaborato saranno preceduti da una breve introduzione a cenni di aspetti di carattere fisiologico e biologico sulle cellule elettricamente attive (Capitolo 1).

Nella prima parte verranno presentati diversi elementi che caratterizzano le matrici di elettrodi micrometriche, tra cui il loro design e le principali tecniche di fabbricazione utilizzate per la loro realizzazione (Capitolo 2). A seguire saranno analizzati più nel dettaglio gli elementi che costituiscono la parte elettronica di questi dispositivi, presentandone i circuiti di condizionamento (Capitolo 3) e di trasduzione (Capitolo 4). Per la trattazione di queste ultime due sezioni, l'analisi sarà focalizzata su dispositivi costituiti da matrici di elettrodi nel loro insieme; non saranno trattate particolarità relative alla realizzazione di elettrodi tramite circuiti basati su transistor.

Verranno poi presentate delle tecniche per l'elaborazione dei segnali rilevati tramite MEAs, con particolare attenzione sull'utilizzo di metodi per ridurre le interferenze (Capitolo 5). Infine, verrà trattata la caratterizzazione delle matrici di elettrodi micrometriche in misure di impedenza e in misure di potenziale (Capitolo 6).

La seconda parte dell'elaborato (Capitolo 7) verterà invece ad un'analisi di dati acquisiti sperimentalmente, facendo uso di elettrodi stampati per evidenziare il comportamento di questi nella rilevazione di segnali di tipo sinusoidale a diverse frequenze e per evidenziare le prestazioni dello strumento nella rilevazione di caratteristiche significative di segnali noti dati

in input. In particolare, l'interesse sarà volto alla caratterizzazione degli elettrodi in termini di risposta in frequenza e della loro capacità di stimolare e registrare simultaneamente.

## CAPITOLO 1:

### Cenni di fisiologia e biologia: cellule elettricamente attive

Tra le numerose tipologie di cellule presenti nel corpo umano, quelle che risultano più interessanti da essere analizzate con i MEAs risultano quelle comunemente definite elettricamente attive.

Nonostante il potenziale di membrana caratterizzi tutte le cellule che compongono il corpo umano, le uniche che sono in grado di generare e trasmettere segnali elettrici in risposta a uno stimolo sono le cellule elettricamente eccitabili, di cui fanno parte neuroni, cellule muscolari e cellule neuroendocrine.

Nonostante esse possiedano caratteristiche molto diverse alla base della trasmissione del potenziale negli organi che compongono, sono accomunate dalla capacità di generare e trasmettere potenziali d'azione con caratteristiche comuni.

#### 1.1 Potenziale d'azione

Il potenziale d'azione rappresenta una variazione rapida e transitoria del potenziale di membrana. Nonostante sia necessario uno stimolo per dar luogo a un potenziale d'azione, quest'ultimo evolverà in modo indipendente dalle caratteristiche dello stimolo che lo ha generato; in particolare, cellule dello stesso tipo avranno un potenziale d'azione tra loro pressoché identico, che si differenzia in modo più o meno marcato rispetto al potenziale d'azione di altre tipologie di cellule.

Il potenziale d'azione coinvolge i canali ionici per  $\text{Na}^+$  e per  $\text{K}^+$  voltaggio-dipendenti presenti a livello della membrana plasmatica delle cellule eccitabili; è proprio la presenza di questi canali che conferisce alla cellula la capacità di generare un potenziale d'azione in risposta ad uno stimolo depolarizzante.

La sequenza temporale di un potenziale d'azione può essere suddivisa in due fasi, che variano durata e morfologia del segnale a seconda della tipologia di cellula considerata.

La prima fase è rappresentata dalla depolarizzazione, in cui il potenziale di membrana passa dal suo valore di riposo, pari a circa  $-60/-90$  mV, a valori di eccedenza del potenziale, attorno a  $20/30$  mV. La depolarizzazione, dal punto di vista biologico, è dovuta ad un incremento di ioni  $\text{Na}^+$  all'interno della cellula, causato a sua volta da un maggior flusso di ioni  $\text{K}^+$  all'esterno;

nelle cellule cardiache il processo è potenziato dall'ingresso di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Questo stadio ha una durata molto breve, di qualche millisecondo.

La seconda fase costituisce invece la ripolarizzazione, in cui il potenziale di membrana regredisce fino al suo livello di riposo. Questo stadio coincide con la chiusura dei canali voltaggio-dipendenti per il  $\text{Na}^+$  e un conseguente aumento del flusso di  $\text{K}^+$  verso l'interno della cellula. La durata di questa fase è il fattore che ha maggior influenza sulla durata dell'intero potenziale d'azione, e differisce in base al tipo di cellula; in particolare, nelle cellule del muscolo cardiaco la ripolarizzazione è preceduta da una fase di plateau, in cui il potenziale di membrana rimane costante a valori prossimi allo zero per un certo periodo di tempo. Ciò non accade nelle cellule muscolari striate e nei neuroni, in cui si ha una fase di rapida ripolarizzazione, anche se più lenta rispetto alla depolarizzazione. Nelle cellule neuronali, inoltre, la ripolarizzazione comprende un breve intervallo di tempo in cui la membrana risulta iperpolarizzata, ovvero viene raggiunto un potenziale ancora più basso del potenziale di riposo, attorno ai  $-90$  mV.

Il potenziale d'azione esaurisce in un periodo di tempo nell'ordine dei millisecondi: nelle cellule del miocardio ha una durata di circa 200 ms, mentre nelle cellule muscolo-scheletriche e nelle cellule neuronali il decorso è sensibilmente inferiore, pari a circa 5 ms e 2 ms rispettivamente.

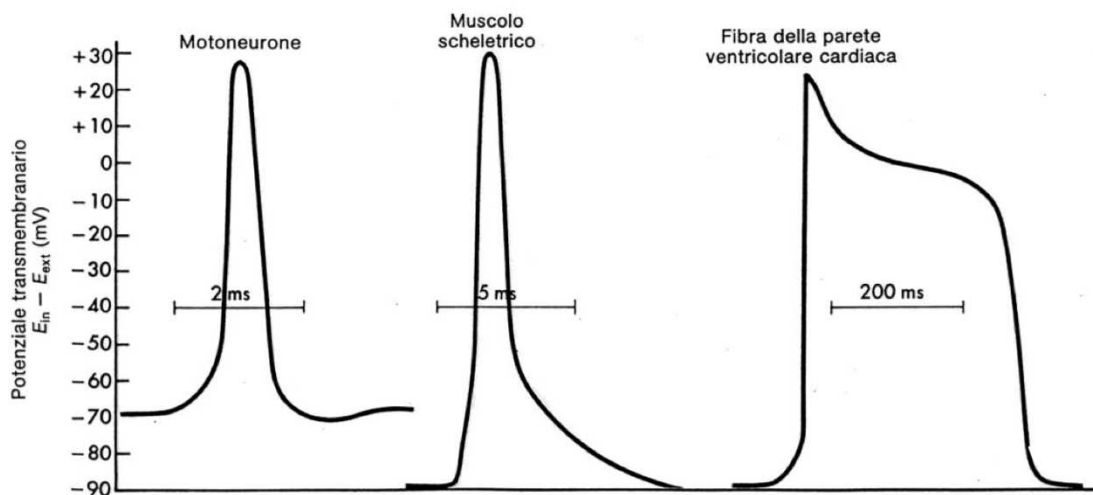


Figura 1: Potenziali d'azione prodotti da tre diversi tipi di cellule.

Il potenziale d'azione viaggia lungo una sola direzione, a causa della presenza di una certa refrattarietà del processo di depolarizzazione, durante cui non è possibile evocare un nuovo

potenziale depolarizzante. La durata della fase refrattaria è direttamente dipendente dalla durata del potenziale d'azione: risulta essere molto breve a livello neuronale, mentre considerevolmente più lenta a livello del miocardio. [2]

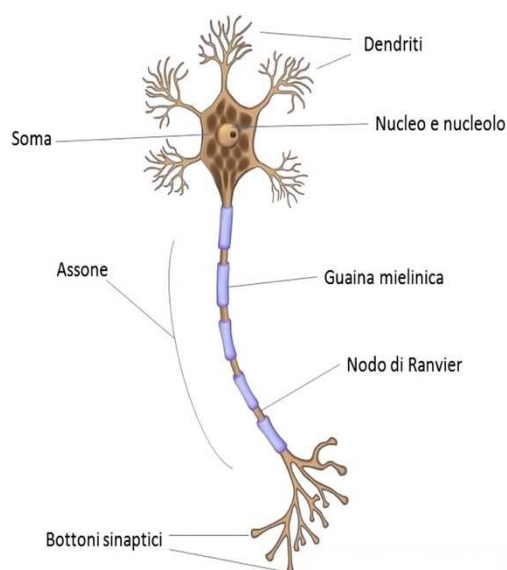
## 1.2 Particolarità dei neuroni e della loro elettrofisiologia

Il sistema nervoso umano è composto da un insieme di organi che permettono la trasmissione di segnali elettrici lungo tutto il corpo. Questa complessa struttura permette di coordinare le funzioni volontarie e involontarie del corpo umano.

I neuroni rappresentano le unità fondamentali del sistema nervoso, essendo deputati alla trasmissione degli impulsi elettrici ai sistemi da attivare per produrre una risposta ad uno stimolo eccitante.

Nonostante la vasta diversità delle strutture di neuroni appartenenti a sottoclassi diverse, è possibile ritrovare delle caratteristiche fondamentali comuni.

I neuroni sono dotati di un corpo cellulare o soma, da cui si dipartono poi dei prolungamenti cellulari, chiamati dendriti, presenti in numero e forme diverse in base alla specifica funzione che la cellula deve svolgere. Il prolungamento più ampio e spesso costituisce l'assone, specializzato nel condurre gli impulsi nervosi sotto forma di un'onda depolarizzata che prende il nome di potenziale d'azione. L'estremità dell'assone che non lo collega al corpo centrale presenta poi delle terminazioni assoniche, impiegate nella comunicazione cellulare tramite il rilascio di molecole chiamate neurotrasmettitori.



*Figura 2: Struttura di un neurone*

Un ruolo fondamentale nella propagazione di impulsi elettrici a livello cellulare viene svolto dalla membrana cellulare: essa è composta da diverse componenti eccitabili, che permettono alla cellula di rispondere agli stimoli ricevuti tramite una variazione della permeabilità a ioni specifici. Il cambiamento selettivo di permeabilità della membrana a tali ioni comporta un cambiamento del potenziale di membrana, ovvero della differenza di potenziale che si registra tra il potenziale all'interno della cellula e l'esterno della stessa. Il potenziale di membrana passa quindi dal suo valore iniziale, chiamato potenziale di riposo, a un potenziale più alto, tramite una depolarizzazione della membrana; ciò innesca una serie di meccanismi a cascata che permettono allo stimolo di propagarsi lungo tutto l'assone, in direzione centrifuga.

Il potenziale d'azione si propaga lungo tutto l'assone, fino ad arrivare ai terminali sinaptici: dalla zona in cui vengono attivati i primi meccanismi di depolarizzazione della membrana, il segnale elettrico si propaga nelle zone adiacenti depolarizzandole.

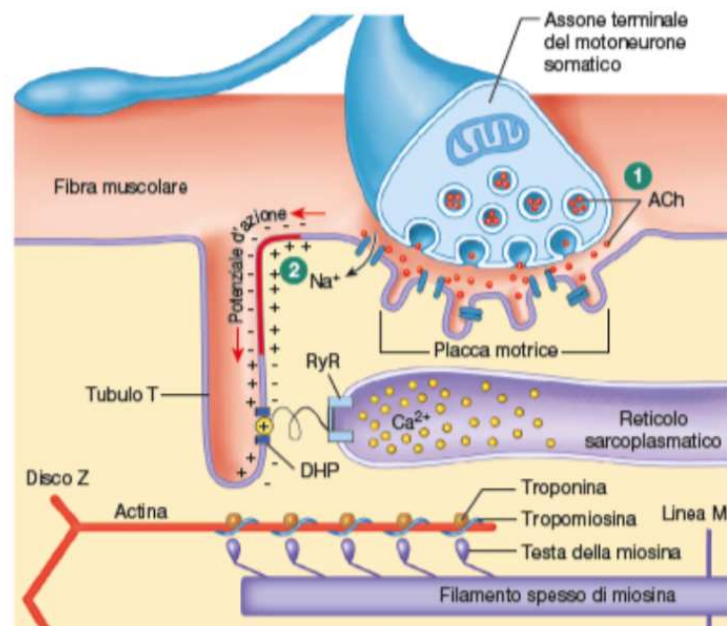
Le proprietà elettriche delle cellule neuronali, e in particolare della loro membrana plasmatica, sono importanti per poter comprendere la funzione delle singole cellule o di più neuroni organizzati in sistemi complessi. Lo studio che indaga le proprietà delle cellule e dei tessuti del sistema nervoso prende il nome di elettrofisiologia neuronale; tali studi comprendono misure e analisi del cambiamento delle proprietà elettriche delle cellule nervose, solitamente in termini di potenziale elettrico, di corrente o di impedenza.

### **1.3 Particolarità delle cellule muscolari e della loro elettrofisiologia**

Anche le membrane delle cellule muscolari sono provviste di particolari componenti eccitabili che permettono di generare una risposta a uno stimolo proveniente dall'esterno che varia in base al tipo di muscolo che è coinvolto. La risposta che viene generata a livello delle cellule muscolari serve a innescare il processo di contrazione delle cellule stesse, a differenza dei neuroni che sono principalmente destinati alla trasmissione dello stimolo ad altre cellule recettrici.

L'attività delle cellule muscolari scheletriche è controllata da specifiche cellule nervose chiamate motoneuroni, i cui terminali assonici formano con la membrana muscolare una particolare giunzione sinaptica chimica, detta sinapsi neuromuscolare; questa giunzione permette la comunicazione tra neurone e muscolo, permettendo la propagazione dell'impulso

che dà luogo alla contrazione muscolare. Le due cellule coinvolte nella sinapsi comunicano tra loro per mezzo di un neurotrasmettitore, l'acetilcolina, che viene rilasciata a livello dei terminali assonici per poi essere riconosciuta dai recettori presenti sulla membrana plasmatica delle cellule muscolari. L'acetilcolina, legandosi ai recettori, provoca a livello della membrana della cellula muscolare l'apertura di canali selettivi per l'ingresso di  $\text{Na}^+$ , inducendo una differenza di potenziale tale da creare un potenziale d'azione. Il potenziale d'azione generato si propaga in particolari invaginazioni della membrana plasmatica in cui sono presenti canali voltaggio-dipendenti per il  $\text{Ca}^{2+}$ , che vengono aperti dallo stimolo elettrico. L'ingresso di questi ioni dà luogo ad una serie di meccanismi a cascata che portano alla contrazione muscolare, permettendo il legame tra actina e miosina. La contrazione delle cellule muscolari lisce presenta una dinamica simile.



*Figura 3: Schematizzazione della propagazione del potenziale d'azione nelle cellule muscolari scheletriche.*

Nelle cellule muscolari cardiache, invece, l'onda depolarizzante non deriva da una sinapsi neuro-muscolare ma ha luogo nelle cellule pacemaker, particolari cellule autoritmiche situate in una regione che si trova sopra l'atrio destro del cuore. Le cellule del miocardio, poi, essendo fisicamente collegate tra loro, risultano accoppiate elettricamente e permettono quindi al segnale depolarizzante di trasmettersi con estrema velocità in tutti i distretti.



