



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN  
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI**

**INTEGRAZIONE DI BIOSENSORI ELETTROCHIMICI  
BOTTOM-UP IN PIATTAFORME MICROFLUIDICHE**

*Relatore: Ing. Monica Giomo*

*Correlatore: Dott. Francesco Lamberti*

*Laureando: ALBERTO FELTRACCO*

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012



# Riassunto

In questa Tesi viene presentato il lavoro svolto per la realizzazione di un biosensore elettrochimico microstrutturato, integrato in una piattaforma microfluidica appositamente progettata per effettuare misurazioni in continuo della concentrazione di composti biologici all'interno di una soluzione liquida.

La progettazione della piattaforma microfluidica è stata condotta in modo da assicurare una perfetta bagnatura dell'elettrodo alloggiato all'interno e garantendo, allo stesso tempo, una adeguata tenuta idraulica del sistema. Il supporto strutturale è stato realizzato in materiale trasparente, al fine di ottenere uno strumento versatile che possa consentire l'attuazione combinata di misure elettrochimiche con misure ottiche.

La superficie dell'elettrodo è stata funzionalizzata attraverso un approccio *bottom-up*.

Il circuito elettrico è stato disegnato in modo da permettere l'intercambiabilità dei contatti, che possono assumere di volta in volta funzioni diverse a seconda delle specifiche esigenze richieste al sensore.

Oltre alle tecniche di microfabbricazione, si è fatto impiego di tecniche elettroanalitiche e di spettroscopia fotoelettronica a raggi X per l'attivazione e la caratterizzazione finale del biosensore.



# Indice

<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>CAPITOLO 1 – Materiali e metodi</b> .....	5
<b>1.1 TECNICHE DI MICROFABBRICAZIONE</b> .....	5
1.1.1 Fotolitografia.....	6
1.1.1.1 Realizzazione della fotomaschera .....	6
1.1.1.2 Pretrattamento del supporto.....	6
1.1.1.3 Deposizione del polimero .....	7
1.1.1.4 Pre-riscaldamento ed esposizione .....	8
1.1.1.5 Post-riscaldamento e sviluppo .....	9
1.1.1.6 <i>Etching</i> selettivo.....	9
1.1.1.7 Rimozione del polimero.....	9
1.1.2 Soft-litografia .....	10
1.1.3 Accoppiamento mediante UV-ozono <i>cleaner</i> .....	12
<b>1.2 TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE ELETTROCHIMICA</b> .....	12
1.2.1 Principi elettrochimici.....	12
1.2.1.1 Reazioni controllate dal trasporto di materia .....	14
1.2.1.2 Esperimento a potenziale costante .....	16
1.2.1.3 Esperimento a scansione di potenziale .....	17
1.2.1.4 Doppio strato elettrico .....	18
1.2.1.5 Punto di carica zero e punto isoelettrico .....	18
1.2.2 Voltammetria ciclica .....	19
1.2.3 Amperometria potenziostatica .....	22
1.2.4 Spettroscopia di impedenza elettrochimica.....	22
1.2.4.1 Cella di Randles semplificata .....	26
1.2.4.2 Cella di Randles .....	28
1.2.4.3 <i>Fitting</i> .....	30
1.2.5 Sistema di acquisizione dati .....	30
<b>1.3 TECNICA DI CARATTERIZZAZIONE XPS</b> .....	31
<b>1.4 SVILUPPO DI UN BIOSENSORE</b> .....	33
1.4.1 1° step.....	33
1.4.1.1 Sali di diazonio .....	33
1.4.1.2 Cisteammina .....	34
1.4.2 2° step.....	34

1.4.3	3° step .....	34
1.4.4	4° step .....	34
1.5	SISTEMA DI REGOLAZIONE DELLE PORTATE.....	34
<b>CAPITOLO 2 – Risultati</b> .....		37
2.1	CONSIDERAZIONI GENERALI .....	37
2.1.1	Valutazione dell'efficienza del <i>grafting</i> .....	37
2.1.2	Verifica con acqua ossigenata .....	37
2.2	REALIZZAZIONE DEL BIOSENSORE TRAMITE PROCESSO DISCONTINUO ...	40
2.2.1	Sali di diazonio .....	40
2.2.1.1	1° step.....	41
2.2.1.2	2° step.....	45
2.2.1.3	3° step.....	45
2.2.1.4	4° step.....	46
2.2.2	Cisteammina .....	48
2.2.2.1	1° step.....	48
2.2.2.2	2° step e <i>click chemistry</i> .....	52
2.2	REALIZZAZIONE DEL BIOSENSORE IN UN SISTEMA MICROFLUIDICO...	54
2.3.1	<i>Chip</i> microfluidico.....	54
2.3.2	Sistema di alloggiamento del <i>chip</i> .....	55
2.3.3	Realizzazione e caratterizzazione elettrochimica del biosensore .....	57
2.3.4	Verifica di funzionamento del biosensore .....	63
<b>CONCLUSIONI</b> .....		67
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....		69
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....		71

# Introduzione

L'argomento di studio di questa Tesi trae le sue origini dall'interesse sempre crescente, nel panorama scientifico internazionale, per la ricerca e lo sviluppo di nuove tipologie di biosensori per impieghi in campo clinico e diagnostico.

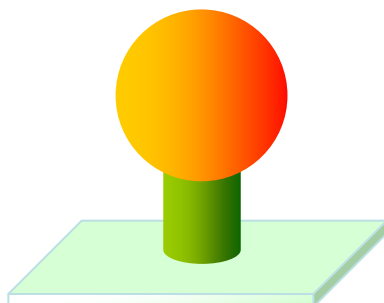
Il biosensore è un dispositivo completo e integrato per la misurazione quantitativa o semiquantitativa di uno specifico analita presente in soluzione, mediante un'interfaccia selettiva con funzione di riconoscimento biologico, abbinata a un trasduttore di segnale.

Le tipologie più comuni di biosensori sono tre: ottici, piezoelettrici ed elettrochimici.

I biosensori ottici fondano il loro principio di funzionamento su metodi di misurazione quali la spettroscopia di fluorescenza, la chemiluminescenza, la misura dell'indice di rifrazione o della riflettanza e garantiscono una elevata sensibilità e accuratezza.

I biosensori piezoelettrici impiegano materiali, come i cristalli di quarzo, che effettuano delle vibrazioni in presenza di un campo elettrico esterno alternato: la frequenza di risonanza risulta essere direttamente proporzionale a variazioni della massa del materiale causate da fenomeni di adsorbimento o disadsorbimento superficiali.

Infine, i biosensori elettrochimici si basano sulla rilevazione delle variazioni di proprietà di tipo elettrochimico e sono costituiti da un elemento biologico sensibile, quale ad esempio un recettore cellulare, un anticorpo o un enzima, immobilizzato sulla superficie di un elettrodo. La specie chimica che deve essere misurata, non elettroattiva, subisce una reazione con la parte di riconoscimento del sensore, con conseguente produzione di un elemento o un composto elettroattivo che diffonde verso la superficie elettrodica, attraverso un trasduttore, e, ossidandosi, genera un segnale elettrico rilevabile e relazionabile con la concentrazione iniziale del metabolita (Figura I.1).



**Figura I.1** *Struttura di un biosensore elettrochimico per la rilevazione di un analita in soluzione: un elemento di riconoscimento biologico è ancorato alla superficie di un elettrodo per mezzo di un trasduttore di segnale.*

I biosensori elettrochimici possono essere a loro volta suddivisi in tre differenti categorie: potenziometrici, conduttometrici e amperometrici. Nel primo caso, l'elettrodo sviluppa un potenziale variabile, a seconda dell'attività o della concentrazione dell'analita in esame. Nei biosensori conduttometrici viene misurata la corrente dovuta al movimento di ioni in soluzione in seguito all'applicazione di un potenziale alternato tra due elettrodi inerti. La via amperometrica costituisce il metodo di trasduzione più comune impiegato per lo sviluppo dei biosensori, a causa dell'elevata specificità e dell'ampio *range* di linearità, e consiste nella misurazione della corrente elettrica generatasi all'elettrodo in seguito alla presenza di una specie elettroattiva che rappresenta il prodotto di reazione dell'analita con l'elemento biologicamente attivo del biosensore.

Un esempio di notevole importanza è rappresentato dai biosensori per il monitoraggio della concentrazione di glucosio nel sangue che vengono impiegati nelle ricerche volte all'individuazione e all'ottimizzazione di terapie innovative per la cura del diabete mellito di tipo II e per la sperimentazione e lo *screening* di farmaci.

In questi biosensori la rilevazione del glucosio avviene in via indiretta mediante la misura della corrente elettrica che si genera in seguito alla scarica di acqua ossigenata sulla superficie dell'elettrodo. Si tratta di una reazione redox a due stadi. Il glucosio in soluzione viene ossidato a glucono-lattone per mezzo dell'enzima glucosio ossidasi (GOx); a sua volta, il coenzima della GOx, chiamato flavina-adenina-dinucleotide (FAD), subisce una riduzione. La forma ridotta del FAD può in seguito ritornare alla forma ossidata mediante la reazione con l'ossigeno molecolare disciolto nella soluzione, liberando acqua ossigenata.