## CAPITOLO 2:

### Design e tecniche di fabbricazione dei MEAs

#### 2.1 Tipologie di MEAs e terminologia

Le matrici di elettrodi micrometriche, come dice il nome, sono dei dispositivi costituiti da una matrice in cui è presente un certo numero di elettrodi in scala micrometrica, in quantità variabile a seconda della tipologia e dell'applicazione e aventi lo scopo di rilevare l'attività elettrica di cellule elettricamente attive.

Storicamente, i MEAs venivano utilizzati in ambito elettro-chimico e come biosensori.

La prima realizzazione di matrici di microelettrodi che unì gli studi elettrochimici con gli studi sulle biomolecole risale agli anni '60 del Novecento, in cui venne realizzato un biosensore volto a rilevare la glicemia tramite l'utilizzo di MEA. La ricerca nell'ambito della fabbricazione dei MEAs si è in seguito evoluta; ad oggi, oltre che svolgere il ruolo di sensori, questi dispositivi sono utilizzati in studi volti all'analisi dell'attività elettrica delle cellule e dell'impedenza cellulare. Studi recenti utilizzano infine le matrici di elettrodi micrometriche per studiare colture cellulari tridimensionali. [3]

A seconda dell'ambito e dello scopo della ricerca in cui vengono utilizzate, le matrici di elettrodi micrometriche vengono fabbricate in diverse modalità, per garantire determinate prestazioni.

Le varie tipologie di MEAs si differenziano sulla base di diversi parametri: in base ai trasduttori utilizzati, al tipo di substrato su cui agiscono, alla forma della griglia di elettrodi, al numero di canali coinvolti e alla densità degli elettrodi.

Vengono inoltre distinti sulla base dell'applicazione per cui sono ideati in microelettrodi impiantabili in vivo o in vitro; in particolare, i MEAs utilizzati per applicazioni in vivo possono includere, ad esempio, sonde neurali minimamente invasive, mentre le applicazioni in vitro comprendono principalmente piastre di colture cellulari.

Infine, i MEAs vengono classificati in base all'architettura interna: generalmente si distinguono matrici a cablaggio fisso, in cui ogni trasduttore possiede un collegamento diretto con l'esterno della matrice, e le matrici che utilizzano la moltiplicazione, in cui più segnali in ingresso vengono combinati per trasmettere un unico segnale in uscita, grazie a componenti elettronici contenuti nella matrice stessa.

Per quanto riguarda la terminologia utilizzata, vengono spesso adottate delle convenzioni al fine di una comprensione migliore e più immediata. Comunemente si utilizza il termine matrice in riferimento all'area che include esclusivamente i componenti del trasduttore, mentre per indicare l'intero dispositivo viene usato il termine MEA. Per indicare l'insieme di tutti i componenti coinvolti nel funzionamento del dispositivo, oltre che al MEA stesso, si adopera l'espressione sistema.

Infine, risulta utile distinguere i meccanismi con elementi circuitali attivi, come i transistor, indicati nel complesso come dispositivi attivi, da meccanismi che invece non hanno al loro interno questo tipo di circuiti, che vengono indicati come dispositivi passivi. [4]

## **2.2 Principali tecniche di microfabbricazione**

Con il termine “microfabbricazione” si intende la fabbricazione di dispositivi in scala micrometrica o sub-micrometrica, applicabili in ambito biofisico, biomedico, farmacologico o nanotecnologico. Nella pratica, il processo di microfabbricazione consiste in una sequenza di fasi, alcune derivanti da tecniche di fabbricazione di semiconduttori e altre specifiche sulla microlavorazione, dalla cui unione si ottiene una struttura fisica di dimensioni micrometriche.

La microfabbricazione svolge un ruolo importante nella realizzazione di un MEA, poiché permette di realizzare microelettrodi con determinate caratteristiche, che contribuiscono a rendere la misura precisa e priva di interferenze.

La sfida che viene posta a questo tipo di lavorazione risiede nel realizzare elettrodi che abbiano una maggiore sensibilità e un rapporto segnale-rumore sufficientemente elevato, nonostante la dimensione della superficie degli elettrodi sia molto piccola. Questo può essere fatto sfruttando nanomateriali conduttori e realizzando nanostrutture 3D, che aumentano la sensibilità e riducono l'impedenza, migliorando il rapporto segnale-rumore.

La prima fase della microfabbricazione consiste nella scelta dei materiali da utilizzare, che deve soddisfare due requisiti fondamentali: la biocompatibilità e la conducibilità elettrica. Nelle applicazioni biomediche, infatti, è di fondamentale importanza che i materiali a contatto con l'ambiente biologico non abbiano effetti dannosi sull'organismo. Inoltre, è necessario che i materiali utilizzati per realizzare i componenti elettronici garantiscano una buona conducibilità elettrica, al fine di poter trasmettere i segnali elettrici rilevati al sistema di misura.

Successivamente la forma e la dimensione dell'elettrodo devono essere ottimizzate in base all'applicazione di interesse.

Nei microelettrodi che vengono inseriti in ambienti acidi, come quello biologico, è inoltre necessario che la superficie dell'intero dispositivo venga rivestita da uno strato isolante, a meno della ridotta superficie che fungerà da sensore e sarà deputata alla rilevazione dei segnali elettrici derivanti dalle cellule. La passivazione degli strati costituisce una barriera tra la soluzione elettrolita e l'elettrodo stesso, impedendo la degradazione del dispositivo.

Viene quindi creato il vero e proprio dispositivo micrometrico bidimensionale, che nel caso dei MEA è dotato di elettrodi di una dimensione compresa tra i 4 e i 100  $\mu\text{m}$ ; solitamente il materiale scelto per la realizzazione del dispositivo è un materiale metallico, che viene in alcuni casi rivestito con un sottile strato di platino, al fine di ridurre l'impedenza dell'elettrodo. La matrice di elettrodi micrometrica sarà quindi costituita dal circuito elettrico realizzato e dal substrato su cui viene posto, generalmente in vetro o silicene.

A seconda della tipologia di elettrodi che si vuole fabbricare, della risoluzione che si vuole ottenere e delle misure che si desidera effettuare, si possono scegliere metodi di microfabbricazione diversi.

Analizzando le varie tecniche riportate e riassumendone i procedimenti, si possono individuare alcuni stadi fondamentali della microfabbricazione: scelta del substrato, creazione dello schema circuitale, rivestimento con materiale isolante e foratura di quest'ultimo per esporre gli elettrodi.

I procedimenti variano in base alla tecnica utilizzata. [5]

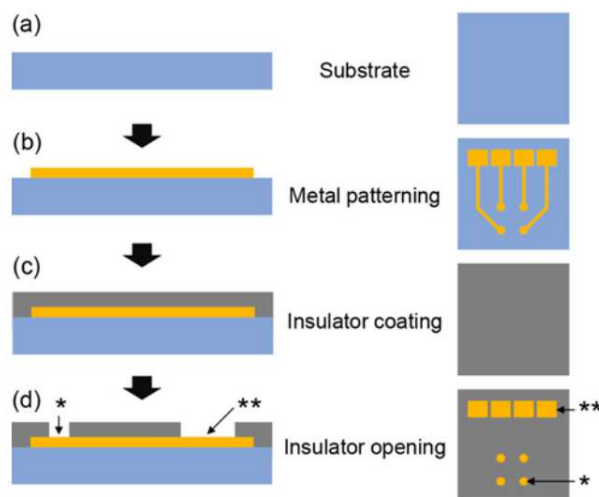


Figura 4: Principali fasi della microfabbricazione.  
(Gli strati non sono in scala.)

I vantaggi portati dalla microfabbricazione sui MEAs sono molteplici. Innanzitutto, la microfabbricazione permette di realizzare dispositivi con elevata riproducibilità, grazie all'accurato controllo della geometria durante la realizzazione. Inoltre, grazie alla possibilità di realizzare circuiti integrati, si può dar vita a dispositivi con elevata densità di elettrodi, e quindi con elevata risoluzione. Grazie poi alle dimensioni micrometriche delle strutture realizzate, si possono analizzare separatamente porzioni molto ridotte di tessuto, anche a livello di una singola cellula. [6]

### 2.2.1 Tecniche litografiche

I processi di microfabbricazione possono essere classificati, a seconda dell'approccio utilizzato nei confronti del substrato, in microfabbricazione rivolta all'intero volume del substrato ("bulk micromachining"), o approccio "top-up", e microfabbricazione superficiale ("surface micromachining"), o approccio "bottom-up"; in particolare, nel primo caso il dispositivo da fabbricare viene costruito sull'intera porzione di materiale, mentre nel secondo caso se ne modella solo la superficie. Spesso si utilizza una combinazione delle due tecniche per la realizzazione di dispositivi micrometrici.

Nell'approccio "top-up" rientrano molte tecniche litografiche, in cui il materiale che costituirà la geometria della matrice di elettrodi viene protetta da un sottile strato di un materiale apposito, mentre le restanti parti vengono rimosse per creare lo schema desiderato.

La tecnica più utilizzata per la microfabbricazione è la fotolitografia. Questo metodo utilizza i raggi UV per creare un certo schema sul materiale scelto, agendo su polimeri sensibili alla luce; il processo è suddiviso in quattro passi fondamentali. La prima fase consiste nel rivestire il substrato con uno strato di "photoresist", una particolare vernice, solubile in un certo solvente, che, se esposta a luce UV, diventa insolubile allo stesso solvente (o viceversa). La vernice viene quindi esposta a raggi UV, che creano sul substrato lo schema desiderato. Successivamente, una volta posto il materiale in un solvente adeguato, si crea sul dispositivo la struttura desiderata. Infine, il modello viene trasferito sul substrato in cui agirà. La fotolitografia permette di ottenere strutture di dimensioni fino a 100 nm, e può essere usata per la realizzazione di microelettrodi sia planari che tridimensionali ad alta risoluzione.

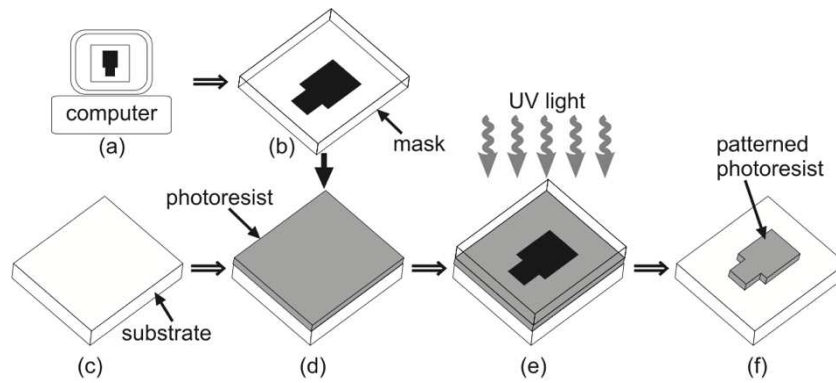


Figura 5: Trasferimento dello schema desiderato sull'elettrodo tramite fotolitografia.

Una tecnica alternativa alla fotolitografia è rappresentata dall'incisione tramite laser ("laser patterning"), in cui, per creare lo schema desiderato, viene utilizzato un laser controllato da remoto con un programma computerizzato. Il vantaggio rispetto alla tecnica precedente consiste in una maggiore facilità di esecuzione, grazie all'assenza di procedimenti multipli di realizzazione.

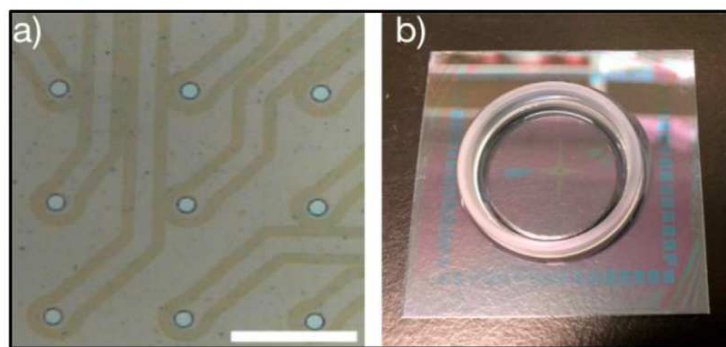


Figura 6: MEAs creati attraverso incisione laser: (a) immagine microscopica di elettrodi con siti di elettrodi esposti (b) MEA fabbricato con un anello annesso per coltura cellulare.

### 2.2.2 Tecniche di stampa

Altre tecniche, alternative alla litografia, realizzano la geometria degli elettrodi desiderata servendosi di varie tecniche di stampa; tra queste può essere fatta una prima suddivisione tra tecniche con contatto e tecniche senza contatto.

Tra le più diffuse tecniche di stampa senza contatto rientra la stampa a getto d'inchiostro ("inkjet printing"). In questo metodo, i materiali vengono trasferiti sul substrato scelto in modo

controllato tramite un processo gestito da remoto, rilasciando piccole quantità di inchiostro sul substrato a una distanza molto ridotta da esso. Il vantaggio rispetto alla fotolitografia risiede nella possibilità di utilizzare substrati meno rigidi; tuttavia, risulta molto costoso e quindi spesso meno usato rispetto alla fotolitografia.

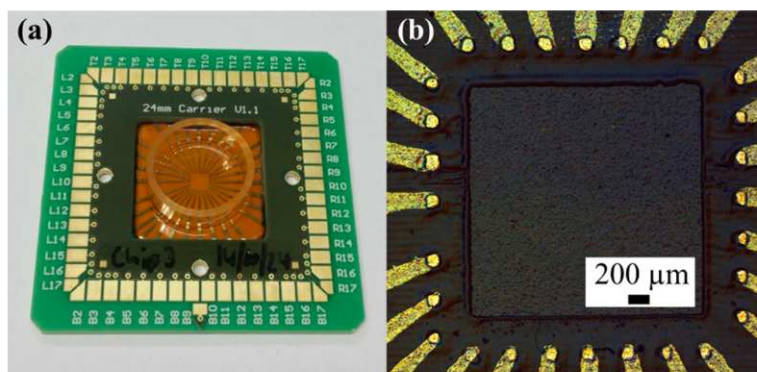
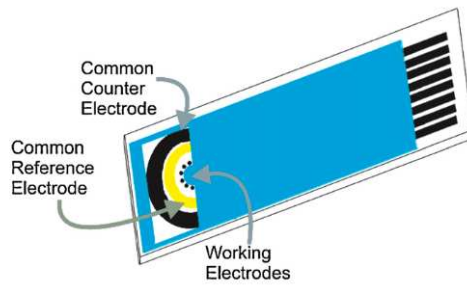


Figura 7: MEA realizzato tramite “inkjet printing”: (a) fotografia della struttura della matrice, connessa a un sistema di amplificazione per l'acquisizione, (b) ingrandimento della parte centrale della matrice. [18]

Per la realizzazione di matrici di elettrodi micrometriche planari, spesso viene usata una tecnica che prende il nome di “screen printing”; essa consiste nello stampare i microelettrodi direttamente sulle schede elettroniche (“circuit boards”), utilizzando un serigrafo, ovvero una stampante particolare dotata di uno stampo inciso, una pressa e un substrato. Lo screen printing rientra quindi nelle tecniche che utilizzano il contatto, poiché in questo caso per far creare la geometria è necessario usare una pressa per far aderire i diversi materiali col substrato. La matrice usata in questo metodo è un tessuto poliestere; questo viene posto sopra lo stampo, che a sua volta viene appoggiato sul substrato e, tramite la pressa, il poliestere viene distribuito in tutto lo stampo, attraverso il quale lo schema viene a sua volta trasferito sul substrato. Questa tecnica è la più economicamente vantaggiosa tra quelle citate, e non richiede un processo di realizzazione complesso; tuttavia, i dispositivi realizzati in questo modo risultano avere una risoluzione spaziale piuttosto bassa, fino a oltre 40 volte inferiore rispetto a dispositivi realizzati con fotolitografia.