Tra le diverse modalità che possono essere utilizzate per funzionalizzare la superficie dell'elettrodo si considera l'*electrografting*. Tale tecnica permette di modificare direttamente la superficie dell'elettrodo mediante l'adsorbimento irreversibile di specie elettroattive in seguito all'applicazione di un potenziale elettrico.

In questa Tesi si considera come *case study* la realizzazione di un biosensore elettrochimico amperometrico per il rilevamento del glucosio in soluzione. Oltre alla tecnica dell'*electrografting*, viene fatto ricorso anche ai principi della *click chemistry*, una strategia innovativa che permette l'unione stereospecifica tra molecole mediante un legame forte, in questo caso tra avidina e biotina.

I risultati raggiunti finora nel campo della biosensoristica dimostrano la possibilità di effettuare l'*electrografting* su superfici metalliche come l'oro (Lyskawa e Bélanger, 2006) o siliconiche (Flavel *et al.*, 2010), inducendo l'ossidazione di soluzioni contenenti sali di diazonio.



Non ci sono però evidenze sperimentali circa la possibilità di effettuare l'*electrografting* anche su una superficie di ITO, acronimo di *indium tin oxide*, un materiale ceramico ancora in fase di sperimentazione, costituito da un ossido di indio e stagno. Si tratta di una soluzione solida che presenta, al contempo, due diverse caratteristiche peculiari, raramente riscontrabili in uno stesso materiale: la conducibilità elettrica e la trasparenza. L'idea alla base del presente Lavoro è quella di realizzare un biosensore costruito con un elettrodo di ITO, per poter abbinare, in aggiunta alla risposta elettrochimica, anche una risposta ottica, ottenibile, ad esempio, mediante chemiluminescenza.

In secondo luogo, si intende miniaturizzare il biosensore, utilizzando le svariate tecniche consolidate e ampiamente accessibili offerte dalla microfabbricazione. La costruzione di un biosensore microfluidico presenta numerosi vantaggi, primo tra tutti la riduzione dei volumi di reagenti, per la fase di realizzazione, e dei volumi di campionamento, durante la fase finale di misura. Inoltre, di notevole importanza è la possibilità di effettuare delle misure in flusso (*on-line*), oppure di installare *downstream* il biosensore su colture cellulari. Se si considera che, in genere, i campionamenti discreti non garantiscono una misura sufficientemente accurata del parametro controllato, l'utilizzo di un sensore microfluidico consentirebbe di superare questo problema, permettendo di ottenere misurazioni più affidabili. A questo si aggiungono la riduzione dei costi di fabbricazione, la diminuzione dei tempi di risposta e del limite inferiore di rilevabilità (LOD, *limit of detection*), assieme a un incremento di sensitività e all'elevata portabilità dell'intero biosensore.

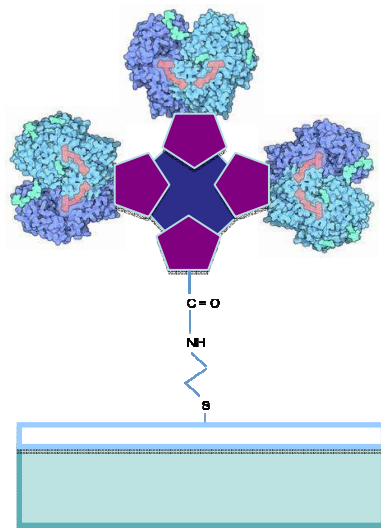
Il terzo aspetto di questo Lavoro, consiste nella realizzazione di un sistema di rilevamento elettrochimico trasparente su scala microfluidica. Si tratta di un duplice abbinamento: di misura, in quanto la rilevazione viene effettuata direttamente all'interno del *chip* microfluidico che provvede al campionamento della soluzione, e *in situ*, poiché le dimensioni assai contenute del biosensore permettono la sua installazione all'interno di colture cellulari o in linea a sistemi biologici continui.

I vantaggi che ne derivano sono numerosi: la riproducibilità della procedura di realizzazione della struttura, la ripetibilità dei trattamenti di attivazione del biosensore (volumi, portate e tempi in gioco), la possibilità di *scale-up* per la fabbricazione a livello industriale, che permette l'implementazione di sistemi *multy-array* al fine di acquisire simultaneamente una vasta quantità di informazioni, anche in previsione di analisi multiparametriche sul medesimo campione.

L'obiettivo finale della presente Tesi consiste nella realizzazione di un biosensore elettrochimico integrato in una piattaforma microfluidica, secondo un approccio

*bottom-up*, dal basso verso l'alto, che si articola in 4 diversi *step* successivi: a partire dall'*electrografting* sulla superficie iniziale di ITO, si procede legando uno *spacer* di biotina e avidina e si conclude fissando l'enzima di riconoscimento del glucosio, la GOx.

La struttura finale del biosensore così realizzato viene rappresentata in Figura I.2.



**Figura I.2** *Struttura finale del biosensore per il glucosio sviluppato in questo lavoro. Sulla superficie elettrodica di ITO supportato su vetro viene ancorato uno spacer di cisteammina, biotina e avidina, per realizzare il legame con la GOx, enzima che catalizza l'ossidazione del glucosio.*

La presente Tesi si compone di un primo Capitolo che descrive i materiali e le metodologie impiegati per l'allestimento dell'apparato sperimentale necessario alla realizzazione del biosensore microfluidico. Segue quindi un Capitolo nel quale vengono riportati e discussi i risultati ottenuti. In particolare vengono dapprima presentati i dati relativi allo studio condotto per mettere a punto la tecnica di fabbricazione del biosensore. Quindi, vengono riportati i risultati relativi al sistema microfluidico. Infine, nelle Conclusioni, vengono evidenziate le peculiarità del biosensore sviluppato e le prospettive future ipotizzate per ottimizzare la costruzione e il funzionamento dello stesso.

# Capitolo 1

## Materiali e metodi

In questo primo Capitolo verranno descritti i materiali e le tecnologie impiegati per la realizzazione e caratterizzazione del biosensore elettrochimico progettato durante questo lavoro di Tesi.

In primo luogo verrà presentata la tecnica di microfabbricazione del chip microfluidico, basata sul processo di litografia. Questa metodologia sarà impiegata in due diverse occasioni: per la realizzazione del circuito elettrico del biosensore e per l'ottenimento della piattaforma microfluidica tridimensionale contenente il biosensore.

Si illustreranno le tecniche impiegate per l'acquisizione e interpretazione dei dati relativi al biosensore. In particolare si considereranno tecniche di caratterizzazione elettrochimica e di superficie.

Si concluderà con la descrizione del protocollo che è stato impiegato per la realizzazione del biosensore nel chip microfluidico e con la presentazione dell'apparecchiatura utilizzata per effettuare le analisi microfluidiche.

### 1.1 Tecniche di microfabbricazione

La realizzazione di un biosensore di tipo elettrochimico su scala microfluidica richiede l'impiego di alcune tecniche di microfabbricazione per ottenere strutture tridimensionali che presentino sulla superficie o al loro interno delle forme e geometrie ben definite, caratterizzate da un elevato livello di precisione.

In particolare la litografia è il processo utilizzato in questo lavoro per l'ottenimento del chip microfluidico. Quale tecnologia di notevole importanza in questo settore, prevede l'impiego di diverse tecniche per la realizzazione, fabbricazione e replica di piattaforme microfluidiche, mediante lo sviluppo di stampi opportunamente sagomati secondo una struttura su scala micrometrica, precedentemente definita.

In questo lavoro si è ricorsi a due tecniche litografiche: la fotolitografia e la soft-litografia.

Mediante fotolitografia si è potuto realizzare il circuito elettrico del biosensore e il master per lo stampo in silicone. Con la tecnica della soft-litografia è stato poi realizzato lo strato silicico che costituisce la porzione superiore del chip microfluidico.

### 1.1.1 Fotolitografia

La fotolitografia è una tecnica di fabbricazione che permette il trasferimento di una configurazione geometrica prestabilita, impressa su una fotomaschera, ad un polimero fotosensibile depositato su un substrato. Il trasferimento del disegno desiderato si attua mediante la deposizione, sulla superficie di supporto, di un film di *photoresist*, una resina epossidica che tende a reticolare se irradiata da UV. La presenza di una fotomaschera tra il polimero reticolante e la sorgente luminosa permette di comprendere ed escludere in maniera selettiva le porzioni di superficie che si intende polimerizzare. Successivamente le zone non polimerizzate vengono rimosse con opportuni solventi e secondo protocolli definiti dal produttore.

Sono stati utilizzati, in questo lavoro di Tesi, due differenti supporti:

- ITO depositato su vetrino;
- wafer di silicio.

Di seguito si illustra la procedura seguita, evidenziando le differenze adottate per i due supporti.

#### 1.1.1.1 Realizzazione della fotomaschera

La fotomaschera è costituita da un foglio in policarbonato sul quale è stampato il disegno della struttura che si vuole imprimere sul substrato. Il disegno viene realizzato mediante il programma di design AutoCAD 2D 2010<sup>®</sup> (Autodesk, US) e successivamente stampato, ad alta risoluzione, sulla fotomaschera. Al fine di garantire una sufficiente stabilità strutturale, è necessario mantenere il rapporto “altezza:larghezza”, per ogni particolare geometrico della struttura finale, inferiore a 5:1.