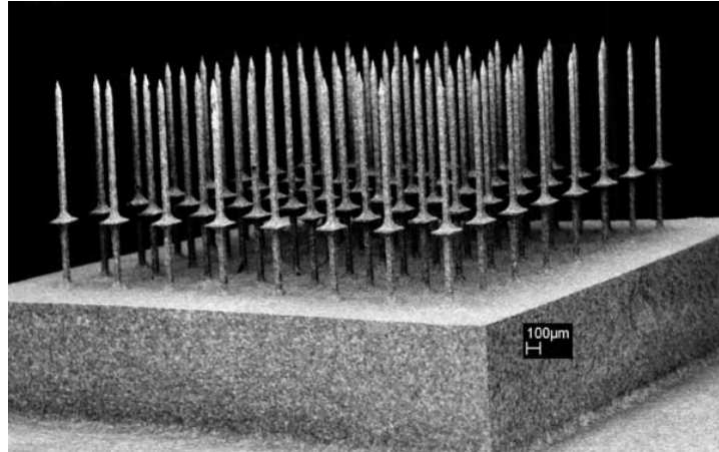
*Figura 8: Struttura schematica di un MEA realizzato con tecnica "screen printing". [19]*

### 2.2.3 Tecniche per la realizzazione di 3D MEAs

Le tecniche finora presentate sono adatte esclusivamente alla realizzazione di matrici planari. Tuttavia, soprattutto in tempi più recenti, grazie ai progressi tecnologici, c'è la tendenza a voler realizzare dispositivi sempre più precisi e performanti, che possiedano una risoluzione tridimensionale. Per realizzare matrici di elettrodi micrometriche tridimensionali, perciò, è necessario utilizzare delle tecniche di microfabbricazione diverse e più complesse.

A tal proposito può essere usata la stereolitografia, basata sulla fabbricazione di elettrodi tramite deposizione di metallo sul substrato scelto. In questo caso viene utilizzata una stampante tridimensionale con tecnologia a raggi laser, che permette la realizzazione fisica di uno schema precedentemente implementato su un file presente nell'hardware e che viene letto dalla stampante stessa. Questo metodo ha un grande potenziale, poiché permette di ottenere dispositivi dotati di alta sensibilità e riproducibilità.

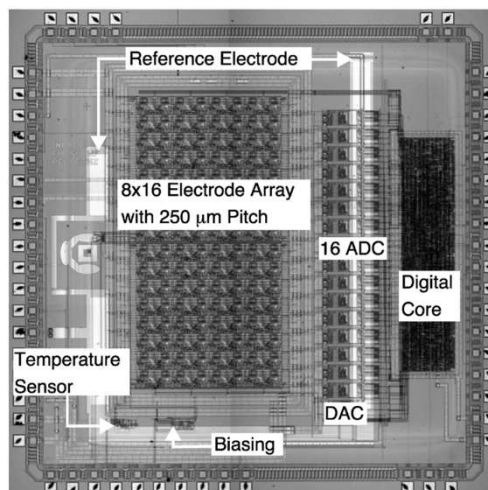
Un modo diverso per creare MEAs tridimensionali è rappresentato dalla elettroerosione (EDM, Electrical Discharge Machining). Questo metodo consiste nel creare la geometria degli elettrodi tramite rimozione di strati del substrato metallico su cui vengono creati, servendosi di una scarica elettrica o di una scintilla. Nonostante si tratti di un metodo datato di qualche decennio, l'elettroerosione presenta tutt'ora delle problematiche associate all'usura degli strumenti utilizzati e alla precisione non ottimale nella microfabbricazione.



*Figura 9: Immagine rilevata con microscopio elettrico a scansione di un MEA in titanio realizzato tramite elettroerosione.*

#### 2.2.4 CMOS MEAs

Infine, una tecnica largamente utilizzata in elettronica è la tecnica complementare per semiconduttori metallici ossidi, ampiamente conosciuta con l'acronimo CMOS. Questa procedura consente la realizzazione di circuiti integrati, dando vita a MEAs ad alta densità di elettrodi; per questo motivo questo metodo viene utilizzato principalmente per studi sulle reti neuronali.



*Figura 10: Fotografia della struttura di un chip di un CMOS-MEA.*



### 2.3 Materiali utilizzati

La scelta dei materiali per la fabbricazione dei componenti che costituiscono le matrici di elettrodi micrometriche è di particolare importanza, soprattutto nell'ottica di assicurare la biocompatibilità del dispositivo. Tutti i materiali usati per realizzare i componenti circuitali dei microelettrodi, che una volta inseriti nel sistema da monitorare si troveranno a contatto con i tessuti biologici, devono essere sottoposti a test di tossicità, soprattutto se la loro interazione con le cellule ha una durata prolungata nel tempo.

Oltre alla biocompatibilità, altri fattori da tenere in considerazione nella scelta dei materiali sono la trasparenza ottica, che semplifica la stimolazione ottica e le misurazioni sul dispositivo stesso, e la rigidità del substrato, su cui dovrà essere tarata anche la rigidità della matrice micrometrica per ottenere una miglior interazione con il tessuto.

Nel realizzare i MEAs, quindi, è essenziale tener conto del campo di applicazione in cui verranno utilizzati, al fine di realizzare un sistema che nel complesso rispetti l'ambiente in cui viene inserito e allo stesso tempo restituisca le informazioni desiderate nel modo più accurato possibile.

Generalmente, gli elettrodi sono costituiti da materiali metallici conduttori, come l'oro (Au), l'argento (Ag) e il cloruro d'argento (AgCl), il platino (Pt), l'alluminio (Al) e il nitruro di titanio (TiN), e da leghe come il diossido di iridio ( $\text{IrO}_2$ ). Per creare il modello metallico della struttura da realizzare, si fa depositare un sottile strato di metallo su un substrato, utilizzando tecniche diverse tra quelle discusse precedentemente.

Il substrato può essere principalmente di due tipi: in vetro o in silicene. Il vantaggio di utilizzare il vetro risiede nella sua caratteristica trasparenza, che lo rende particolarmente adatto all'uso della maggior parte dei sistemi a microscopio. D'altra parte, il silicene, pur non essendo trasparente, risulta più compatibile con la creazione di circuiti integrati e di altre strutture di tipo elettronico che permettono di ottenere dei dispositivi più performanti.[7]

Per quanto riguarda le linee conduttrici, risulta utile sfruttare il diossido di iridio, che garantisce la trasparenza ottica. Inoltre, dal momento che i MEAs operano in ambienti fisiologici acquosi in cui vi è un'abbondante presenza di ioni, è necessario che le linee conduttrici siano dotate di uno strato di isolante inerte, al fine di evitare una degradazione dei componenti a causa dell'attacco degli ioni. I principali materiali utilizzati come isolanti in questa applicazione sono

la silice ( $\text{SiO}_2$ ) e il nitrato di silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ); tipicamente lo spessore di tale strato inorganico è nell'ordine del 300 ~ 5000 nm. In alternativa ai materiali inorganici, possono essere utilizzati anche polimeri come il polimetilsilossano (PDMS), che permettono di ottenere strati più spessi, nell'ordine di pochi micrometri. Lo strato isolante permette inoltre di ottenere un segnale migliore, minimizzando il contributo del rumore di fondo.

Dopo aver isolato gli elettrodi metallici, vengono praticati dei fori sullo strato isolante in corrispondenza di entrambe le estremità della linea metallica, per esporre i soli elettrodi. Questo processo viene realizzato grazie a materiali che variano a seconda dell'isolante che è stato applicato; ad esempio, per incidere superfici di  $\text{SiO}_2$  si possono usare soluzioni tampone di acido fluoridrico, mentre per praticare fori su strati di PDMS viene usato un processo di sollevamento.

Infine, è necessario che ci sia un collegamento adeguato tra gli elettrodi di contatto del dispositivo e le schede per circuito stampato ("PCB board"), tramite cui le misure rilevate dagli elettrodi vengono trasferite a un circuito esterno di lettura. Il collegamento viene fatto grazie ad una saldatura in fase solida che prende il nome di "wire bonding", una delle principali tecniche usate nella microelettronica per la connessione tra circuiti integrati, in questo caso rappresentati dagli elettrodi, e schede PCB. A tale scopo, i materiali utilizzati sono l'oro, di cui sono costituiti i cavi per la connessione, e talvolta delle particolari colle conduttive, che rinforzano la saldatura. Nel caso in cui vi sia un numero di elettrodi che va oltre a qualche migliaio, questa tecnica risulta poco conveniente; si devono quindi utilizzare altre tecniche per circuiti integrati su larga scala, al fine di ridurre il numero di connessioni esterne e rendere quindi il circuito più efficiente.

Un accorgimento particolare è rivolto ai dispositivi destinati all'analisi di colture cellulari. In questo caso, è necessario che ci sia un anello, di Teflon o di vetro, integrato sulla superficie del MEA, in modo tale da trattenere sia le cellule che il medium di coltura necessario per il nutrimento cellulare, impedendone la dispersione. Talvolta risulta necessario provvedere all'installazione di un sottile strato di membrana da sovrapporre all'anello, che sia impermeabile all'acqua ma permeabile all'aria in modo tale da impedire l'evaporazione della soluzione contenuta in esso. Per creare questa membrana si usa l'etilene-propilene fluorurato (FEP), un copolimero termoplastico che risulta trasparente alla vista e, pertanto, ottimo per questo tipo di utilizzo. [8]

## CAPITOLO 3:

### Condizionamento dei MEAs

Il condizionamento del segnale consiste nell'elaborazione preliminare del segnale stesso, al fine di renderlo adatto a essere trattato dal sistema di acquisizione ed elaborazione. Dal punto di vista circuitale, il condizionamento comprende tutti i circuiti modellabili come bipoli lineari che prendono in ingresso un segnale elettrico, derivante da un sensore o da un trasduttore, e producono in uscita un segnale elettrico che andrà al successivo blocco di conversione analogico-digitale.

Una volta condizionato, il segnale deve soddisfare dei requisiti minimi. Innanzitutto, il livello del segnale deve essere adattato ai limiti imposti in uscita dal convertitore analogico-digitale. Inoltre, l'effetto di carico prodotto sulla sorgente deve essere minimizzato e deve essere realizzata un'impedenza di uscita adatta, per evitare distorsioni nella successiva elaborazione. Infine, è probabile che ci sia una componente di rumore sovrapposta al segnale utile; è necessario quindi assicurarsi di minimizzare il contributo di tale componente indesiderata, per migliorare il rapporto segnale-rumore.

L'insieme delle operazioni di condizionamento deve garantire l'assenza di distorsione: le caratteristiche essenziali del segnale originario devono rimanere inalterate, sia nel tempo che in frequenza. Ciò significa che il circuito di condizionamento deve innanzitutto assicurare un guadagno costante e indipendente dalla frequenza, e in secondo luogo deve avere una fase lineare, per ottenere una semplice traslazione del segnale nel tempo senza provocarne distorsioni; ciò si riassume in una serie di trasformazioni lineari e tempo-invarianti.

Gli strumenti elettronici che svolgono il ruolo di condizionamento del segnale sono gli amplificatori operazionali, i quali permettono di amplificare o attenuare il segnale, adattando il guadagno dello strumento alle esigenze, ed eliminando o aggiungendo un offset. Il circuito più utilizzato per svolgere queste operazioni è rappresentato dall'amplificatore da strumentazione (INA), la cui configurazione è riportata di seguito.

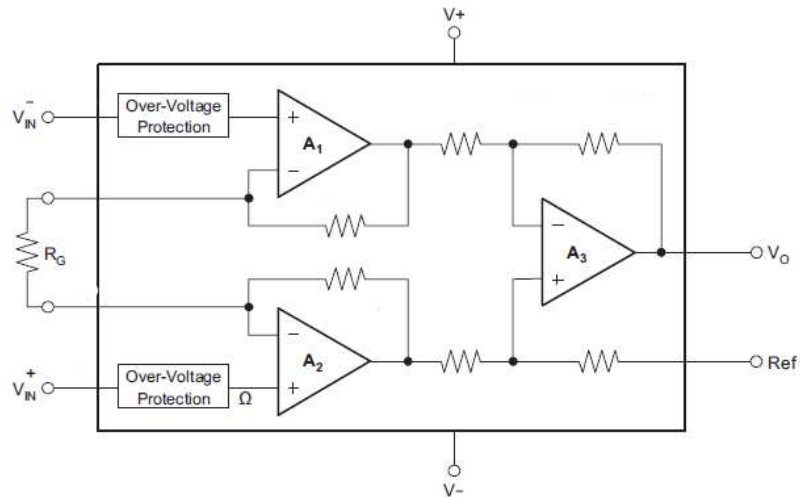


Figura 11: Struttura schematica del circuito di un amplificatore da strumentazione.

Il circuito illustrato deriva dalla struttura di un amplificatore differenziale ideale, che permette di ottenere in uscita una tensione direttamente proporzionale alle tensioni fornite in ingresso, trascurando la loro tensione media. Ciò risulta particolarmente utile nelle applicazioni biomediche, in quanto i segnali acquisiti sono generalmente piccoli in ampiezza rispetto alle tensioni di modo comune. La particolare configurazione degli INA permette di ottenere una impedenza di ingresso molto elevata, utile per evitare effetti di distorsione del segnale, e una impedenza di uscita molto ridotta, essenziale per non avere un effetto di carico significativo sugli elementi circuitali successivi che potrebbero essere danneggiati. Infine, uno dei punti di forza dell'amplificatore da strumentazione è la possibilità di scegliere il valore da attribuire alla resistenza indicata con  $R_G$ , in quanto essa è rappresentata da un componente esterno che deve essere inserito dall'utilizzatore; variando il valore di  $R_G$  si può modificare il guadagno dello strumento a seconda della necessità. I valori delle altre resistenze non possono essere modificati, così come non è possibile variare le funzioni di trasferimento dei tre amplificatori.

Nello specifico delle matrici di elettrodi micrometriche per l'acquisizione di segnali elettrici provenienti da cellule elettricamente attive, un metodo per prevenire la degradazione del segnale consiste nel porre il circuito di condizionamento il più vicino possibile agli elettrodi; tuttavia, lo spazio disponibile è molto ridotto e limitato dalla spaziatura tra gli elettrodi. Inoltre, dal momento che è possibile che uno stesso elettrodo capti segnali provenienti da cellule

diverse, è necessario utilizzare una frequenza di campionamento adatta per distinguere le componenti del segnale derivanti da più cellule.

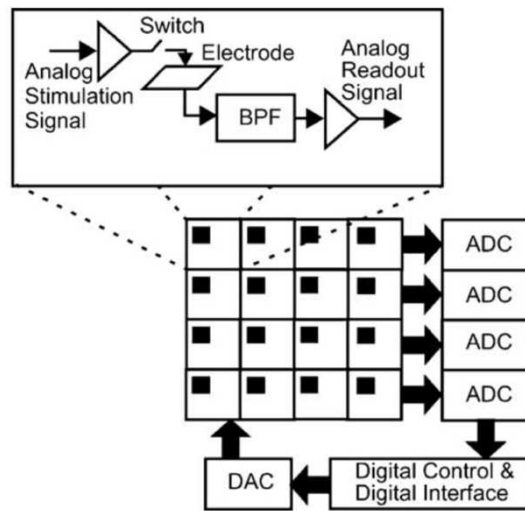
La frequenza con cui i potenziali d'azione si sviluppano nei neuroni e nelle cellule muscolari variano tra 1 Hz e 5 kHz: in particolare, nelle cellule neuronali la frequenza con cui si presenta il potenziale d'azione può avvenire in un range tra 100 Hz e 5 kHz, mentre nelle cellule muscolari cardiache si verifica più raramente con frequenza compresa tra 1 Hz e 1 kHz. Il valore scelto per la frequenza con cui campionare il segnale deve rispettare il teorema di campionamento di Nyquist-Shannon, secondo cui la minima frequenza di campionamento per garantire l'integrità dell'informazione del segnale analogico misurato deve essere maggiore del doppio della frequenza massima del segnale, se esso è a banda limitata. Tuttavia, essendo i segnali reali non a banda limitata, è consigliabile utilizzare una frequenza di campionamento che sia maggiore di almeno cinque volte la frequenza massima del segnale. Tenendo conto di queste considerazioni, una frequenza di campionamento ragionevole per le applicazioni in analisi è 20 kHz. [9]

Per diminuire la larghezza di banda delle componenti indesiderate e per garantire la condizione di anti-aliasing, si può utilizzare un filtro passa-banda con frequenza centrale di 1 kHz; le frequenze di taglio possono essere poste, ad esempio, a 100 Hz e 50 kHz. Il filtro passa banda può essere implementato utilizzando un filtro passa-basso seguito da un filtro passa-alto.

Il primo stadio, costituito dal filtro passa-basso con guadagno pari a un fattore 100, permette di misurare segnali di ampiezza nell'ordine delle decine di microvolt, in quanto nella banda compresa tra i 100 Hz e i 100 kHz la componente di rumore causata dall'amplificazione risulta minore di  $10 \mu\text{V}_{\text{RMS}}$ . Oltre a ciò, viene usato un amplificatore operazionale internamente compensato che agisce come un filtro passa-basso con frequenza di taglio variabile tra 20 kHz e 100 kHz. L'insieme dei due amplificatori garantisce l'assenza di aliasing, fondamentale per i successivi stadi. Il secondo stadio è costituito da un filtro passa-alto con frequenza di taglio di 100 Hz e un guadagno di 10. In questo modo, il segnale in uscita dal secondo stadio viene attenuato e inviato al blocco di conversione analogico-digitale attraverso un multiplessatore analogico, che permette di commutare diversi canali analogici in ingresso in un unico canale analogico in uscita.

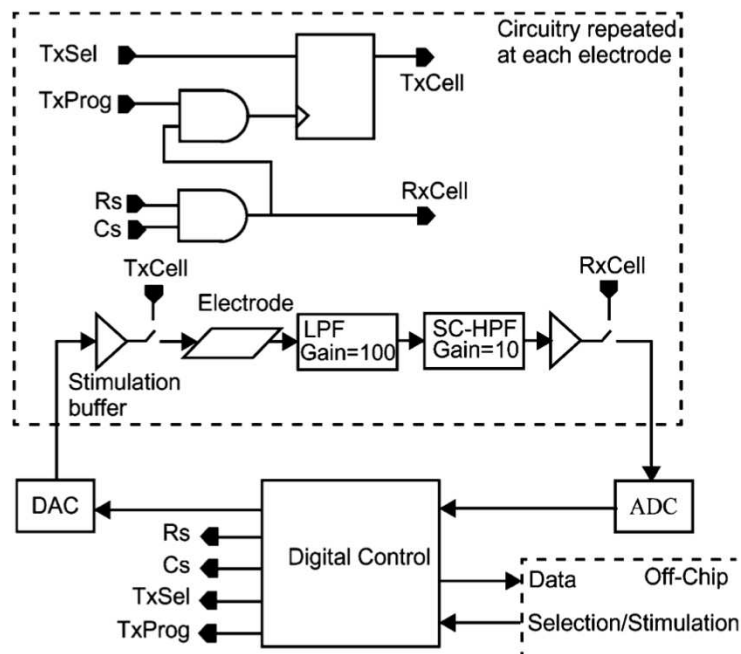
L'intera architettura circuitale è strutturata in modo da essere composta da una serie di unità ripetitive, ognuna delle quali comprende un elettrodo, che svolge il ruolo di trasduttore, il

circuito di condizionamento, costituito dal filtro passa-banda, e il circuito deputato alla stimolazione elettrica delle cellule. L'unità ripetitiva può essere schematizzata come in *Figura 12*.



*Figura 12: Diagramma a blocchi dell'architettura dell'unità ripetitiva.*

All'interno del sistema di acquisizione, il circuito di condizionamento si inserisce quindi come illustrato in *Figura 13*, dopo la conversione digitale-analogica del segnale proveniente dal blocco di controllo e prima della conversione analogico-digitale del segnale acquisito. [10]



*Figura 13: Diagramma a blocchi del sistema per la stimolazione e l'acquisizione.*

## **CAPITOLO 4:**

### **Circuiti di trasduzione**

Un importante aspetto da tenere in considerazione nella progettazione di un sistema di misura basato su MEA è la tipologia di segnale che si vuole andare a rilevare con tale dispositivo. A seconda della risoluzione che si desidera ottenere, quindi a seconda che l'oggetto della misura sia una singola cellula o piuttosto un insieme di cellule tra loro adiacenti, i MEAs avranno dimensioni e strutture circuitali diverse. Inoltre, se l'elettrodo viene utilizzato anche per la stimolazione cellulare, è importante tenere conto della capacità di carica necessaria: è indispensabile che l'elettrodo sia in grado di mediare le reazioni che avvengono in corrispondenza dell'interfaccia tra substrato ed elettrolita, per fare in modo che la variazione di potenziale a livello circuitale si traduca in un flusso di ioni nell'elettrolita, che porterà a sua volta alla stimolazione delle cellule adiacenti.

#### **4.1 Elettrodi utilizzati**

Gli elettrodi utilizzati nelle matrici di elettrodi micrometriche si possono riassumere in tre categorie.

La prima classe è costituita dagli elettrodi realizzati con molti fili di grandezza micrometrica, completamente isolati ad eccezione delle punte, che sono deputate alla rilevazione del potenziale extracellulare; le matrici micrometriche che presentano elettrodi di questo tipo vengono definite "microwire arrays". Grazie alla loro struttura, dispositivi di questo genere possono essere applicati anche a livelli di profondità elevati dei tessuti. Gli elettrodi, in questo caso, vengono principalmente realizzati con materiali metallici; tuttavia, a causa della bassa impedenza dei metalli con cui vengono realizzati per il range di frequenze di interesse, ovvero quelle del potenziale extracellulare, questi elettrodi risultano avere un rapporto segnale-rumore basso. Inoltre, proprio per come sono strutturati, non sono compatibili con la presenza di circuiti elettronici integrati. Un ulteriore problema di questo tipo di dispositivi è che, durante l'inserimento nel sito specifico, c'è il rischio che le estremità dei fili si spostino dalla loro conformazione iniziale; è quindi difficile prevedere con certezza la localizzazione dei segnali rilevati.

Un'alternativa è rappresentata da matrici realizzate tramite microfabbricazione, definite con termine "micromachined arrays", tramite cui è possibile simultaneamente acquisire dati e stimolare le cellule. Questi dispositivi possono essere realizzati utilizzando sia materiali metallici che silicene, facendo uso di tecniche di litografia. Similmente al caso precedente, gli elettrodi composti da materiali metallici non sono compatibili con la presenza di circuiti integrati; tuttavia, rappresentano un miglioramento rispetto agli elettrodi a microfilamenti in quanto, grazie a una levigatura della superficie del metallo tramite tecniche elettrochimiche e a un rivestimento in platino, l'impedenza viene ridotta e il segnale rilevato risulta di qualità migliore. Un ulteriore miglioramento strutturale si ottiene utilizzando matrici in silicene, che permettono di monitorare l'attività cellulare per periodi di tempo relativamente lunghi e di stimolare i tessuti. La microfabbricazione ha il vantaggio di poter stabilire la distanza tra gli elettrodi nel momento della costruzione del dispositivo, eliminando la possibilità che questi si spostino nel momento dell'impianto.

Infine, si possono realizzare anche matrici di elettrodi flessibili, tramite l'utilizzo di polimeri come il poliimmide, che permettono di evitare il danneggiamento dei tessuti durante l'applicazione e garantiscono una migliore aderenza al substrato di interesse. Tuttavia, per come sono costruiti, questo tipo di matrici presentano elettrodi con superfici meno sensibili e, di conseguenza, con una peggior selettività. [3], [11]

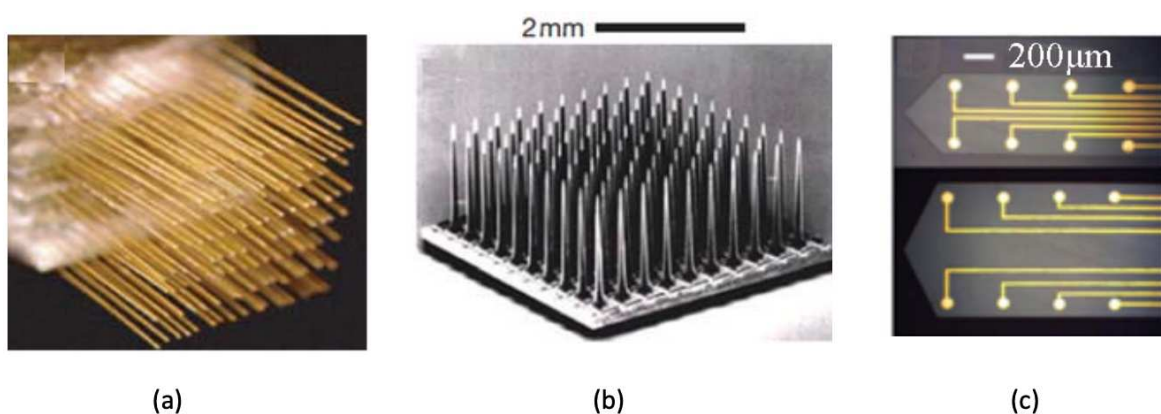


Figura 14: Tipologie di elettrodi diverse: (a) "microwire array", (b) "micromachined array", (c) matrice di elettrodi flessibile.



## 4.2 Trasduttori utilizzati

Le versioni più recenti delle matrici di elettrodi micrometriche sono dotate di trasduttori multipli, per migliorare la capacità del sistema di distinguere la provenienza precisa del segnale rilevato, anche in presenza di un vasto numero di cellule in analisi. I MEAs possono essere dotati sia di trasduttori passivi che di trasduttori attivi, a seconda delle esigenze.

I dispositivi che sono dotati di trasduttori passivi sono basati sulla presenza di elettrodi integrati in substrati in vetro o in silicone, fissati tramite cablaggio ad amplificatori ed utilizzati in applicazioni sia in vitro che in vivo. Queste tipologie di trasduttori producono un cambiamento dei parametri del segnale in uscita a causa dell'interazione con il sistema in analisi; sono quindi modellabili come un parallelo tra un generatore di tensione ausiliario e l'impedenza caratteristica del sensore. In questo modo, il segnale che si rileva sarà dipendente in modo proporzionale dal misurando.

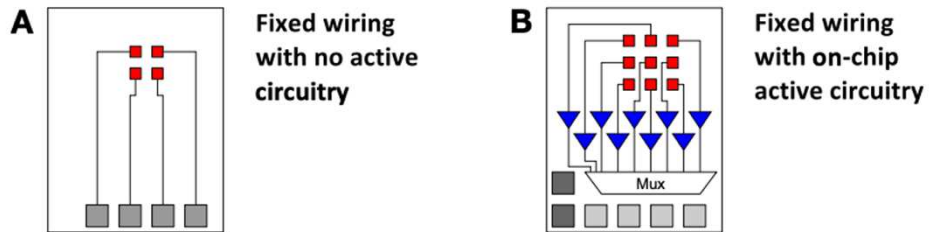
Successivamente, ai componenti passivi sono stati affiancati anche trasduttori attivi, sfruttando la conoscenza di tecnologie della microelettronica. I componenti attivi permettono di convertire l'energia derivante dal misurando in energia di tipo elettrico; sono quindi schematizzabili come generatori di tensione o di corrente.

I principali trasduttori attivi utilizzati per realizzare questi dispositivi sono basati sulla presenza di transistor ad effetto di campo, abbreviati con l'acronimo FET (Field Effect Transistor). I FET sono componenti circuitali attivi dotati di tre terminali: drain, source e gate. In questi dispositivi, la corrente che scorre tra source e drain viene comandata mediante un campo elettrico; il campo elettrico in questione viene generato attraverso l'uso del gate.

L'integrazione di componenti attivi, come i FET, consente di ottenere una densità molto più alta di elettrodi nel dispositivo di misura. Inoltre, grazie alla drastica riduzione di resistenze e capacità parassite derivante dalla interazione tra componenti attivi e passivi, il segnale rilevato può essere amplificato con una qualità eccellente, facilitando la rilevazione di segnali deboli grazie all'immediato condizionamento del segnale e alla sua digitalizzazione. Gli elementi circuitali attivi integrati permettono poi la moltiplicazione dei segnali nel tempo, facilitando il trasferimento delle informazioni rilevate dai numerosi canali di trasmissione, derivanti da elevate quantità di elettrodi presenti in ogni chip, e aumentando la risoluzione spazio-temporale del dispositivo. Infine, questa co-integrazione permette di avere delle funzionalità aggiuntive,

come ad esempio la stimolazione elettrica, di particolare interesse nell'utilizzo in vivo, la localizzazione di segnali elettrici direttamente a livello del chip. [1], [4]

Grazie all'utilizzo integrato di trasduttori attivi e passivi, si possono ottenere varie configurazioni di elettrodi nelle matrici, per adattare il dispositivo alle esigenze applicative.



*Figura 15: Esempi di architetture generalmente utilizzate nella fabbricazione di MEA: (A) connessione di elettrodi in assenza di componenti attivi, (B) connessione di elettrodi utilizzando componenti attivi direttamente a livello del substrato.*

## CAPITOLO 5:

### Possibili interferenze: rumore

Uno degli aspetti cruciali da tenere in considerazione nel momento in cui si vuole acquisire un segnale tramite MEAs è l'influenza della catena di acquisizione, ovvero il contributo in termini di rumore che viene a sovrapporsi al segnale che si desidera rilevare.

Il rumore, nell'ambito di applicazione dell'elettronica, rappresenta un insieme di segnali indesiderati di carattere stocastico che vanno a sovrapporsi al segnale di interesse, corrompendolo in modo irreversibile.

Il rumore può essere generato da diversi fattori; in particolare, a seconda della causa che lo ha generato, il rumore può assumere forme diverse e può contribuire in modo diverso alla corruzione del segnale utile. È importante quindi considerare la fonte del rumore, al fine di prevedere un adeguato strumento nella catena di acquisizione ed elaborazione del segnale per limitarne l'influenza sulle informazioni rilevate.

In particolare, nell'applicazione dei MEAs risulta essenziale differenziare tre tipologie di rumore: il rumore biologico, il rumore derivante dall'interfaccia elettrodo-elettrolita e il rumore del dispositivo.

Il rumore biologico è principalmente rappresentato dall'attività elettrica delle cellule adiacenti all'area di interesse dell'elettrodo: infatti, un elettrodo posto in corrispondenza di una certa cellula può rilevare i potenziali d'azione di cellule che si trovano relativamente lontane dall'elettrodo, fino ad una distanza di circa 100  $\mu\text{m}$ . Altri fattori che influenzano questo tipo di rumore sono l'attività ionica, ad esempio la generazione di potenziali sottosoglia in zone vicine, e il rumore sinaptico, dovuto proprio alla natura stocastica della trasmissione sinaptica. Il rumore biologico rappresenta la fonte di maggiore influenza sul segnale di interesse in queste applicazioni.