#### 1.1.1.2 Pretrattamento del supporto

La pulizia delle superfici gioca un ruolo fondamentale nella buona riuscita del chip. Il supporto su cui si intende realizzare la struttura tridimensionale va quindi opportunamente lavato e asciugato, al fine di garantire una perfetta aderenza tra il supporto e il *photoresist*.

Nel caso dell'ITO, si attua un primo lavaggio in etanolo per asportare la parte organica, un secondo lavaggio in acqua milli-Q per la parte inorganica, un rilavaggio in etanolo per la rimozione dell'acqua ed infine si asciuga la superficie mediante azoto in pressione.

Nel caso del wafer di silicio, invece, la pulizia avviene in maniera differente. Il wafer dapprima viene posto in un forno ventilato (G-Therm, Control AG System, IT) alla temperatura di 130°C, per circa mezz'ora, in modo da eliminare l'eventuale umidità

presente sulla superficie, avendo cura di evitare la contaminazione con polvere o impurezze. Si effettua quindi un trattamento in un *plasma cleaner* (Harrick Plasma, US&CN) per circa 50 secondi. Si tratta di una tecnologia che, mediante un induttore magnetico, genera un campo elettromagnetico oscillante a radiofrequenze nella regione del gas, in basso vuoto ( $P = 10^{-2}$  mbar). Gli elettroni presenti nell'aria vengono così accelerati e, a causa dei reciproci urti elastici, provocano un innalzamento locale di temperatura, con la formazione di plasma. Il plasma ionizza la superficie del wafer di silicio, acidificando l'ossido di silicio  $\text{SiO}_2$  in gruppi silanolo liberi  $\text{Si-OH}$  per mezzo dell'umidità presente nell'aria.

Successivamente si effettua un trattamento con un promotore di adesione, il MMC Primer 80/20, composto per il 20% da esametildisilazano (HMDS) e per il restante 80% di polimetilacetato (PM Ac). Il composto viene depositato mediante *spin coating* (tecnica che verrà illustrata nel seguente §1.1.1.3).

La procedura si conclude ponendo il wafer in forno a  $115\text{ }^\circ\text{C}$  per  $1\div 3'$ .

### 1.1.1.3 Deposizione del polimero

Da questo momento tutte le operazioni vengono condotte al buio, o comunque in luce gialla, per prevenire una reticolazione indesiderata del polimero fotosensibile.

Una volta pretrattato, si posiziona il supporto sull'albero rotante dello *spin coater* (WS-650-23) e qui fissato mediante l'applicazione del vuoto. Si versa il polimero non reticolato sulla superficie del supporto, in quantità tale da garantirne un ricoprimento minimo del 90%. Lo *spin coater* viene quindi avviato e, mediante l'operazione di spinnaggio, si induce un ricoprimento omogeneo di tutto il supporto. In relazione all'accelerazione e alla velocità di rotazione dell'albero ed in funzione del tipo di *resist* impiegato, ossia della viscosità dello stesso, è possibile stabilire con precisione lo spessore del film polimerico che ricopre il supporto. In questo modo si può definire in maniera univoca l'altezza delle strutture polimeriche che si andranno a formare sulla superficie.

Nella seguente Tabella 1.1 sono riportate le variabili manipolate utilizzate per ottenere gli spessori di *resist* impiegati in questo lavoro.

**Tabella 1.1** Parametri di spin coating impiegati per ottenere film polimerici di diverso spessore e con diversi tipi di photoresist.

Tipo di <i>photoresist</i>	Spessore [ $\mu\text{m}$ ]	Velocità di spin [rpm]
SU-8 2005	5	3000
SU-8 2100	100	3000

I *photoresists* impiegati sono 2: l'SU-8 2005 e l'SU-8 2100 (MicroChem Corp., US). Entrambi sono resine epossidiche fotosensibili negative: si differenziano per il fatto che garantiscono uno spessore finale di polimero diverso, rispettivamente pari a 5 e 100  $\mu\text{m}$ .

#### 1.1.1.4 Pre-riscaldamento ed esposizione

Al fine di allentare le tensioni superficiali ed interne, si pone il supporto su una piastra riscaldante. Così facendo si favorisce l'evaporazione di eventuali residui di solvente. La temperatura della piastra e il tempo di riscaldamento vengono fissati in relazione allo spessore dello strato di *photoresist*. In Tabella 1.2 sono riportati i valori usati nel presente lavoro, secondo quanto precisato nei *datasheet* del fornitore (MicroChem<sup>®</sup>).

**Tabella 1.2** Tempi di cottura in funzione dello spessore del film polimerico.

Spessore [ $\mu\text{m}$ ]	Tempo [min]	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]
5	2	95
100	25	95

È quindi possibile alloggiare il supporto sul vassoio della lampada ultravioletta (30 UV Light Source, OAI, USA), che emette una radiazione monocromatica a 365 nm. Si posiziona quindi la fotomaschera sopra il supporto, avendo cura che l'allineamento e il verso siano corretti.

L'esposizione alla sorgente UV è lo *step* più importante e delicato dell'intero processo fotolitografico: essa è determinante per una corretta reticolazione del polimero. Poiché viene impiegato, per entrambi i tipi di supporto, un *photoresist* negativo, le zone esposte alla radiazione subiscono polimerizzazione e diventano insolubili allo sviluppo che verrà effettuato in un secondo momento.

La Tabella 1.3 riporta le energie di esposizione per i due spessori considerati.

**Tabella 1.3** Energia di esposizione in funzione dello spessore del film polimerico.

Spessore [ $\mu\text{m}$ ]	Energia di esposizione [ $\text{mJ cm}^{-2}$ ]
5	105
100	240

Si è osservato che il posizionamento di un vetrino sulla fotomaschera, oltre ad assicurare un miglior contatto tra la stessa e il supporto, comporta un parziale

assorbimento della radiazione UV: ne deriva una sottoesposizione del 20% rispetto al tempo consigliato e questo, in base alle evidenze sperimentali, comporta una maggiore resistenza meccanica del *photoresist*.

#### 1.1.1.5 Post-riscaldamento e sviluppo

Per favorire il *cross-linking* selettivo delle parti di polimero che sono state esposte alla radiazione, si effettua un riscaldamento post-esposizione (*post-exposure bake*, PEB). Similmente a quanto detto nel §1.1.1.4, il tempo e la temperatura dipendono dalle caratteristiche dello strato polimerico, come mostrato nella Tabella 1.4.

**Tabella 1.4** Tempi di cottura post-esposizione e tempi di sviluppo in funzione dello spessore del film polimerico.

Spessore [ $\mu\text{m}$ ]	Tempo di cottura [min]	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Tempo di sviluppo [min]
5	3	95	1
100	10	95	10

Lo sviluppo del *resist* si effettua mediante immersione completa del supporto in metossimetacrilato (1-metossi-2-propanolo-acetato, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, US), che solubilizza la parte di polimero esclusa dall'esposizione alla luce UV. Come riportato sempre in Tabella 1.4, lo stato di sviluppo viene arrestato dopo un tempo prestabilito, mediante immersione in isopropanolo (Carlo Erba<sup>®</sup>). A questo punto il supporto viene esposto all'aria perché possa asciugarsi.

#### 1.1.1.6 Etching selettivo

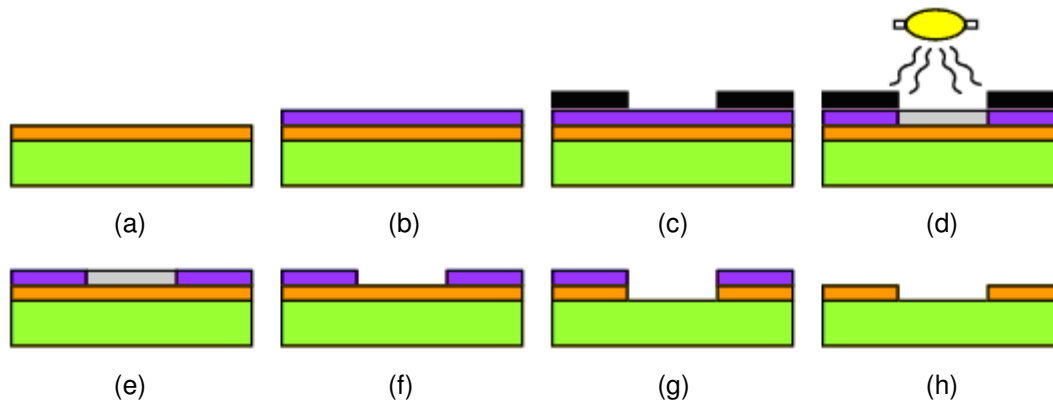
Qualora si voglia disegnare la superficie del supporto, come nel caso dell'ITO, si può utilizzare il *resist* come maschera per proteggere la superficie sottostante.

Una volta ottenuto il supporto di ITO (formula  $\text{In}_2\text{O}_3 \cdot (\text{SnO}_2)_x$ ,  $70 \div 100 \Omega \text{sq}^{-1}$ ,  $150 \div 300 \text{ \AA}$  su vetro, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, IT) con sopra il *pattern* polimerico, è necessario rimuovere le porzioni di ITO scoperte, in modo da realizzare il circuito finale desiderato. Si effettua quindi una rimozione chimica sistematica e selettiva (*etching*) dell'ITO non protetto dal polimero, mediante immersione per 30' del supporto in una soluzione 1 M di HCl 37% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, IT), mantenuta ad una temperatura di circa 100  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.1.1.7 Rimozione del polimero

Una volta lavato con acqua milli-Q e lasciato asciugare, il vetrino così trattato viene immerso per 30' in un *remover* (Remover PG, MicroChem<sup>®</sup>, GE) mantenuto a 100  $^{\circ}\text{C}$ : si tratta di una sostanza in grado di rimuovere il polimero reticolato presente sulla superficie del vetrino. Dopo questo *step* finale e un successivo lavaggio con acqua, ne risulta un supporto vetroso che presenta, depositato su una delle due superfici, il circuito

elettrico in ITO desiderato per realizzare il biosensore. La Figura 1.1 rappresenta le varie fasi della fotolitografia.



**Figura 1.1** Principali fasi della fotolitografia: a) supporto iniziale; b) spin coating del materiale fotoresistente sul supporto; c) applicazione della fotomaschera; d) esposizione a radiazioni UV attraverso la fotomaschera; e) rimozione della fotomaschera; f) sviluppo del photoresist; g) etching della parte non protetta di substrato; h) rimozione del photoresist.

Il circuito elettrico depositato su vetro costituisce la parte inferiore del *chip* microfluidico.

### 1.1.2 Soft-litografia

Una volta ottenuto il *master* di *photoresist* sul wafer di silicio (§§1.1.1.1-5), si può realizzare lo strato di silicone che, accoppiato al vetrino con il circuito in ITO integrato, costituirà il *chip* microfluidico completo.

Le tecniche impiegate sono la *soft lithography* e il *replica molding*.

Il silicone utilizzato (Sylgard 184<sup>®</sup>, Dow Corning, US) è il *polidimetilsilossano* (PDMS), una resina termoindurente che si ottiene miscelando, in rapporto ponderale 10:1, una *matrice* prepolimerica con un *agente reticolante* che permette l'indurimento della resina. Mediante un'adeguata agitazione meccanica, si ottiene una miscela omogenea viscosa che viene posta in un cristallizzatore. Dopo l'applicazione del vuoto (1 mmHg, 5') per rimuovere l'eventuale aria presente nel solvente, si riporta il silicone a pressione atmosferica e lo si versa sulla superficie del *master* di silicio e *photoresist*.

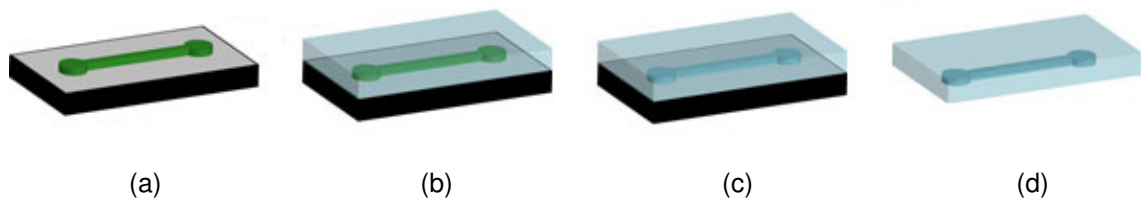
È necessario, a questo punto, effettuare un ulteriore ciclo di degasaggio di 40' per eliminare eventuali bolle d'aria che nel frattempo si potrebbero essere formate, oltre che per favorire un'infiltrazione capillare e omogenea del silicone all'interno della microstruttura.

La polimerizzazione del silicone, una volta addizionato il componente indurente, avviene già a temperatura ambiente senza la formazione di sottoprodotti e si completa in



un arco di tempo di 24 ore (tempo di passivazione di 4 ore, entro il quale si deve procedere alla polimerizzazione), tuttavia è possibile velocizzare il processo ponendo lo stampo in forno ventilato (Heraeus Instruments, tipo UT 6120, temperatura massima di 300 °C) a 75°C per 2 ore.

Le fasi della soft-litografia sono illustrate in Figura 1.2.



**Figura 1.2** Principali fasi della soft-litografia: a) master di photoresist su silicio; b) versamento del PDMS e degasaggio; c) polimerizzazione in forno ventilato; d) estrazione del silicone dallo stampo.

Come riportato in Tabella 1.5, il silicone polimerizzato che si ottiene gode di ottime proprietà dielettriche, è flessibile se mantenuto in un intervallo di temperature comprese tra -50°C e +200°C, è permeabile a piccole molecole gassose come l'ossigeno ed impermeabile all'acqua, inoltre è caratterizzato da una buona trasparenza, anche per spessori di 1 cm.

**Tabella 1.5** Proprietà del PDMS. Sono segnate con (\*) le proprietà che si riferiscono al PDMS dopo reticolazione.

Parametro	Valore	Unità di misura
Viscosità della base a 23°C	5500	mPa s
Viscosità della miscela a 23°C	4000	mPa s
Resistenza di passivazione a 23°C	2	ore
Resistenza alla trazione (*)	7.1	MPa
Allungamento a rottura (*)	140	%
Resistenza alla lacerazione (*)	2.6	kN m <sup>-1</sup>
Gravità specifica a 23°C (*)	1.05	-
Coefficiente di conduttività termica (*)	0.17	W m <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
Rigidità dielettrica (*)	21	kV mm <sup>-1</sup>
Permittività (*)	2.75	-
Fattore di dissipazione (*)	0.001	-
Permeabilità a O <sub>2</sub> (*)	2.84·10 <sup>-13</sup>	mol mm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup>

Le fasi finali di preparazione dello strato di PDMS prevedono l'estrazione dallo stampo, la sagomatura e la foratura, in modo da ottenere la forma desiderata, come verrà mostrato nel prossimo Capitolo.

### 1.1.3 Accoppiamento mediante UV-ozono cleaner

L'adesione tra lo strato di PDMS così ottenuto e il supporto di ITO viene effettuata mediante un trattamento a "plasma freddo" in UV-ozono *cleaner*, un'apparecchiatura analoga al *plasma cleaner* utilizzato per la preparazione del wafer in silicio. Si tratta di una tecnica che sfrutta il principio del *Dielectric Barrier Discharge (DBD)*, in base al quale si fa avvenire una serie di scariche elettriche tra due elettrodi separati da un materiale dielettrico, in questo caso aria atmosferica. L'ossigeno molecolare  $O_2$ , in seguito alla ionizzazione dell'aria, viene scisso in radicali ossigeno  $O\bullet$  che si ricombinano per dare ozono  $O_3$ : il trattamento con ozono facilita la formazione di gruppi -OH sulla superficie.

Anche in questo caso la pulizia delle superfici da trattare è importante. L'adesione tra i due materiali è irreversibile a causa della formazione di legami covalenti e avviene in seguito a semplice contatto delle due superfici. Il *chip* così ottenuto viene posto su piastra riscaldante a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  per 30', sotto un peso che assicuri una adesione efficace e omogenea.

## 1.2 Tecniche di caratterizzazione elettrochimica

In questa sezione vengono illustrate le tecniche elettrochimiche utilizzate per la caratterizzazione del biosensore oggetto di studio. Dopo una premessa nella quale vengono esposti i principi di funzionamento di una cella elettrochimica, si descrivono le misure di corrente a potenziale costante, la tecnica della voltammetria ciclica e infine la spettroscopia di impedenza elettrochimica.

### 1.2.1 Principi elettrochimici

Gli obiettivi delle misure analitiche elettrochimiche consistono nella determinazione della risposta elettrica del campione in esame e permettono di individuare la correlazione con la concentrazione dell'analita presente nella soluzione. Questo si attua monitorando il trasferimento di elettroni che avviene in seguito al processo di ossidazione-riduzione che interessa l'analita:



dove  $O$  è la forma ossidata e  $R$  quella ridotta della coppia redox. La (1.1) avviene in una regione di potenziale che rende il trasferimento elettronico termodinamicamente o cineticamente favorevole. Quando ciò si verifica, le concentrazioni della forma ossidata  $c_O$  e della forma ridotta  $c_R$  della specie elettroattiva possono essere rispettivamente

determinate mediante la legge di Nernst, che fornisce il potenziale elettrochimico  $E$  così espresso:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_o(0,t)}{c_R(0,t)}, \quad (1.2)$$

nella quale  $E^0$  è il potenziale standard della coppia redox,  $R$  la costante universale dei gas ( $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  (K) la temperatura,  $n$  il numero di elettroni che hanno preso parte alla reazione redox e infine  $F$  la costante di Faraday ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ ).

Per valori di potenziale inferiori a  $E^0$  è cineticamente favorita la reazione di riduzione della specie ossidata. La corrente che ne deriva, pari alla corrente associata alla semireazione di riduzione, è una misura diretta della velocità di reazione e varia a seconda dello stato di ossidazione delle specie elettroattive. Viene chiamata *corrente faradica*, poiché segue la legge di Faraday, secondo la quale la carica che passa in soluzione è proporzionale alla massa che si deposita sull'elettrodo. Il grafico che riporta il potenziale applicato, in ascissa, contro la corrente rilevata, in ordinata, si chiama voltammogramma ed è direttamente determinato, in forma e intensità, dai processi che intervengono nella reazione all'elettrodo. La corrente risultante è data dalla somma della corrente faradica e della *corrente capacitiva*; quest'ultima è una caratteristica intrinseca del sistema e indipendente dalla concentrazione di analita presente in soluzione. Esistono anche dei processi non faradici, che avvengono quando una data interfaccia elettrodo-soluzione esibisce una certa inerzia al trasferimento di carica, per un ben definito intervallo di potenziale: questo avviene quando le reazioni di ossidoriduzione sono termodinamicamente o cineticamente sfavorite. Si tratta di fenomeni di adsorbimento e disadsorbimento che interessano direttamente la superficie elettrodica, modificandola, e avvengono in seguito a variazioni del potenziale in cella o della concentrazione di analita in soluzione.