Il rumore dell'interfaccia elettrodo-elettrolita è invece causato dall'interfaccia tra liquido e metallo nella zona di contatto tra l'elettrodo e la soluzione elettrolita. A seconda della frequenza, si possono distinguere diversi fattori; la maggiore influenza è data dal rumore termico, con una frequenza sopra i 10 Hz, e dall'interferenza di rete, con una frequenza di 50 Hz o 60 Hz. Il contributo di quest'ultima interferenza al segnale utile può essere minimizzato

con un adeguato isolamento e messa a terra, nonché accorciando la distanza tra elettrodo e amplificatore.

Infine, a causa della presenza di sistemi di amplificazione e digitalizzazione nel circuito deputato all'acquisizione, il segnale viene ulteriormente alterato dal rumore derivante dallo stesso dispositivo. Il contributo principale a questa classe di rumore è dato dall'interferenza provocata dall'amplificatore analogico; è necessario assicurarsi quindi che gli amplificatori non limitino le performance del sistema di acquisizione dati. Anche la quantizzazione contribuisce all'insorgere di interferenze nel segnale, a causa dell'errore inevitabile di discretizzazione provocato dalla conversione da analogico a digitale. La qualità del segnale registrato può infine essere influenzata dalla trasmissione dei dati, soprattutto nel caso in cui sia necessario usare una compressione con perdita. [4]

All'interno di un sistema di acquisizione e misura, è possibile quantificare il rumore in relazione alla potenza del segnale utile grazie a una grandezza adimensionale che prende il nome di rapporto segnale-rumore (SNR). Dal punto di vista pratico, l'SNR si misura come rapporto tra la potenza del segnale e la potenza del rumore come segue:

$$SNR = \frac{P_{segnale}}{P_{rumore}}$$

Spesso risulta utile esprimere il rapporto in Decibel, utilizzando le potenze:

$$SNR_{dB} = 10 \log_{10} \frac{P_{segnale}}{P_{rumore}}$$

oppure le tensioni efficaci:

$$SNR_{dB} = 20 \log_{10} \frac{V_{segnale}}{V_{rumore}}$$

I valori che può assumere il rapporto segnale-rumore variano tra zero, che corrisponde a un segnale con grande interferenza causata dal rumore, e numeri molto elevati tendenti all'infinito, che rappresenta l'idealità della condizione di misura in cui la potenza del rumore è nulla.

In generale, per ottenere un buon rapporto segnale-rumore, al di là del contributo che può dare il rumore stesso, bisogna considerare dei fattori fondamentali, a partire dai materiali scelti, che devono garantire una buona conduzione del segnale. Oltre a ciò, anche l'estensione della superficie degli elettrodi e la loro densità nella matrice contribuiscono a determinare

cambiamenti nel SNR; in particolare, l'impedenza dell'elettrodo diminuisce con l'aumentare della dimensione della sua superficie, provocando un miglioramento del SNR. Tuttavia, un aumento nella dimensione dell'elettrodo può causare una diminuzione della sua selettività e della sensibilità nel discriminare eventi diversi derivanti da cellule diverse.

È quindi fondamentale innanzitutto scegliere la dimensione ottimale degli elettrodi a seconda delle specifiche dell'applicazione e, successivamente, procedere con l'ottimizzazione del rapporto segnale-rumore tramite tecniche di elaborazione del segnale.

## CAPITOLO 6:

### Caratterizzazione dei MEAs

Le prestazioni delle matrici di elettrodi micrometriche possono essere analizzate e quantificate svolgendo diverse tipologie di misura che ne enfatizzano le caratteristiche in condizioni diverse. Particolarmente rilevante è la caratterizzazione dinamica dei MEAs, ovvero l'analisi del comportamento del dispositivo in condizioni di rapide variazioni di ingresso in termini di risposta del sistema in tempo e in frequenza.

Tra i principali utilizzi di questa tipologia di sistemi rientrano le misure di impedenza e le misure di potenziale.

#### 6.1 Misure di impedenza

L'impedenza rappresenta un indice per la misura dell'abilità di un circuito di opporsi al passaggio di corrente elettrica. L'impedenza elettrochimica delle cellule elettricamente attive può essere misurata tramite la rilevazione della corrente che fluisce nella cellula stessa dopo aver applicato una certa differenza di potenziale, determinata a sua volta dal passaggio di una corrente alternata. Generalmente vengono utilizzati segnali sinusoidali di ampiezza ridotta per ottenere una risposta cellulare che sia il più possibile lineare, ovvero in modo tale che il segnale rilevato in risposta allo stimolo risulti solo sfasato nel tempo e mantenga il suo andamento senza subire distorsioni. Inoltre, vengono preferite correnti alternate piuttosto che continue, in quanto c'è il rischio che queste ultime interferiscano con i processi cellulari attraverso, ad esempio, la polarizzazione della membrana cellulare; le correnti alternate risultano perciò meno invasive.

Dal momento che si utilizzano correnti alternate, il cui contributo varia al variare della frequenza, l'impedenza misurata sarà anch'essa un segnale complesso, funzione della frequenza. Nel caso il segnale applicato sia di tipo sinusoidale, l'impedenza  $Z(w)$  del sistema può essere calcolata come segue:

$$Z(w) = \frac{E_t(w)}{I_t(w)} = \frac{E_0 \sin(wt)}{I_0 \sin(wt + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(wt)}{\sin(wt + \phi)} = Z' + iZ''$$

Nell'equazione sopra riportata,  $E_t$  rappresenta il segnale eccitatorio e  $I_t$  rappresenta il segnale di risposta, che risulta avere stessa pulsazione  $w$  del segnale originario ma sfasato rispetto ad esso di un certo valore  $\phi$ . L'impedenza è quindi un parametro che dipende dalla frequenza.

Dal momento che l'impedenza viene rappresentata da un segnale complesso, si possono distinguere due contributi: i contributi reali ( $Z'$ ) sono dovuti a comportamenti di tipo resistivo, mentre i contributi immaginari ( $Z''$ ) sono dovuti a comportamenti di tipo capacitivo o induttivo, se presenti. In particolare, alle basse frequenze prevalgono gli effetti capacitivi, mentre alle alte frequenze dominano gli effetti resistivi.

Grazie alla misura dell'impedenza cellulare, è possibile monitorare lo stato delle cellule che proliferano sulla superficie degli elettrodi della matrice, sfruttando una tecnica che prende il nome di spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS, Electrochemical Impedance Spectroscopy). Questa tecnica è in grado di monitorare tutti i processi fisiologici associati con la morfologia cellulare o con il cambiamento di impedenza della membrana cellulare; infatti, quando uno strato di cellule viene fatto crescere sulla superficie degli elettrodi, aderendo ad essi, si verifica un cambiamento di impedenza all'interfaccia tra elettrodo ed elettrolita. L'impedenza può quindi essere rilevata dal sistema di misura, permettendo di monitorare lo stato della coltura cellulare. Tra gli ambiti applicativi della EIS ci sono la rilevazione della proliferazione cellulare, i test di tossicità e la ricerca tumorale. [7], [12]

I risultati ricavati dalla spettroscopia di impedenza elettrochimica vengono analizzati utilizzando dei modelli di circuiti elettrici equivalenti che schematizzano l'interfaccia tra elettrodi ed elettrolita. I componenti circuitali utilizzati sono generalmente resistori, che rappresentano l'influenza delle soluzioni sulla resistenza, e condensatori, la cui capacità rappresenta invece la resistenza dovuta agli strati di materiale che rivestono gli elettrodi.

Uno dei modelli più utilizzati per rappresentare il circuito equivalente che si forma tra un elettrodo e la soluzione elettrolita è la cella di Randles semplificata, riportata in *Figura 16*. Nello schema, la resistenza  $R_s$  rappresenta la resistenza della soluzione elettrolita, misurabile tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento; il valore di questo elemento dipende principalmente dalle caratteristiche geometriche degli elettrodi utilizzati. Il condensatore  $C_{dl}$  è il modello equivalente per l'effetto che provoca il rivestimento dell'elettrodo con del materiale isolante, utilizzato per proteggere l'elettrodo sottostante dalla degradazione; infatti, tra elettrodo ed elettrolita si forma un doppio strato elettrico in cui gli ioni migrano dalla soluzione all'elettrodo, e viceversa. Il valore che tale capacità assume dipende da diversi fattori, tra cui la temperatura di lavoro, la concentrazione dell'analita e il materiale utilizzato come rivestimento.

Infine,  $R_p$ , della resistenza di polarizzazione, è la resistenza che si crea quando si applica un certo potenziale all'elettrodo, che viene quindi polarizzato; questo fenomeno causa la formazione di una certa corrente indotta, che deve essere tenuta in considerazione nel momento in cui si analizzano le misure effettuate.

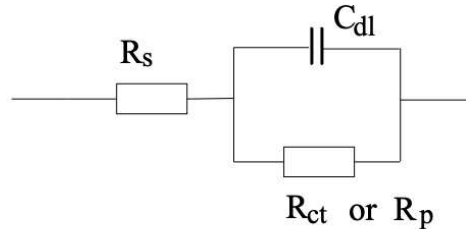


Figura 16: Cella di Randles semplificata: diagramma schematico.

Lo schema della cella di Randles semplificata, tuttavia, non tiene conto della degradazione a cui vanno incontro i materiali utilizzati col tempo. Per evidenziare anche questo fenomeno si utilizza quindi un circuito equivalente più completo, riportato in *Figura 17*. In questo caso, il rivestimento degli elettrodi è rappresentato dalla capacità  $C_c$ , mentre la resistenza  $R_{po}$  rappresenta la resistenza esibita dai pori che si formano nello strato di rivestimento metallico degradato;  $R_s$  indica, come nel caso precedente, la resistenza esibita dalla soluzione elettrolita. Il parallelo tra  $R_{ct}$  e  $C_{dl}$  rappresenta invece l'interfaccia tra il metallo rimasto scoperto dal rivestimento e l'elettrolita.

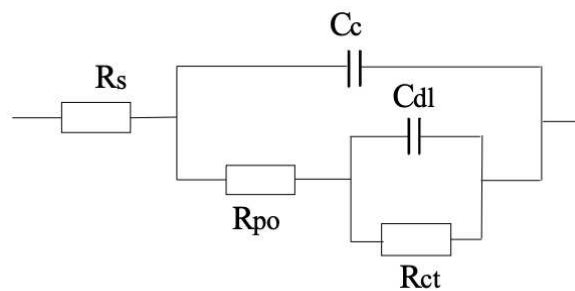


Figura 17: Circuito equivalente di un sistema di misura con rivestimento metallico che subisce degradazione col tempo.

Nella pratica, una volta acquisiti i dati di una prova con EIS, si possono ricostruire diversi modelli che interpretino il comportamento rilevato; i modelli empirici ricavati vanno quindi trattati con le dovute accortezze. [13]



Tramite la spettroscopia di impedenza elettrochimica si possono quindi monitorare i cambiamenti di morfologia delle cellule che crescono sulla superficie degli elettrodi e i cambiamenti nella composizione chimica della soluzione elettrolita, che comportano entrambi una modificazione dell'impedenza del sistema. [5]

## **6.2 Misure di potenziale**

Oltre alle valutazioni di impedenza, le matrici di elettrodi micrometriche permettono di eseguire anche misurazioni di cambiamenti di potenziale sotto forma di voltaggio che si verifica in presenza dell'occorrenza di un potenziale d'azione in cellule elettricamente attive.

A partire dagli schemi elettrici equivalenti presentati in precedenza, si possono derivare modelli elettrici caratteristici per interfacce complesse, considerando la distribuzione spaziale degli elettrodi sulla superficie e le proprietà della membrana cellulare delle cellule in analisi.

Per creare questi modelli, si assume che la superficie del dispositivo micrometrico rappresenti un isolante; ciò è ragionevole in quanto le matrici di elettrodi micrometriche presentano una impedenza di ingresso molto elevata, che impedisce ad eventi che avvengono nell'elettrolita di influenzare l'elettrodo. Questa semplificazione permette di separare il problema di schematizzare l'interfaccia in due parti: dalla parte dell'elettrolita e dalla parte del metallo.

A partire dal modello di interfaccia realizzato, si può interpretare il potenziale rilevato come potenziale medio presente nel sito di rilevazione. Il segnale voltmetrico rilevato, inoltre, ha una morfologia che dipende strettamente dalle caratteristiche elettriche dell'interfaccia. In particolare, l'orientazione e la distanza tra le sorgenti del segnale e l'elettrodo che lo rileva influenza sia l'ampiezza che la forma del segnale; questo aspetto permette di stimare la distanza tra la sorgente e l'elettrodo della matrice che sta rilevando il segnale. Risultati molto precisi possono essere ottenuti utilizzando MEAs ad alta densità di elettrodi. [4]

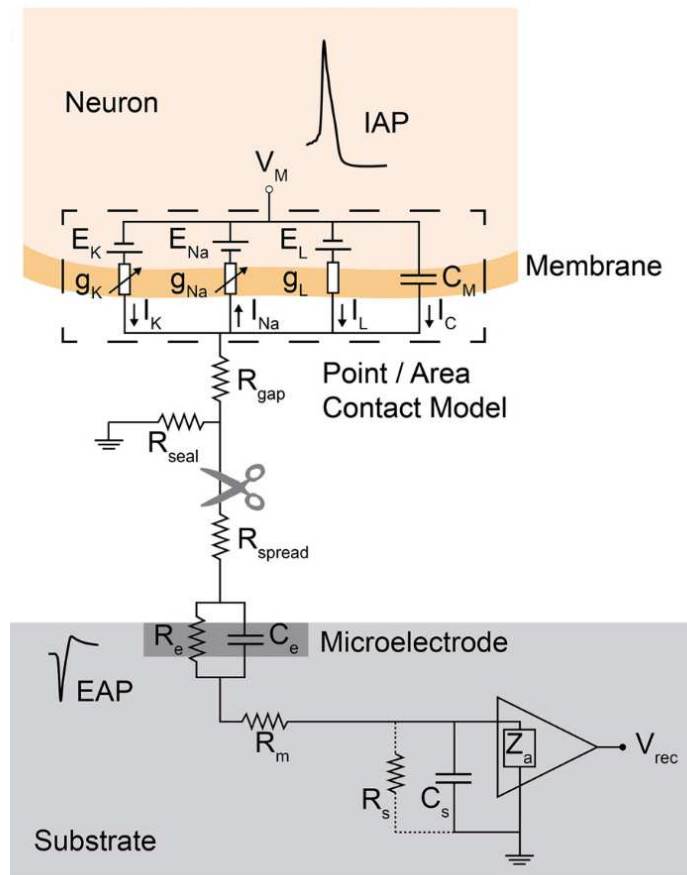


Figura 18: Esempio di modello circuitale equivalente dell'interfaccia del MEA: in questo caso, la cellula oggetto di studio è un neurone. Modelli simili possono essere ottenuti per altre tipologie di cellule.

A causa dell'influenza di parametri diversi sulla morfologia del segnale rilevato, quest'ultimo potrebbe risultare distorto rispetto al segnale originale; tali alterazioni sono percettibili sia dal punto di vista dell'ampiezza che dal punto di vista dello sfasamento.

Lo sfasamento del segnale è dovuto principalmente all'utilizzo di sistemi di filtraggio nel sistema di acquisizione del segnale; qualsiasi filtro, sia esso analogico o digitale, introduce uno sfasamento del segnale variabile in frequenza, ovvero un ritardo di gruppo il cui contributo varia al variare della frequenza. Per ovviare a questo problema, spesso si utilizzano due filtri in sequenza, il secondo dei quali impone uno sfasamento di modulo uguale ma di segno opposto al primo; questa architettura permette di ottenere un segnale senza sfasamento rispetto all'originale. La distorsione di fase viene raramente considerata in quanto il suo contributo al segnale rilevato è spesso poco rilevante; in alcuni casi può quindi essere trascurata.

Il contributo del sistema di misura sull'ampiezza del segnale rilevato è invece più significativo; in particolare, il segnale misurato risulta attenuato in ampiezza rispetto all'originale di un certo fattore che dipende da diversi aspetti del sistema di misura stesso.

Innanzitutto, un ruolo cruciale è svolto dall'impedenza dell'elettrodo di lavoro e dalla sua dipendenza dalla frequenza: l'attenuazione del segnale risulta minore per frequenze basse e maggiore per frequenze alte. In secondo luogo, anche la soluzione elettrolita in cui le cellule e gli elettrodi sono immersi contribuisce a far variare l'attenuazione del segnale; in particolare, l'attenuazione diminuisce con l'aumentare della concentrazione di ioni presenti in soluzione.

Queste osservazioni riguardanti la distorsione dei segnali voltmetrici rilevati tramite elettrodi sono di fondamentale importanza quando si vogliono eseguire delle misure di potenziale, in quanto, se non considerate, potrebbero portare a conclusioni incerte o non corrette nel momento dell'analisi dei dati acquisiti. A fronte di ciò, è necessario usare le dovute accortezze nella scelta delle tecniche di analisi ed elaborazione dei segnali, in modo tale da minimizzare le distorsioni.

[14]

### **6.3 Segnali rilevati e loro analisi**

I segnali rilevati tramite MEAs sono spesso distorti, convoluti e corrotti dal rumore; è necessario quindi eseguire delle operazioni sul segnale stesso, in modo da poter ricavare le informazioni desiderate. L'elaborazione digitale del segnale proveniente dalle matrici micrometriche prevede solitamente tre passaggi fondamentali: il filtraggio, la rilevazione di picco e la classificazione dei segnali.

Il primo passo consiste nel filtraggio del segnale grezzo, per separare il segnale utile dal rumore e ottenere un rapporto segnale-rumore più elevato; per fare ciò si utilizza un filtro passa-banda, con frequenze di taglio poste a 300 Hz e 3000 Hz. Il filtraggio, tuttavia, può causare una distorsione di fase e una conseguente alterazione del segnale; questo inconveniente può essere evitato usando filtri non causali, che quindi utilizzano anche istanti futuri per svolgere i calcoli per la ricostruzione del segnale filtrato. D'altra parte, l'implementazione di un filtro non causale richiede l'uso di una memoria temporanea ("data buffer"), risultando ingombrante e poco agevole. Per questo motivo, solitamente vengono comunque utilizzati filtri causali, la cui elaborazione è basata esclusivamente su campioni acquisiti in tempi precedenti e non futuri. Al

fine di minimizzare gli effetti della inevitabile distorsione, si possono mettere in opera degli accorgimenti: una buona prassi può essere rilevare i campioni del segnale con filtri a banda larga, ad esempio da 1 Hz a 7000 Hz, e distorsione di fase trascurabile, e successivamente applicare filtri a banda più ristretta che estraggano informazioni riguardanti le tempistiche del segnale, in cui la forma non influisce, seppure distorta.

La seconda fase consiste nella individuazione dei picchi del segnale (“spike detection”). Si possono usare diversi metodi, il più comune dei quali consiste nell’individuazione di un certo valore di soglia in ampiezza, sotto il quale l’algoritmo numerico ignora gli eventuali picchi trovati, eliminando i casi di falsa rilevazione. In questo caso la soglia viene impostata a un valore pari a cinque volte il livello di riferimento del rumore, calcolato come lo scarto quadratico medio del segnale a media nulla oppure, in presenza di molti picchi, tramite il calcolo della mediana; questo secondo procedimento è meno sensibile ai valori anomali e quindi più robusto. Un metodo alternativo all’elaborazione numerica può essere il template-matching, utile per il riconoscimento di segnali dalle caratteristiche note e basato sul calcolo della correlazione tra segnale in ingresso e segnale del template. [15]

Il terzo ed ultimo passo prevede il raggruppamento e la classificazione dei segnali acquisiti, a seconda della loro forma, per poter attribuire un certo tipo di segnale a una determinata specie cellulare; il processo prende il nome di “spike sorting”. Il risultato finale di quest’ultima fase consiste nel ricavare le seguenti informazioni: il numero di cellule elettricamente attive coinvolte, il treno di impulsi che hanno luogo in ognuna di essa e il loro andamento in termini di forma d’onda.

L’idea è di poter distinguere la provenienza dei segnali, dal momento che cellule di natura diversa producono potenziali d’azione diversi. Nella pratica si possono usare diverse tecniche di estrazione, basate principalmente sull’analisi delle trasformate dei segnali di interesse e sulla elaborazione dei dati ricavati tramite metodi statistici o analitici. Queste tecniche, pur potendo essere automatizzate tramite algoritmi, necessitano di una supervisione manuale per correggere eventuali errori. Un metodo per migliorare le prestazioni dello “spike sorting” consiste nell’utilizzare matrici micrometriche ad alta densità di elettrodi, la cui alta risoluzione spaziale costituisce un grande aiuto nel differenziare le cellule da cui provengono i vari segnali. [4]

## CAPITOLO 7:

### Applicazioni pratiche: stato dell'arte

#### 7.1 Applicazioni in vitro

Le matrici di elettrodi micrometriche costituiscono un importante strumento per lo studio dell'attività elettrica delle cellule e per la comprensione del funzionamento dell'intero sistema tissutale umano, grazie alla possibilità che questi strumenti offrono di osservare il comportamento delle cellule da vicino. Il punto di partenza degli studi in questione che utilizzano i MEAs è l'analisi *in vitro* delle colture cellulari, attraverso cui si può esaminare il comportamento delle cellule di interesse sotto determinate condizioni e parametri altamente controllati. Per questo tipo di studi possono essere utilizzati sia matrici di elettrodi planari che tridimensionali. Nonostante i dispositivi con struttura tridimensionale più recenti forniscano un interessante strumento per l'analisi spaziale dei tessuti, le matrici planari rimangono tutt'ora le più diffuse per le applicazioni *in vitro*.

Uno dei principali oggetti di studio nell'ambito di applicazione dei MEAs nelle colture cellulari è rappresentato dalla dinamica dei neuroni di una certa popolazione cellulare; le connessioni sinaptiche che hanno luogo all'interno delle popolazioni di cellule, essenziali per poter comprendere la complessa natura dei sistemi del corpo umano e realizzarne un modello semplificato. A questo scopo viene sfruttata la duplice funzione dei MEAs, di stimolazione e di acquisizione della risposta cellulare, tramite cui possono essere indagate varie proprietà delle colture, come la velocità di propagazione dell'impulso da cellula a cellula.

Anche le cellule muscolari cardiache sono oggetto di interesse degli studi *in vitro*, in particolare per quanto riguarda la caratterizzazione dell'attività del sistema muscolare sotto determinate condizioni, inclusi studi sui segnali eccitatori che portano ad aritmia cardiaca, per determinarne la natura.

Infine, le matrici di microelettrodi possono essere utilizzate per indagare gli effetti di particolari condizioni ambientali sulle linee cellulari; a tale scopo si utilizzano cellule staminali pluripotenti (iPSCs), che vengono successivamente differenziate in linee cellulari neuronali e cardiache. Grazie a questo tipo di studi possono essere svolti studi farmacologici e funzionali, utilizzando i MEAs e la cosiddetta tecnologia 'on a chip'. [16], [17]

Le matrici di elettrodi micrometriche costituiscono un valido strumento per monitorare gli effetti di medicinali e tossine a livello dei tessuti *in vitro*; inoltre permettono di studiare da

vicino la risposta dell'organismo a condizioni fisiologiche o patologiche, riproducendo i danni che si verificano *in vivo*. Per fare ciò, si utilizzano matrici di elettrodi micrometriche per rilevare la risposta elettrica di varie zone del tessuto in analisi, ottenendo una mappa spaziale che indica come differenti parti del tessuto rispondono al medicinale o alla tossina che si sta somministrando. Un esempio pratico di questa applicazione riguarda lo studio di colture di cellule muscolari cardiache per l'individuazione di farmaci che provocano aritmie. Un parametro importante che può essere la causa di un'aritmia è il prolungamento dell'intervallo QT nell'elettrocardiogramma superficiale, ovvero del tempo che intercorre tra l'eccitazione del ventricolo alla sua ripolarizzazione. Secondo le linee guida fornite dalla regolamentazione dei farmaci ad uso umano, prima di autorizzare la vendita di medicinali è necessario che questi siano testati *in vitro* per assicurare che tra gli effetti collaterali non venga prolungato l'intervallo QT.

A tale scopo, vengono usate matrici di elettrodi micrometriche per rilevare la durata del potenziale d'azione delle cellule che compongono il tessuto muscolare cardiaco a cui è stato somministrato il farmaco da analizzare; in particolare, una maggiore durata del potenziale d'azione corrisponde a un allungamento dell'intervallo QT dell'elettrocardiogramma. Sfruttando questa tipologia di analisi per diverse sostanze che notoriamente causano aritmie, si ottengono dei grafici che riportano l'andamento temporale del potenziale d'azione rilevato dal MEA, che a sua volta dipende direttamente dalla quantità di farmaco somministrato.

Le matrici di microelettrodi costituiscono pertanto uno strumento valido per studiare l'azione provocata dai farmaci sulle funzioni cardiache. [18]

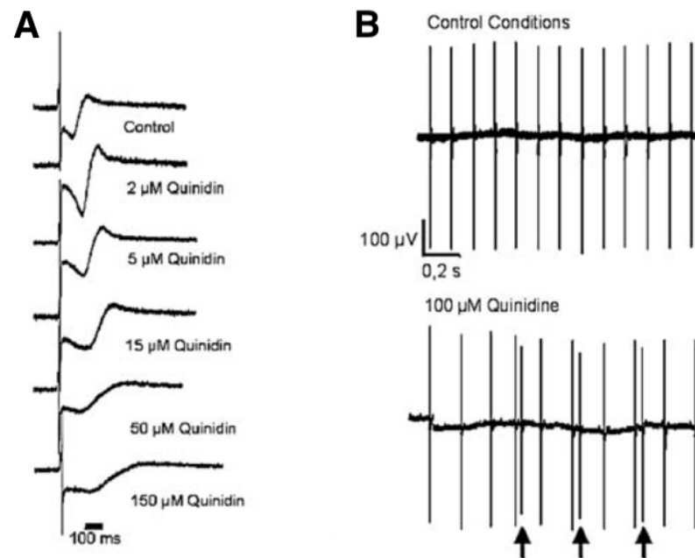


Figura 19: Effetti della chinidina sul potenziale d'azione dei cardiomiociti. A - Influenza di vari dosaggi sul potenziale d'azione delle cellule cardiache. B - Distorsione del ritmo del potenziale d'azione delle cellule cardiache. Le frecce indicano le post-depolarizzazioni precoci provocate dalla chinidina.

## 7.2 Applicazioni in vivo

Le matrici di elettrodi tridimensionali, invece, sono principalmente utilizzate nelle applicazioni *in vivo*; gli studi *in vitro* in cui vengono usati MEAs tridimensionali costituiscono infatti una fase di sperimentazione e verifica della tecnologia che verrà successivamente applicata direttamente a livello del tessuto biologico da analizzare.

Un'applicazione particolarmente interessante coinvolge le matrici di elettrodi nell'analisi del comportamento dei tessuti del cervello umano in condizioni patologiche, tra cui l'epilessia; in questi casi, l'impianto di matrici di elettrodi a livello del cervello umano è giustificato da procedure mediche correlate alla cura della patologia. L'epilessia è una patologia associata a scariche elettriche anomale che si verificano a livello del tessuto cerebrale e che causano crisi convulsive; diverse gravità della patologia comportano una differenziazione anche negli eventi associati alle crisi. Il ruolo dei MEAs in queste applicazioni consiste nel cercare di individuare i meccanismi fisiologici che causano le crisi epilettiche, al fine di poter sviluppare successivamente dei metodi per prevedere o addirittura prevenire gli attacchi epilettici. [16]

## CAPITOLO 8:

### Un esempio sperimentale: caratterizzazione in vitro di elettrodi stampati

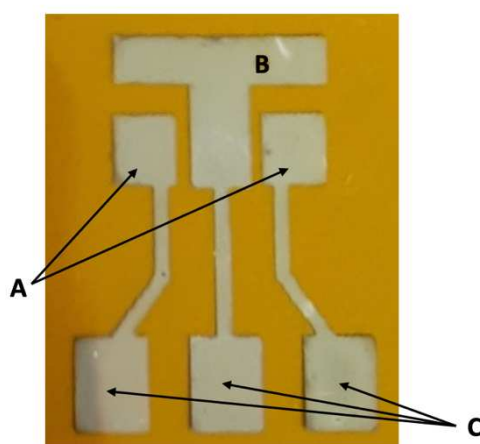
L'elaborato finora presentato fornisce una panoramica delle caratteristiche peculiari delle matrici di elettrodi micrometriche utilizzate largamente in applicazioni sperimentali e cliniche. La trattazione che segue è volta invece alla descrizione di alcune prove sperimentali svolte in laboratorio, in cui l'interesse primo è valutare le prestazioni di misura di alcuni elettrodi, seppur non in forma micrometrica, sotto diverse condizioni. Gli elettrodi stampati che sono stati utilizzati possono essere considerati un modello in scala maggiore di uno dei tanti elettrodi presenti nelle matrici di elettrodi micrometriche.

In particolare, sono state eseguite due tipologie di misure: una valutazione di impedenza, volta ad enfatizzare le caratteristiche dell'elettrodo in termini di risposta in frequenza, e un test di stimolazione e rilevazione, per testare le prestazioni dell'elettrodo in questa sua duplice funzione.

### 8.1 Materiali e metodi

#### 8.1.1 Caratteristiche degli elettrodi

Gli elettrodi utilizzati per queste prove sperimentali si compongono di due elettrodi attivi e un elettrodo di riferimento interposto tra i due; ognuno di questi elettrodi è dotato della propria connessione verso l'elettronica. La geometria del sensore è stampata su un substrato flessibile.



*Figura 20: Fotografia della geometria degli elettrodi stampati utilizzati per le misure: due elettrodi attivi (A), un elettrodo di riferimento (B) e connessioni verso l'elettronica (C).*



I sensori sono stati stampati utilizzando una tecnica di elettronica stampata, facendo uso della stampante a getto d'inchiostro Dimatrix DMP 2850 della FujiFilm. Il substrato scelto è composto da Kapton, un polimide che garantisce flessibilità nell'ottica di utilizzo del sensore in applicazioni in vivo e in vitro; il substrato ha uno spessore di 25  $\mu\text{m}$ . L'inchiostro utilizzato è costituito da una soluzione di nanoparticelle di argento, immerse in un solvente organico. Questo tipo di inchiostro è caratterizzato da un'elevata conducibilità e da un'ottima adesione su substrati flessibili, come quello utilizzato in questo caso.

Lo schema che è stato impresso sul substrato è stato realizzato tramite Inkscape, un software che permette la progettazione della geometria direttamente in pixel, favorendo un'esportazione semplificata nel formato accettato in ingresso dalla stampante. In questo modo risulta più agevole gestire le dimensioni e impostare nella stampante il valore della distanza che intercorre tra gocce consecutive di inchiostro, chiamato "drop-spacing".