Il processo di scarica della specie ossidata avviene generalmente in 3 *step* principali: il trasporto di massa dell'analita dal bulk della soluzione all'interfaccia tra elettrodo e soluzione, il trasferimento elettronico in corrispondenza della superficie dell'elettrodo e infine il trasporto della specie ridotta prodotta nuovamente verso il bulk. Si tratta di reazioni chimiche reversibili, poiché seguono le leggi termodinamiche.

La velocità globale della reazione, proporzionale alla corrente misurata nel sistema, è controllata dal più lento degli step che avvengono in soluzione o sulla superficie dell'elettrodo: il meccanismo controllante può essere quindi o il trasporto di massa o il trasferimento di carica, a seconda della natura dell'analita e di fattori sperimentali quali il materiale dell'elettrodo, la natura della soluzione elettrolitica, il potenziale in cella, le modalità con cui avviene il trasporto di massa, la scala dei tempi caratteristici del

sistema. Si deduce che lo step determinante dipende dalla finestra di potenziale impiegata nel corso dell'analisi.

Quando, ad esempio, il trasferimento della specie elettroattiva dal bulk all'interfaccia, o viceversa, risulta lo stadio più lento, si parla di corrente limitata dal trasporto di massa. Di seguito vengono descritti i 3 fenomeni che interessano il trasporto di materia all'interno di un sistema elettrochimico.

### 1.2.1.1 Reazioni controllate dal trasporto di materia

In un sistema elettrochimico il trasferimento di materia può avvenire attraverso i seguenti meccanismi fondamentali:

- *convezione*: è il trasporto di specie all'elettrodo, dovuto al moto macroscopico del fluido, indotto da un gradiente di densità, nel caso della convezione naturale, oppure di tipo forzato, generato dall'energia meccanica esterna associata all'agitazione o flusso della soluzione o anche alla vibrazione o rotazione dell'elettrodo;
- *diffusione*: è il movimento spontaneo della specie da una regione più concentrata ad una più diluita, sotto l'influenza di un gradiente di potenziale chimico, che deriva da un gradiente di concentrazione in soluzione;
- *migrazione*: è il moto di particelle cariche conseguente ad un gradiente di potenziale elettrico, indotto dal campo elettrico generato dall'elettrodo.

Il flusso di specie elettroattiva  $J$  ( $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), definito come il numero di molecole che attraversano un piano immaginario di area unitaria in un intervallo unitario di tempo, è descritto dall'equazione di Nernst-Planck, di seguito espressa in termini differenziali, considerando per semplicità il flusso come monodirezionale lungo la coordinata  $x$ :

$$J(x,t) = -\mathcal{D} \frac{\partial c(x,t)}{\partial x} - \frac{zF\mathcal{D}c}{RT} \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + c(x,t) \cdot v(x,t) , \quad (1.3)$$

dove  $\mathcal{D}$  ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) è il coefficiente di diffusione della specie,  $[\partial c(x,t)]/\partial x$  il gradiente di concentrazione,  $c$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) e  $z$  rispettivamente la concentrazione e la carica della specie elettroattiva,  $[\partial \phi(x,t)]/\partial x$  il gradiente di potenziale,  $v(x,t)$  ( $\text{cm s}^{-1}$ ) la velocità idrodinamica del fluido lungo la coordinata spaziale  $x$  e riferita alla coordinata temporale  $t$ .

La corrente prodotta  $i$  in una reazione redox è direttamente proporzionale al flusso e all'area  $A$  dell'elettrodo:

$$i = -nFAJ \quad . \quad (1.4)$$

Nei casi in cui il trasporto di materia avviene mediante tutti e tre i meccanismi sopra riportati, risulta complesso ricavare una correlazione univoca tra la concentrazione di analita in soluzione e la corrente misurata.

Se si considera solo il regime diffusivo, si può ricorrere alla prima legge di Fick, secondo la quale la velocità di diffusione, rappresentata dal flusso diffusivo, è proporzionale al gradiente della concentrazione, per cui la (1.3) si riduce a:

$$J(x,t) = -\mathcal{D} \frac{\partial c(x,t)}{\partial x} . \quad (1.5)$$

Combinando opportunamente la (1.4) con la (1.5) si ottiene:

$$i = nFA\mathcal{D} \frac{\partial c(x,t)}{\partial x} , \quad (1.6)$$

che rappresenta quindi la risposta della corrente qualora si considerino fenomeni di trasporto di materia in regime esclusivamente diffusivo. Tali condizioni possono essere realizzate effettuando le misurazioni in presenza di un eccesso di *elettrolita di supporto*, rispetto alla concentrazione degli ioni elettroattivi: si tratta di una specie i cui ioni non si scaricano all'elettrodo nelle condizioni di misura, aumentando la conduttività della soluzione. Si migliora così la schermatura del campo elettrico, rendendo trascurabile il contributo della migrazione al trasporto della specie considerata verso l'elettrodo.

Per quanto riguarda la convezione, si può operare con sistemi quiescenti, nei quali, in assenza di mescolamento, non si hanno moti convettivi.

Si può inoltre osservare che il flusso diffusivo è dipendente dal tempo, come dimostra la seconda legge di Fick:

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = \mathcal{D} \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} , \quad (1.7)$$

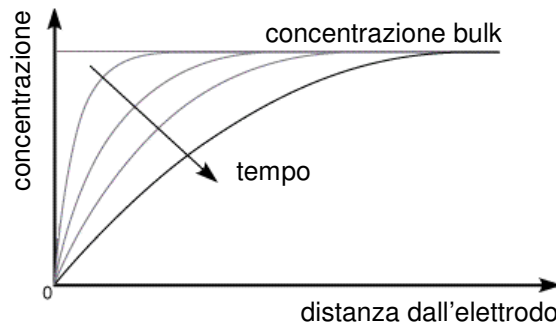
che è valida nel caso di elettrodi planari, per i quali la direzione di diffusione è ortogonale alla superficie dell'elettrodo e le linee di flusso sono parallele tra loro.

Le leggi di Fick descrivono il flusso diffusivo e la concentrazione delle specie elettroattive in funzione della posizione e del tempo: si tratta di equazioni differenziali risolubili mediante l'applicazione della trasformata di Laplace e la definizione di opportune condizioni iniziali e al contorno specifiche per il sistema in esame.

### 1.2.1.2 Esperimento a potenziale costante

Nel caso in cui si mantiene costante il potenziale applicato all'elettrodo (*potential-step experiment*), la specie ossidata  $O$ , che inizialmente è l'unica specie presente in soluzione, viene ridotta nella sua forma  $R$ .

La relazione tra la corrente e il tempo può essere compresa analizzando i profili di concentrazione del sistema nel tempo. In seguito all'applicazione del nuovo potenziale, la specie ossidata viene ridotta sulla superficie dell'elettrodo: si genera pertanto un gradiente di concentrazione tra l'interfaccia elettrodo-soluzione e il *bulk* della soluzione. La regione prossima alla superficie dell'elettrodo nella quale la concentrazione della specie  $O$  diminuisce prende il nome di *strato di diffusione*, definito da uno spessore  $\delta$ . Il gradiente di concentrazione è inizialmente ripido a causa del valore piccolo di  $\delta$ , che però aumenta con il passare del tempo riducendo il gradiente.



**Figura 1.3** Profili di concentrazione a tempi diversi per un esperimento a incremento di potenziale

L'espansione del *layer* diffusivo viene descritta derivando rispetto al tempo la legge di Fick (1.7), dopo aver posto le seguenti condizioni iniziali e al contorno:

$$\begin{cases} c_O(x, t = 0) = c_{O,b} & \forall x \\ c_O(x, t > 0) = 0 & x = 0 \\ c_O(x, t > 0) = c_{O,b} & x \rightarrow \infty \end{cases}, \quad (1.8)$$

dove  $c_O$  è la concentrazione di elettrolita nella forma ossidata,  $c_{O,b}$  è la concentrazione nel *bulk* e  $x$  rappresenta la coordinata spaziale ortogonale alla superficie dell'elettrodo.

Il gradiente di concentrazione alla superficie dell'elettrodo che si ricava dalla (1.7), formulata per la specie ossidata, e dalla (1.8) è:

$$\left. \frac{\partial c}{\partial x} \right|_{x=0} = \frac{c_{O,b}}{\sqrt{\pi D_O t}}. \quad (1.9)$$

Per un elettrodo planare, quindi, sostituendo la (1.9) nella (1.6), si ottiene la seguente relazione, detta equazione di Cottrell:

$$i = nFA\mathcal{D}_O \frac{c_{O,b}}{\sqrt{\pi\mathcal{D}_O t}} , \quad (1.10)$$

che mostra una dipendenza inversa della corrente con la radice del tempo.

Si può notare che il termine  $(\pi\mathcal{D}_O t)^{1/2}$  corrisponde allo spessore  $\delta$  dello strato di diffusione.

### 1.2.1.3 Esperimento a scansione di potenziale

Se si considera un esperimento nel quale si effettua una scansione lineare del potenziale (*potential-sweep experiment*) in una soluzione quiescente, la specie ossidata  $O$  presente inizialmente viene completamente ridotta a  $R$ .

La variazione della concentrazione di  $O$  è data dal rapporto  $(c_{O,b}-c_{O,s})/\delta$ , dove  $c_{O,b}$  e  $c_{O,s}$  sono rispettivamente le concentrazioni nel *bulk* e alla superficie dell'elettrodo, entrambe in funzione del tempo. Il cambio di pendenza e la corrente risultante dipendono quindi sia dalla concentrazione che dallo spessore dello strato limite di diffusione.

Quando il potenziale iniziale è inferiore al potenziale standard  $E^0$  della coppia redox, la concentrazione superficiale di  $O$  decresce in accordo con la legge di Nernst, definita dalla (1.2).

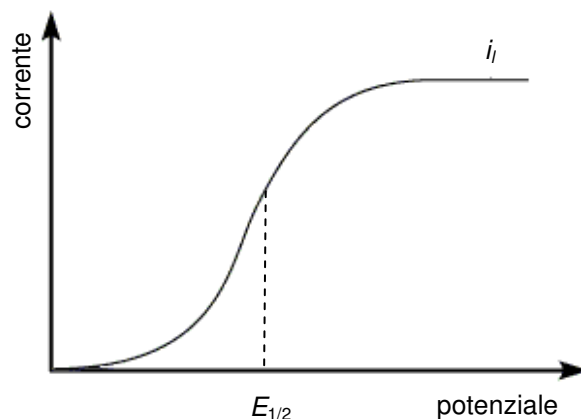
A potenziale applicato pari a  $E^0$  la concentrazione della specie  $O$  alla superficie elettrodica coincide con la concentrazione della specie  $R$ . All'aumentare del potenziale, la concentrazione di  $R$  diventa maggiore rispetto a  $O$  e lo spessore dello strato diffusivo aumenta, in quanto cresce la quantità di  $O$  che si scarica sull'elettrodo, convertendosi in  $R$ .

Il valore limite della corrente  $i_l$  si ha quando la concentrazione di specie  $O$  alla superficie si annulla. In tali condizioni la variazione di concentrazione nello strato  $\delta$  si riduce a  $c_{O,b}$  e il valore di  $i_l$  è fornito dall'equazione di Cottrell generica nella forma:

$$i_l = nFA \mathcal{D}_O \frac{c_{O,b}}{\delta} , \quad (1.11)$$

Superato  $E^0$ , la velocità di variazione della corrente diminuisce, poiché diminuisce la concentrazione di  $O$  in prossimità dell'elettrodo.

Complessivamente, il grafico che riporta la corrente misurata al variare del potenziale è quello di un caratteristico voltammogramma e assume una forma sigmoideale, come riportato in Figura 1.4.



**Figura 1.4** Voltammogramma che riporta la corrente al variare del potenziale applicato.

Si può osservare che il potenziale  $E_{1/2}$  a metà altezza della curva, detto potenziale di semionda, è un valore caratteristico di ogni sostanza ed è approssimabile a  $E^0$ .

#### 1.2.1.4 Doppio strato elettrico

In corrispondenza dell'interfaccia elettrodo-soluzione si forma una struttura ordinata chiamata doppio strato elettrico (*electric double-layer*), all'interno del quale si instaura un trasferimento di carica elettrica accompagnato dallo svolgersi di semireazioni redox. Nel modello di Helmholtz, le due superfici parallele corrispondono alla superficie dell'elettrodo e allo strato di ioni che si adsorbe su di esso. Le due superfici considerate sono caricate una positivamente e una negativamente. Questo fenomeno è paragonabile ai piatti di un condensatore con capacità  $C$  che dipende dalla carica  $q$  e dalla differenza di potenziale  $E$  applicata all'elettrodo:

$$C = \frac{q}{E} \quad . \quad (1.12)$$

Alla presenza del doppio strato elettrico resta associata la componente capacitiva che va a sommarsi a quella faradica per dare la corrente totale che interessa l'elettrodo.

#### 1.2.1.5 Punto di carica zero e punto isoelettrico

Il punto di carica zero (PZC, *point of zero charge*) descrive la condizione che si ha quando la densità di carica netta su una superficie è nulla. Viene generalmente



determinato in relazione al pH di un elettrolita e dipende dallo specifico substrato presente in soluzione. Il valore del pH al quale ciò avviene prende il nome di punto isoelettrico (pI). Le due grandezze sono quindi coincidenti quando sulla superficie non sono presenti altri ioni se non quelli di dissociazione dell'acqua,  $H^+$  e  $OH^-$ .

In elettrochimica si considera come punto di carica zero il potenziale applicato all'elettrodo tale per cui si verifica l'assenza di cariche sulla superficie elettrodica a contatto con l'elettrolita.

Il potenziale di carica zero  $E_{pzc}$  può essere definito come:

$$E_{pzc} = E - E_{\sigma=0} , \quad (1.13)$$

dove  $E$  è il potenziale dell'elettrodo rispetto a un elettrodo di riferimento e  $E_{\sigma=0}$  è il potenziale dello stesso elettrodo, rispetto allo stesso riferimento, quando la carica superficiale è nulla, in assenza di adsorbimento superficiale oltre a quello dovuto al solvente. Applicando un potenziale  $E$  a un elettrodo in soluzione è quindi possibile assicurare una protezione dall'adsorbimento di eventuali specie presenti in soluzione.

Verranno ora descritti i metodi di misura elettrochimici impiegati in questo lavoro.

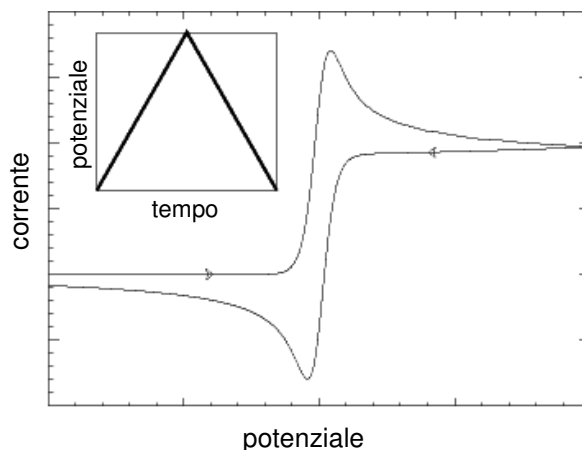
### 1.2.2 Voltammetria ciclica

Una delle tecniche più utilizzate per acquisire informazioni qualitative sulle reazioni elettrochimiche è la voltammetria ciclica, o ciclovoltammetria (CV). Si tratta di una tecnica che fornisce in modo rapido informazioni sulla termodinamica dei processi redox che avvengono all'interfaccia e sulla cinetica delle reazioni eterogenee di trasferimento di elettroni o dei processi di adsorbimento. La voltammetria ciclica fornisce velocemente la posizione dei potenziali redox delle specie elettroattive e permette di valutare l'effetto del mezzo sui processi che avvengono in soluzione.

La voltammetria ciclica è una metodica elettrochimica potenziodinamica che consiste nell'effettuare una scansione lineare di potenziale di un elettrodo lavorante stazionario in soluzione non agitata, mediante l'applicazione di un potenziale a forma d'onda triangolare nel tempo, secondo una definita velocità di scansione. Si tratta di un caso particolare di voltammetria a scansione lineare (LSV), con la differenza che il potenziale, raggiunto un dato valore, viene invertito, eventualmente anche più volte nello stesso esperimento.

Durante la scansione del potenziale, applicato tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento, viene misurata la corrente tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo (detto anche elettrodo ausiliario, vedi §1.2.5) conseguente allo scambio di elettroni che si genera: il grafico che riporta la corrente rilevata contro il potenziale applicato è detto

voltammogramma ciclico, o ciclovoltammogramma. Solitamente alla soluzione si addiziona un elettrolita di supporto, per assicurare una sufficiente conduttività della soluzione e garantire che il trasporto della specie studiata avvenga per diffusione. L'analita impiegato deve essere una specie elettroattiva all'interno dell'intervallo di potenziale indagato sperimentalmente e deve manifestare un comportamento idealmente reversibile.