Prima di realizzare la stampa, il substrato è stato pulito con alcool isopropilico per rimuovere eventuali granelli di polvere e per migliorare la regolarità dello strato con cui verrà in contatto l'inchiostro. Nel procedere con la stampa, il substrato è stato mantenuto alla temperatura costante di 60°C, che ne ha permesso una prima asciugatura. Successivamente, una volta che la stampa è stata ultimata, i sensori sono stati sinterizzati a 200°C e conservati in una scatola a guanti sigillata ("glove box").

### 8.1.2 Connessione ai sistemi di misura

Per effettuare le misure, il sensore è stato connesso contemporaneamente ad un generatore di segnali, per iniettare il segnale desiderato, e ad un oscilloscopio digitale, che permette di visualizzare la risposta del sensore in termini di segnale di uscita derivante dall'acquisizione degli elettrodi.

Per connettere gli elettrodi ai sistemi di misura sono stati utilizzati dei fili elettrici.

Per collegare il sensore all'oscilloscopio digitale sono stati utilizzati un elettrodo attivo e un elettrodo di riferimento, in modo da ottenere un segnale differenziale come differenza di potenziale tra i due elettrodi in questione. Le estremità dei fili elettrici dalla parte degli elettrodi sono state appoggiate alle connessioni degli elettrodi verso l'elettronica e sono state stabilizzate utilizzando un nastro conduttore, per garantire che le componenti elettriche fossero ben a contatto. Per assicurare la stabilità delle connessioni è stato poi utilizzato un nastro isolante.

Alle estremità opposte sono invece stati applicate le clip del cavo coassiale, assicurandosi che il cavo di massa fosse collegato all'elettrodo di riferimento.

Per quanto riguarda il collegamento con il generatore di segnali, invece, è stato utilizzato un approccio diverso. Il segnale generato è stato iniettato nel circuito per mezzo di un cavo che, nell'estremità rivolta verso gli elettrodi, andasse a immergere la punta all'interno della soluzione PBS che metteva in comunicazione elettrica gli elettrodi del sensore. Al generatore di segnali, quindi, è stato collegato un cavo coassiale con due terminazioni a clip: una collegata al cavo che iniettava il segnale nel circuito, e l'altra collegata allo stesso cavo proveniente dall'elettrodo di riferimento.

Dal canale di uscita del generatore di segnali, per mezzo di un connettore a T, si ripartivano due cavi coassiali: il segnale generato è stato quindi contemporaneamente iniettato al sensore e mandato all'oscilloscopio, per avere un confronto diretto di come il segnale proveniente dagli elettrodi venisse modificato rispetto al segnale originale. Nel generatore, quindi, sono stati utilizzati due ingressi per visualizzare i due segnali in contemporanea.

Una volta eseguite tutte le operazioni preliminari, è stato utilizzato un tester per verificare che i componenti fossero ben posizionati e non ci fossero malfunzionamenti. In particolare, è stato verificato che la resistenza misurata ai capi dei fili collegati direttamente agli elettrodi fosse minima, al massimo di qualche ohm.

### 8.1.3 Creazione della camera a tenuta

Per creare un collegamento circuitale tra gli elettrodi è stata utilizzato un tampone fosfato salino (PBS, Phosphate Buffer Saline), una soluzione salina che favorisce la conduzione elettrica. Per mantenere la soluzione in loco e non permettere che si diffonda e comprometta il sistema di misura è stata realizzata una piccola cameretta a tenuta utilizzando un anello di elastomero ("O-ring") impregnato di un grasso con funzione di collante. Sono state poi inseriti 200  $\mu$ l di PBS all'interno dell'anello per creare interconnessione elettrica tra gli elettrodi.

Per simulare invece la presenza di uno strato di cellule sovrastante gli elettrodi si è scelto di utilizzare un sottile strato di gelatina animale, da porre proprio in corrispondenza della superficie degli elettrodi. In dettaglio, è stata creata una soluzione liquida, sciogliendo la gelatina in acqua, e gli elettrodi sono stati ricoperti da 200  $\mu$ l di tale soluzione. Dopo aver atteso 15 minuti perché la gelatina solidificasse, è stato rimosso l'eccesso, e infine, gli elettrodi sono stati ricoperti da 200  $\mu$ l di PBS per chiudere il circuito elettrico tra gli elettrodi.

## 8.2 Esecuzione delle misure

Una volta impostato il sistema di misura e acquisizione, l'analisi si è concentrata sullo studio della risposta del sistema sotto vari aspetti. In particolare, sono state effettuate delle misure volte alla valutazione del dispositivo in termini di impedenza e, successivamente, delle misure volte a testare le performance del sistema come sistema di rilevazione e simultanea stimolazione.

Ognuna delle due misurazioni è stata eseguita, utilizzando i medesimi protocolli per la stessa tipologia di misura, sotto due condizioni diverse: la prima misura è stata eseguita utilizzando solo la soluzione di PBS, mentre la seconda misura è stata eseguita dopo aver depositato un sottile strato di gelatina al di sopra dei singoli elettrodi per simulare la presenza di uno strato di cellule sovrastante.

Dal confronto delle misurazioni effettuate sono state poi tratte le conclusioni relative alla valutazione delle caratteristiche degli elettrodi in diverse condizioni.

### 8.2.1 Valutazione di impedenza

Uno dei parametri chiave per caratterizzare un sensore è la valutazione di impedenza del dispositivo. Per fare ciò, è stato iniettato un segnale sinusoidale nel circuito creato dagli elettrodi, mantenendo l'ampiezza costante a 10 mV<sub>PP</sub> (ampiezza picco-picco) e variandone la frequenza fondamentale. Il segnale derivante dagli elettrodi è stato poi acquisito volta per volta e visualizzato tramite l'oscilloscopio digitale.

Sono state eseguite sette misure, a sette diverse frequenze; da ognuna di queste misure sono stati ricavati, tramite l'utilizzo dei cursori nell'oscilloscopio, i seguenti parametri:

- ampiezza picco-picco del segnale originale proveniente dal generatore
- ampiezza picco-picco del segnale proveniente dagli elettrodi
- sfasamento nel tempo

A partire dai valori ricavati, sono stati calcolati il guadagno  $G$  e la differenza di fase  $\Delta\phi$  a partire dalle equazioni:

$$G_{dB} = 20 \log_{10} \frac{V_2}{V_1}$$

$$\Delta\phi_{rad} = \tau f_0 2\pi$$

dove  $V_1$  e  $V_2$  sono rispettivamente l'ampiezza picco-picco misurate all'ingresso e all'uscita del sistema di misura,  $\tau$  corrisponde all'opposto della differenza di fase misurata tra il segnale in ingresso e il segnale in uscita, ed infine  $f_0$  corrisponde alla frequenza fondamentale della sinusoide, ovvero alla frequenza scelta per ogni prova di misura.

Una volta determinati guadagno e differenza di fase, sono stati realizzati i diagrammi di Bode approssimati del modulo e della fase, che permettono di valutare la risposta in frequenza del sistema di misura e le sue prestazioni al variare della frequenza dei segnali in analisi.

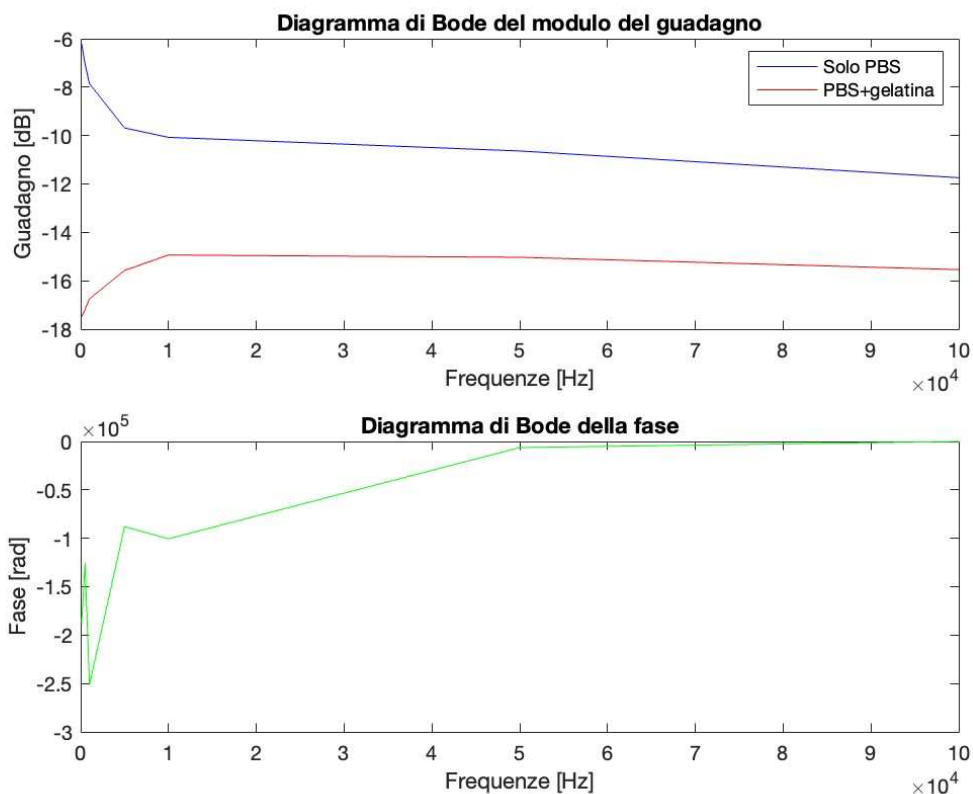


Figura 21: Grafici di Bode del guadagno e della fase, sulla base delle misure effettuate.

### 8.2.2 Test di stimolazione e rilevazione

Per evidenziare la capacità degli elettrodi di stimolare e registrare contemporaneamente, sono stati utilizzati dei segnali tipici provenienti da cellule elettricamente attive, ricavati da una ricerca sul portale Physionet. I segnali in questione rappresentano i potenziali d'azione rilevati

in un assone di un calamaro atlantico, acquisiti per uno studio sulla conduzione nervosa della membrana in risposta ad uno stimolo sotto forma di corrente iniettata. [19]

È poi stato fatto un confronto preliminare tra il segnale effettivamente iniettato e quello che invece derivava dal circuito creato dagli elettrodi, visualizzando i due segnali sull'oscilloscopio. I campioni sono poi stati salvati tramite chiavetta USB e successivamente elaborati tramite Matlab.

Dal momento che i segnali grezzi presentavano delle componenti rumorose, è stato eseguito un filtraggio passa-basso preliminare, individuando tramite i grafici delle trasformate di Fourier dei segnali le frequenze fondamentali e quelle che invece causavano solo interferenza.

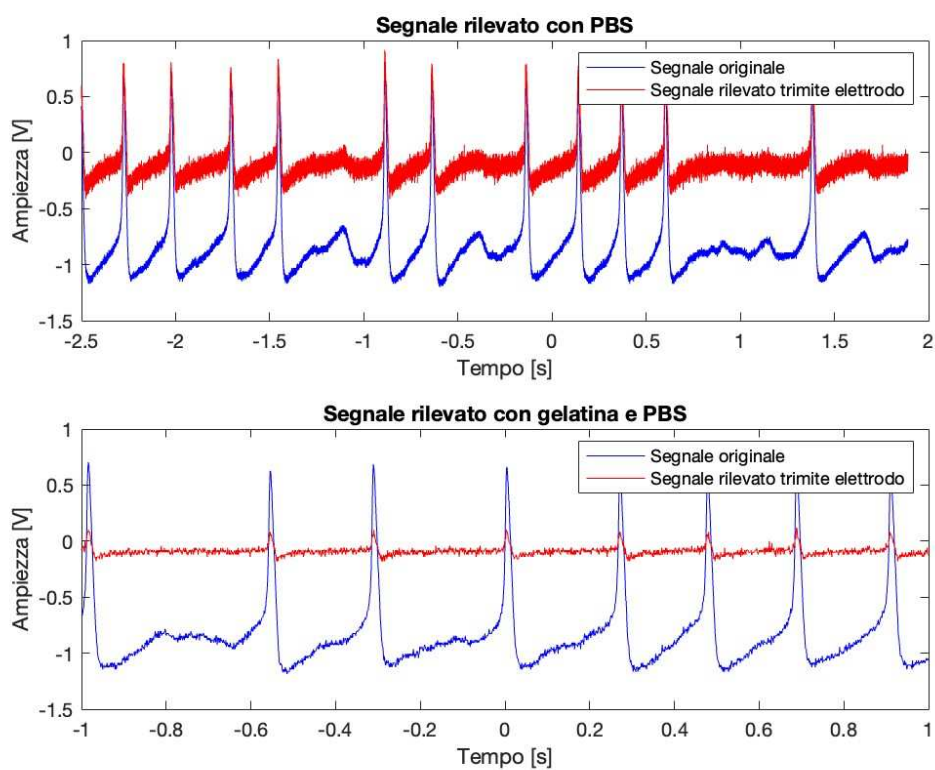


Figura 22: Grafici del segnale grezzo rilevato prima in assenza di gelatina e poi con un sottile strato di gelatina.

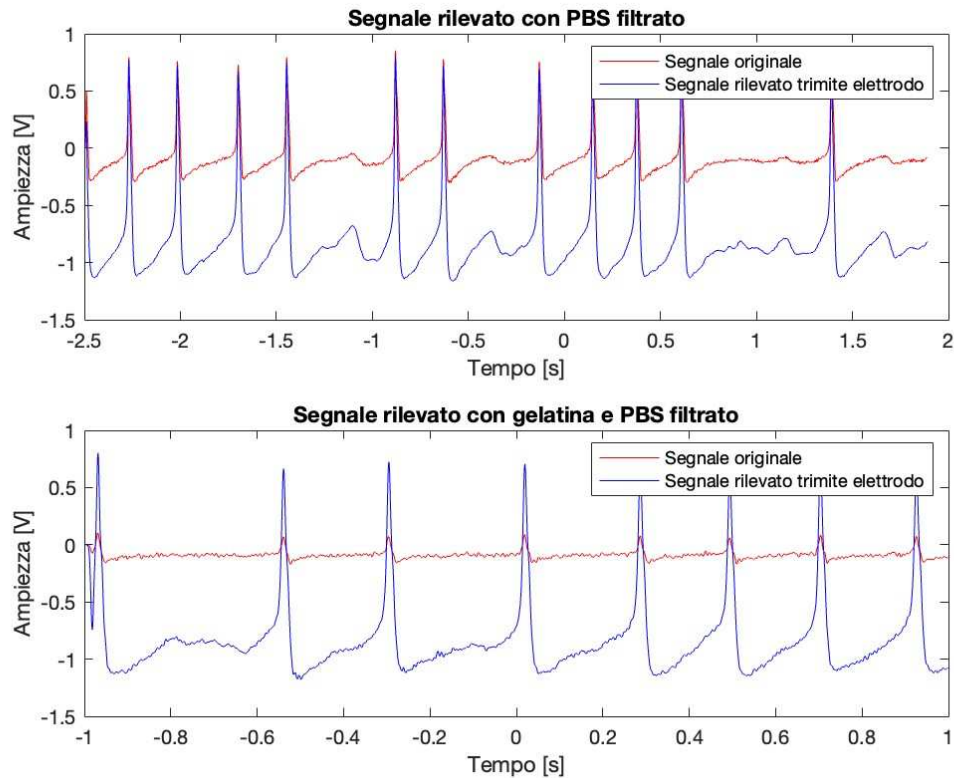


Figura 23: Grafici del segnale filtrato rilevato prima in assenza di gelatina e poi con un sottile strato di gelatina.