**Figura 1.5** Voltammogramma che riporta la corrente al variare del potenziale applicato.

Nei processi che coinvolgono coppie redox reversibili, è possibile osservare la tipica risposta della corrente, riportata in Figura 1.5: assumendo che inizialmente sia presente in soluzione solo la specie  $O$ , si fa partire la scansione da un potenziale con verso negativo per la prima metà del ciclo, partendo da un valore al quale non avvengono reazioni di riduzione. Man mano che il potenziale applicato si avvicina a  $E^0$ , caratteristico della coppia redox in esame, si può osservare l'instaurarsi di una corrente catodica crescente, che raggiunge un valore di picco, al quale corrisponde un valore massimo del gradiente di concentrazione. Dopo aver attraversato la regione di potenziale nella quale avviene la riduzione, la direzione della scansione di potenziale si inverte, instaurando una corrente anodica crescente in valore assoluto, la quale anch'essa raggiunge un valore di picco associato all'ossidazione della specie  $R$ . I picchi caratteristici del voltammogramma sono causati dalla formazione dello strato di diffusione vicino alla superficie dell'elettrodo. La variazione continua della concentrazione superficiale induce un'espansione dello spessore dello strato di diffusione e la corrente di picco che ne risulta riflette la variazione del gradiente di concentrazione, in quanto corrisponde al raggiungimento di un controllo di tipo

diffusivo. Oltrepassato il picco, si osserva una zona che esibisce un comportamento indipendente dal potenziale applicato, che segue un andamento proporzionale a  $t^{-1/2}$ . Se il processo è completamente reversibile, la corrente inversa ha la stessa forma della curva di riduzione.

Le posizioni dei potenziali al picco di ossidazione  $E_{p,a}$ , in corrente anodica, e al picco di riduzione  $E_{p,c}$ , in corrente catodica, sono strettamente connesse al potenziale formale del processo redox  $E^0$ :

$$E^0 = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} . \quad (1.14)$$

La separazione tra potenziali di picco per una coppia reversibile e in condizioni standard (25 °C) è data da:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0.059}{n} \text{ V} , \quad (1.15)$$

che è in accordo con l'equazione di Nernst (1.2) precedentemente riportata.

Il potenziale di picco costituisce quindi il parametro voltammetrico che consente di caratterizzare qualitativamente una coppia redox e di riconoscerne la presenza in soluzione.

L'intensità della corrente di picco  $i_p$  ( $\mu\text{A}$ ) per una coppia reversibile, sempre riferita a condizioni standard, è invece data dall'equazione di Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} A \mathcal{D}^{1/2} \nu^{1/2} c , \quad (1.16)$$

dove  $n$  è il numero di elettroni scambiati nella reazione redox,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) è l'area attiva dell'elettrodo,  $\mathcal{D}$  ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) è il coefficiente di diffusione bulk dell'analita in soluzione,  $\nu$  ( $\text{V s}^{-1}$ ) è la velocità di scansione del potenziale applicato e infine  $c$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) è la concentrazione della soluzione. La (1.16) mostra una dipendenza lineare dell'intensità della corrente di picco in funzione della concentrazione: la misura dell'altezza del picco è quindi un parametro voltammetrico quantitativo del sistema in esame. Nei casi in cui la diffusione non limita il trasferimento di elettroni, come avviene quando la sostanza elettroattiva considerata è adsorbita sulla superficie dell'elettrodo, la corrente di picco, nella (1.16), risulta essere linearmente proporzionale ( $i_p \propto \nu^1$ ) alla velocità di scansione, non più proporzionale alla sua radice ( $i_p \propto \nu^{1/2}$ ).

Per processi semi-reversibili o irreversibili, voltammetrie cicliche effettuate all'aumentare della velocità di scansione mostrano uno stiramento delle curve di

corrente, con un corrispondente abbassamento e allontanamento reciproco dei picchi di ossidazione e riduzione, a causa del trasferimento elettronico che diventa uno stadio cineticamente lento, non più trascurabile come lo era per i sistemi reversibili. È possibile quindi ottenere delle informazioni sulla perdita di reversibilità dell'elettrodo quando si è in presenza di un allontanamento o una riduzione dei picchi redox del voltammogramma, o anche di un suo cambio di forma.

### 1.2.3 Amperometria potenziostatica

L'amperometria potenziostatica è una misura elettrochimica, effettuata nel tempo, della corrente che si instaura in seguito all'applicazione di un potenziale costante in cella. Si tratta quindi di una misura amperometrica nella quale il potenziale viene variato a gradino da un valore a un altro sufficiente da favorire la reazione redox della specie elettroattiva in soluzione. La corrente faradica misurata è un indicatore del flusso diffusivo che avviene in direzione dell'elettrodo. Poiché all'avanzare della reazione lo spessore dello strato diffusivo aumenta e il gradiente di concentrazione in prossimità della superficie diminuisce, si ottiene un profilo decrescente della curva di corrente. La corrente faradica istantanea è calcolabile mediante l'equazione di Cottrell (1.10) precedentemente riportata.

### 1.2.4 Spettroscopia di impedenza elettrochimica

La spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) è una tecnica elettrochimica di notevole importanza in quanto permette lo studio di quanto avviene all'interfaccia elettrodo-elettrolita direttamente *in situ*, permettendo di evidenziare e separare i contributi dei vari fenomeni elettrochimici che avvengono nel sistema in esame.

La resistenza elettrica è l'abilità che un elemento di un circuito manifesta opponendosi al flusso di corrente elettrica. La legge di Ohm definisce la resistenza  $R$  ( $\Omega$ ) come il rapporto tra il potenziale  $E$  (V) e la corrente  $I$  (A):

$$R = \frac{E}{I} \quad . \quad (1.17)$$

Il suo utilizzo è però limitato al resistore ideale, che gode delle seguenti proprietà:

- segue la legge di Ohm per qualsiasi valore di  $E$  o  $I$ ;
- mostra un valore di  $R$  indipendente dalla frequenza della corrente;
- è caratterizzato da un valore di  $E$  che è in fase con il segnale di  $I$ .

Tuttavia nella realtà si hanno dei comportamenti più complessi, pertanto si introduce il concetto più generale di impedenza, che supera le precedenti limitazioni.

Impiegando la tecnica EIS, l'impedenza elettrochimica viene misurata applicando un potenziale in corrente alternata (AC) a una cella elettrochimica e rilevando la corrente che attraversa la cella. Si sollecita il sistema con un segnale piccolo, per favorire una risposta lineare:

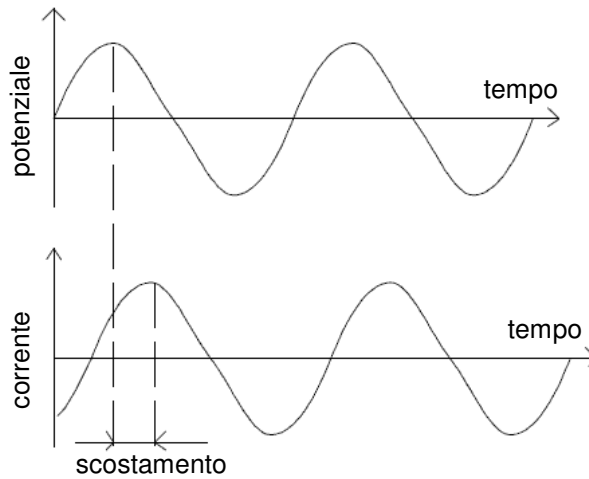
$$E = E_0 \text{sen}(\omega t) \quad , \quad (1.18)$$

dove  $E$  è il potenziale applicato al tempo  $t$ ,  $E_0$  è l'ampiezza del segnale,  $\omega$  ( $\text{rad s}^{-1}$ ) è la frequenza angolare, espressa come  $\omega = 2\pi f$ , con  $f$  ( $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$ ) che indica la frequenza.

In un sistema lineare, per il quale è valido il principio di sovrapposizione dei segnali, la risposta della corrente  $I$  a un potenziale sinusoidale è anch'essa di tipo sinusoidale con la stessa frequenza, ma spostata di fase con uno scostamento  $\phi$  e con una diversa ampiezza  $I_0$ :

$$I = I_0 \text{sen}(\omega t + \phi) \quad , \quad (1.19)$$

come si può osservare dalla Figura 1.6.



**Figura 1.6** Risposta della corrente ad un potenziale applicato di tipo sinusoidale, per un sistema lineare.

Analogamente alla legge di Ohm, si può definire l'impedenza come:

$$Z = \frac{E}{I} = \frac{E_0 \text{sen}(\omega t)}{I_0 \text{sen}(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\text{sen}(\omega t)}{\text{sen}(\omega t + \phi)} \quad , \quad (1.20)$$

in termini di ampiezza  $Z_0$  e sfasamento  $\phi$ .