### 8.3 Risultati e conclusioni

A partire dai dati sperimentali acquisiti si può avere un'idea delle caratteristiche degli elettrodi utilizzati sotto diversi punti di vista e della loro capacità di rilevare la presenza cellulare e la loro attività elettrica.

Innanzitutto, dai grafici di Bode realizzati per la valutazione dell'impedenza, si può evincere che il sistema di misura costituito dagli elettrodi attenua il segnale originale ricevuto in ingresso in modo diverso in funzione delle frequenze. In generale, si può dire che il segnale viene maggiormente attenuato per frequenze alte, mentre per le basse frequenze la differenza tra due segnali, in ingresso e in uscita, risulta meno accentuata.

Inoltre, dal grafico di Bode del guadagno, si può notare come, in presenza di uno strato sottile di gelatina, il segnale risulti ancor più attenuato rispetto alla sola presenza della soluzione di PBS. Questo effetto è ragionevole, in quanto la presenza dello strato gelatinoso si può assumere, nel modello circuitale dell'interfaccia della superficie dell'elettrodo, come una capacità in serie

a una resistenza, che invece rappresenta l'impedenza del solo elettrodo. In particolare, è noto che le capacità si comportano a basse frequenze idealmente come cortocircuiti, ovvero esibendo un'impedenza molto piccola, e alle altre frequenze invece come circuito aperto; quindi, l'impedenza diminuisce con l'aumentare della frequenza, come si può notare dal grafico per le alte frequenze, e l'attenuazione quindi andrà a tendere sempre di più al valore ottenuto con la sola presenza di PBS, ovvero come se ci fosse la sola resistenza  $R_i$ .

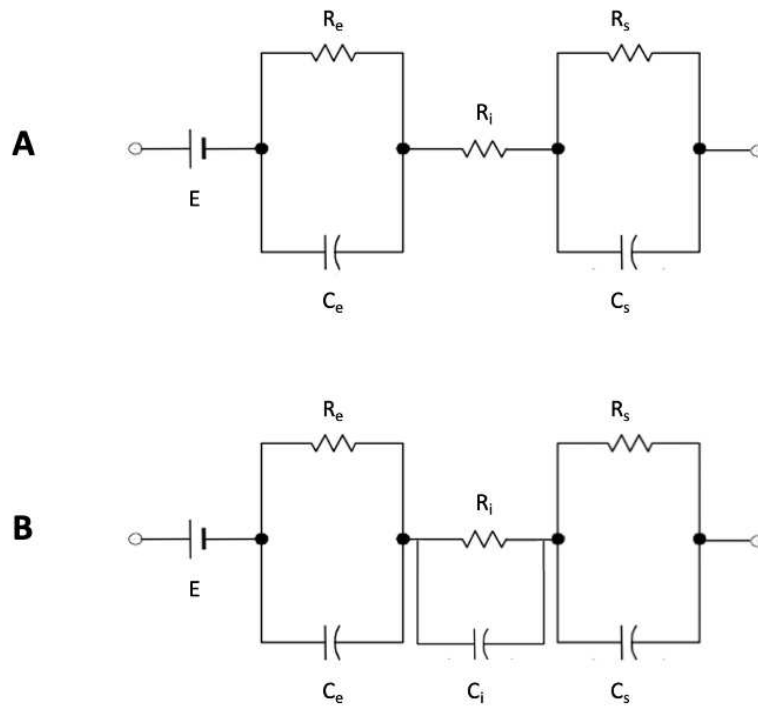


Figura 24: Rappresentazione dei modelli circuitali equivalenti dell'interfaccia elettrodo-elettrolita: in presenza di solo PBS (A) e con presenza di un sottile strato di gelatina in aggiunta al PBS (B).

Per quanto riguarda la seconda tipologia di misure, invece, è interessante effettuare un'analisi qualitativa e quantitativa della risposta del sistema di misura nel tempo.

Dal punto di vista qualitativo, una delle caratteristiche fondamentali che deve garantire il sistema è la non distorsione del segnale originale. In questo caso, è possibile andare a verificare che tutti gli eventi fondamentali che si verificano nel segnale originale, ovvero l'avvenimento di un potenziale d'azione, siano riportati anche nel corrispettivo segnale derivante dal sistema di misura. Per fare ciò sono stati presi come punti di riferimento i picchi dei due segnali e, attraverso un algoritmo di rilevazione di picchi ("peak detection"), sono stati confrontati gli eventi rilevati nel segnale in uscita con quello realmente verificatosi nel segnale d'ingresso.

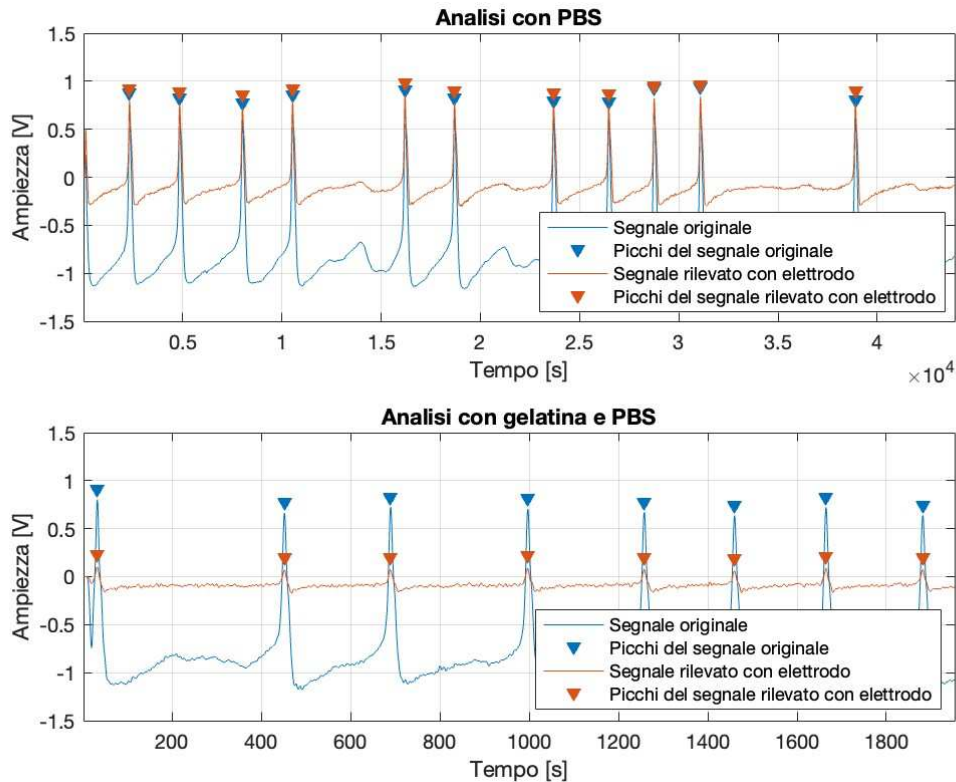


Figura 25: Individuazione dei picchi dei segnali rilevati.

Dall'analisi effettuata si può notare che, con il solo adattamento dei parametri di selezione al fronte dell'attenuazione subita dal segnale nella sua rilevazione da parte del sistema, rimane possibile individuare con chiarezza gli avvenimenti di picco del segnale acquisito. Questo è un fattore importante, in quanto evidenzia le capacità di elettrodi di questo tipo di stimolare e registrare, mantenendo invariate le caratteristiche fondamentali del segnale originale.

Per quanto riguarda l'analisi quantitativa, invece, si possono confrontare alcuni valori caratteristici dei due segnali, che forniscono indicazioni circa la variazione dell'attenuazione in diverse condizioni.

Innanzitutto, calcolando il valore minimo assunto dalle funzioni, si può valutare il contributo della componente continua sui segnali; i risultati di tali calcoli sono riportati in *Figura 26*. In particolare, si può notare che, mentre la componente continua del segnale rilevato utilizzando solo PBS risulta attenuata di circa quattro volte, con la presenza dello strato di gelatina il segnale in regime continuo viene attenuato di circa dieci volte rispetto all'originale; nel secondo caso



quindi, l'attenuazione subita è molto più rilevante, come si può osservare anche dai grafici qualitativi illustrati in precedenza.

Il contributo della componente alternata si può estrapolare invece dal calcolo della differenza tra massimo e minimo dei segnali, i cui valori sono riportati in *Figura 26*. Anche in questo caso si può notare come i valori delle differenze tra massimo e minimo calcolati per i segnali rilevati differiscano dall'originale, e nel caso della gelatina in modo piuttosto significativo. Rispetto ai valori dei minimi precedentemente analizzati, si può notare che la differenza tra massimo e minimo risulta notevolmente attenuata in presenza di uno strato di gelatina, di un fattore circa uguale rispetto all'attenuazione del minimo. Diverso è invece il caso in cui si ha la presenza del solo liquido PBS, in cui invece il divario tra il valore registrato tra segnale originale e segnale rilevato tramite elettrodi risulta meno ampio rispetto al discostamento del minimo dal valore reale.

Minimo segnale PBS originale:	-1.1630
Minimo segnale PBS:	-0.3039
Minimo segnale gelatina originale:	-1.1781
Minimo segnale gelatina:	-0.1738
Differenza max-min PBS originale:	2.0040
Differenza max-min PBS:	1.1579
Differenza max-min gelatina originale:	1.9827
Differenza max-min gelatina:	0.2756

*Figura 26: Valori ricavati dall'analisi quantitativa dei segnali rilevati.*

Alla luce delle misurazioni effettuate e dei parametri valutati, si può quindi concludere che, nonostante l'analisi quantitativa riporti dei valori che si discostano in modo talvolta anche rilevante dal segnale originale, gli elettrodi utilizzati permettono comunque di ottenere un'analisi qualitativa precisa.

Inoltre, potendo effettuare un numero più ampio di prove di acquisizione, si potrebbe ricavare il fattore di attenuazione media che il sistema provoca sul segnale originale, così da poter stimare un eventuale processamento delle funzioni rilevate che introduca anche un'amplificazione dei segnali individuati, permettendo di ottenere anche un'analisi quantitativa che rispecchi in modo migliore la realtà.

## **Conclusioni e prospettive future**

Le matrici di elettrodi micrometriche stampate si sono rivelate uno strumento essenziale per indagare l'attività elettrica di cellule come quelle muscolari e neuronali, permettendo di acquisire dati in maniera minimamente invasiva ed estremamente precisa. In questo elaborato sono stati analizzati diversi aspetti di tali dispositivi, sia dal punto di vista dei metodi di fabbricazione che dal punto di vista dei modelli elettrici equivalenti. È stata illustrata inoltre una panoramica generale sul loro utilizzo in vari ambiti applicativi, fornendo alcuni esempi più specifici. Infine, grazie ai dati sperimentalmente acquisiti, è stato testato il funzionamento teorico portando l'evidenza pratica delle prestazioni degli elettrodi utilizzati nelle matrici in analisi sotto due condizioni applicative diverse.

Grazie agli sviluppi di tecnologie di fabbricazione sempre più all'avanguardia e agli studi sempre più vasti su come implementare i materiali da utilizzare, i MEAs potranno fornire informazioni più precise e complete in ambiti diversi, ad esempio nella ricerca e sviluppo di farmaci o nella realizzazione di modelli di patologie; ciò permetterà di migliorare la comprensione della fisiologia del corpo umano e di realizzare una medicina che sia sempre più personalizzata, volta ad accogliere le specifiche esigenze del singolo paziente.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] «The potential of microelectrode arrays and microelectronics for biomedical research and diagnostics».
- [2] D. U. Silverthorn, *Fisiologia umana. Un approccio integrato.*, 8<sup>a</sup> ed. 2020.
- [3] B. Ghane-Motlagh e M. Sawan, «A review of Microelectrode Array technologies: Design and implementation challenges», in *2013 2nd International Conference on Advances in Biomedical Engineering, ICABME 2013*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., ott. 2013, pagg. 38–41. doi: 10.1109/ICABME.2013.6648841.
- [4] M. E. J. Obien, K. Deligkaris, T. Bullmann, D. J. Bakkum, e U. Frey, «Revealing neuronal function through microelectrode array recordings», *Frontiers in Neuroscience*, vol. 9, n. JAN. Frontiers Media S.A., pag. 423, 2015. doi: 10.3389/fnins.2014.00423.
- [5] 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. Elsevier Ltd, 1 dicembre 2022. doi: 10.1016/j.mtchem.2022.101153.
- [6] J. Voldman, M. L. Gray, e M. A. Schmidt, «Microfabrication in Biology and Medicine», 1999.
- [7] Y. Xu, X. Xie, Y. Duan, L. Wang, Z. Cheng, e J. Cheng, «A review of impedance measurements of whole cells», *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 77. Elsevier Ltd, pagg. 824–836, 15 marzo 2016. doi: 10.1016/j.bios.2015.10.027.
- [8] R. Kim, S. Joo, H. Jung, N. Hong, e Y. Nam, «Recent trends in microelectrode array technology for in vitro neural interface platform», *Biomedical Engineering Letters*, vol. 4, n. 2. Springer Verlag, pagg. 129–141, 2014. doi: 10.1007/s13534-014-0130-6.
- [9] F. Heer, S. Hafizovic, W. Franks, A. Blau, C. Ziegler, e A. Hierlemann, «CMOS microelectrode array for bidirectional interaction with neuronal networks», in *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, lug. 2006, pagg. 1620–1629. doi: 10.1109/JSSC.2006.873677.
- [10] F. Heer *et al.*, «CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells», *Biosens Bioelectron*, vol. 20, n. 2, pagg. 358–366, set. 2004, doi: 10.1016/j.bios.2004.02.006.

- [11] B. Ghane-Motlagh e M. Sawan, «Design and Implementation Challenges of Microelectrode Arrays: A Review», *Materials Sciences and Applications*, vol. 04, n. 08, pagg. 483–495, 2013, doi: 10.4236/msa.2013.48059.
- [12] G. Instruments, «Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy».
- [13] R. . M. Rangayyan, «Detection of Events», in *Biomedical Signal Analysis: a case-study approach*, N. : I. [Piscataway e Hoboken : Wiley, A c. di, 2<sup>a</sup> ed.2015, pagg. 260–267.
- [14] A. Pelkonen *et al.*, «Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived models of the brain with microelectrode arrays», *Cells*, vol. 11, n. 1, gen. 2022, doi: 10.3390/cells11010106.
- [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», *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 30, n. 10. Institute of Physics Publishing, 1 ottobre 2020. doi: 10.1088/1361-6439/ab8e91.
- [16] A. Stett *et al.*, «Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, n. 3. pagg. 486–495, ottobre 2003. doi: 10.1007/s00216-003-2149-x.
- [17] D. Paydarfar, D. B. Forger, e J. R. Clay, «Noisy inputs and the induction of on-off switching behavior in a neuronal pacemaker.», *J Neurophysiol*, vol. 96, n. 6, pagg. 3338–48, dic. 2006, doi: 10.1152/jn.00486.2006.
- [18] B. Bachmann *et al.*, «All-inkjet-printed gold microelectrode arrays for extracellular recording of action potentials», *Flexible and Printed Electronics*, vol. 2, n. 3, set. 2017, doi: 10.1088/2058-8585/aa7928.
- [19] F. Tan, J. P. Metters, e C. E. Banks, «Electroanalytical applications of screen printed microelectrode arrays», *Sens Actuators B Chem*, vol. 181, pagg. 454–462, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.02.034.