Mediante la relazione di Eulero

$$\exp(j\phi) = \cos\phi + j\text{sen}\phi, \quad (1.21)$$

il potenziale, la corrente e l'impedenza possono essere riscritti nella forma:

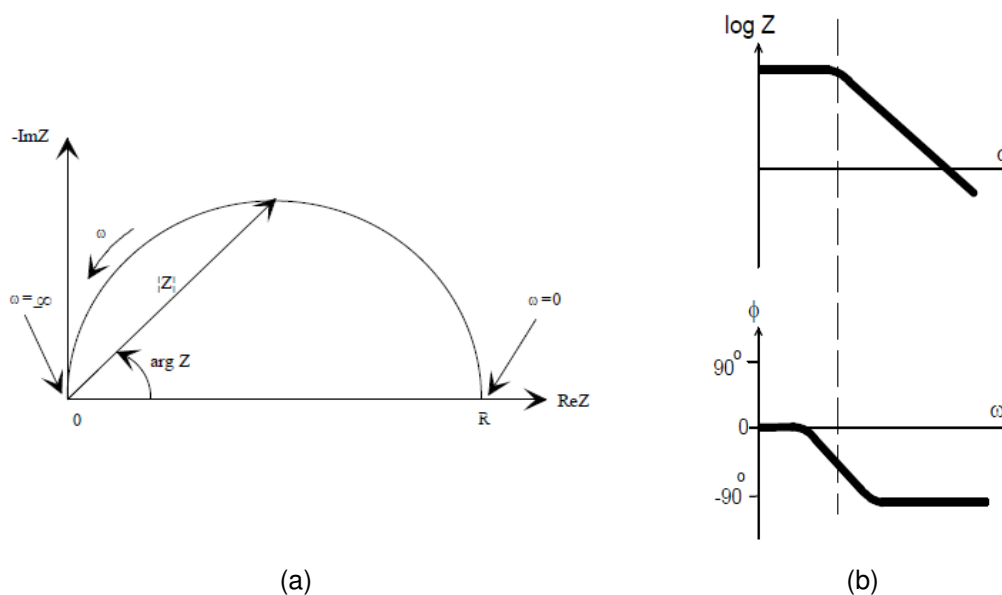
$$E = E_0 \exp(j\omega t), \quad (1.22)$$

$$I = I_0 \exp(j\omega t - \phi), \quad (1.23)$$

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0 (\cos\phi + j\text{sen}\phi), \quad (1.24)$$

dove, con riferimento all'impedenza, si possono riconoscere la parte reale e quella immaginaria. Rappresentando i due contributi sugli assi ortogonali di un grafico, in particolare la parte reale sull'asse delle ascisse e la parte immaginaria sull'asse delle ordinate, si ottiene il diagramma di Nyquist (*Nyquist plot*), che riporta i valori dell'impedenza ad una determinata frequenza. Questo grafico, che per convenzione ha l'asse delle ordinate negativo, presenta valori a basse frequenze sulla zona a destra e ad alte frequenze su quella a sinistra.

Il luogo dei punti dei valori di impedenza del circuito può essere definito anche mediante un vettore puntato nell'origine degli assi, con lunghezza  $|Z|$  e formante un angolo con l'asse delle ascisse pari all'angolo di fase  $\phi = \arg Z$ , come si può vedere in Figura 1.7 a sinistra.








**Figura 1.7** Diagramma di Nyquist (a) e diagramma di Bode (b).

Un altro metodo di rappresentazione dell'impedenza è il diagramma di Bode (*Bode plot*), che riporta la frequenza, in scala logaritmica, sull'asse delle ascisse e il valore assoluto dell'impedenza, sempre in scala logaritmica, oppure lo sfasamento sull'asse delle ordinate (Figura 1.7 a destra). A differenza del *Nyquist plot*, il *Bode plot* fornisce informazioni sulla frequenza del sistema.

I dati ottenuti con un'analisi EIS non forniscono una misura diretta dei processi elettrochimici che avvengono nel sistema in esame, ma è necessario elaborarli attraverso la costruzione di un modello in grado di rappresentare tutti i processi osservabili nel sistema considerato. Il modello viene definito associando ai diversi fenomeni che avvengono nel sistema opportuni elementi tipici dei circuiti elettrici: si ottiene così un modello che coincide con un circuito elettrico, detto *circuito equivalente*. Gli elementi dei circuiti elettrici maggiormente impiegati in questi modelli sono i resistori, gli induttori e i condensatori: ciascuno di questi assume un significato preciso nella modellazione del sistema. La Tabella 1.6 riporta le caratteristiche di questi elementi.

**Tabella 1.6** Principali elementi dei circuiti elettrici con relative proprietà.

Componente	Lettera	Simbolo	Impedenza
Resistore	R		$Z=R$
Induttore	L		$Z=j\omega L$
Condensatore	C		$Z=1/j\omega C$
Impedenza infinita di Warburg	W		$Z=\sigma/(j\omega)^{1/2}$
Elemento a fase costante (CPE)	Q		$Z=\sigma/(j\omega)^N$

In un resistore, l'impedenza è indipendente dalla frequenza e ha solo la componente reale. La corrente attraverso un resistore è in fase con il potenziale.

In un induttore, l'impedenza aumenta all'aumentare della frequenza e ha solo la componente immaginaria. La corrente che attraversa l'induttore manifesta uno sfasamento di  $90^\circ$  rispetto alla fase del potenziale applicato.

In un condensatore, l'impedenza diminuisce all'aumentare della frequenza e ha solo la componente reale. La corrente che attraversa la capacità manifesta anch'essa uno sfasamento di  $90^\circ$  rispetto alla fase del potenziale applicato.

A questi elementi si associano anche altri due componenti, l'impedenza infinita di Warburg e l'elemento a fase costante, che verranno trattati in seguito.

Solo in pochi casi è sufficiente un singolo elemento per modellare un sistema elettrochimico: per i sistemi più complessi si ricorre a una opportuna combinazione degli elementi del circuito, che possono essere disposti in serie o in parallelo.

L'impedenza equivalente  $Z_{eq}$  di elementi, ciascuno con impedenza  $Z_i$ , collegati in serie o in parallelo, è data rispettivamente dalle seguenti relazioni:

$$Z_{eq\ serie} = \sum_i Z_i \quad , \quad (1.25)$$

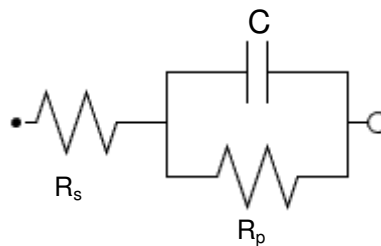
$$\frac{1}{Z_{eq\ parallelo}} = \sum_i \frac{1}{Z_i} \quad . \quad (1.26)$$

I modelli che si ottengono sono quindi caratterizzati da specifici parametri che vengono determinati per *fitting* dei dati sperimentali.

Verranno di seguito esaminati i principali modelli di circuiti equivalenti utilizzati per interpretare i valori di impedenza misurati in questo lavoro.

#### 1.2.4.1 Cella di Randles semplificata

Il primo modello utilizzato per la rappresentazione dei circuiti elettrochimici è quello della cella di Randles semplificata, rappresentata con il circuito R(CR) di Figura 1.8.



**Figura 1.8** Circuito elettrico equivalente per una cella di Randles semplificata ideale.

In qualsiasi sistema elettrochimico, esiste una resistenza intrinseca dell'elettrolita in soluzione, misurabile tra l'elettrodo di riferimento e l'elettrodo di lavoro. La resistenza di una generica soluzione, contenuta in un volume definito da un'area trasversale  $A$  e una lunghezza  $l$ , dipende dal tipo e dalla concentrazione di analita oltre che dalla temperatura e dalle caratteristiche geometriche del sistema ed è data dalla seguente equazione:

$$R = \rho \frac{l}{A} = \frac{1}{\kappa} \frac{l}{A} \quad , \quad (1.27)$$



dove  $\rho$  ( $\Omega \text{ m}$ ) è la resistività e il suo reciproco  $\kappa$  ( $\Omega^{-1} \text{ m}^{-1} = \text{S}$ ) è la conduttività del mezzo. Nel circuito di Figura 1.8 tale grandezza è rappresentata con  $R_s$ , ed è posta in serie con i rimanenti elementi del circuito.

Inoltre, come descritto nel §1.2.1.4, tra l'elettrodo e l'ambiente elettrolitico si forma un doppio strato elettrico, costituito da ioni che migrano dalla soluzione alla superficie dell'elettrodo: l'effetto di *coating* è paragonabile a quello di un condensatore di un circuito elettrico ed è indicata con  $C$ . La capacità del doppio strato dipende da numerosi fattori, come il potenziale applicato, la temperatura di lavoro, il tipo e la concentrazione di analita, la presenza eventuale di zone ossidate, l'adsorbimento da parte dell'elettrodo di impurità presenti in soluzione nonché la rugosità dell'elettrodo stesso.

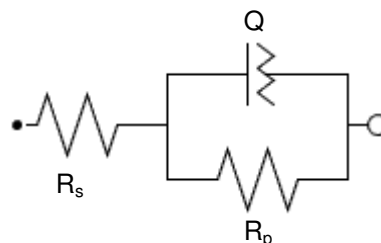
Infine si considera che quando si applica ad un elettrodo un potenziale il cui valore differisce dal potenziale in circuito aperto (*open circuit potential*, OCP), l'elettrodo viene polarizzato e può indurre una corrente dovuta alle reazioni elettrochimiche che avvengono alla superficie elettrodica. Il valore della corrente dipende dalle cinetiche delle reazioni e dalla diffusione delle specie in soluzione ed è inversamente proporzionale alla resistenza di polarizzazione  $R_p$  dell'elettrodo, dovuta al trasferimento di carica, e in Figura 1.8 appare in parallelo alla capacità del doppio strato.

Se le capacità presenti nel sistema manifestano un comportamento non ideale, si ricorre a un elemento di circuito, chiamato *elemento a fase costante* (CPE), che approssima in modo empirico questo fenomeno. La sua impedenza può essere così espressa:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^{\alpha} Y_0} \quad , \quad (1.28)$$

dove  $Y_0$  è la capacità dell'elemento e  $N$  è una costante empirica che assume valori pari a 1 nel caso di capacità ideali, inferiori a 1 per situazioni non ideali.

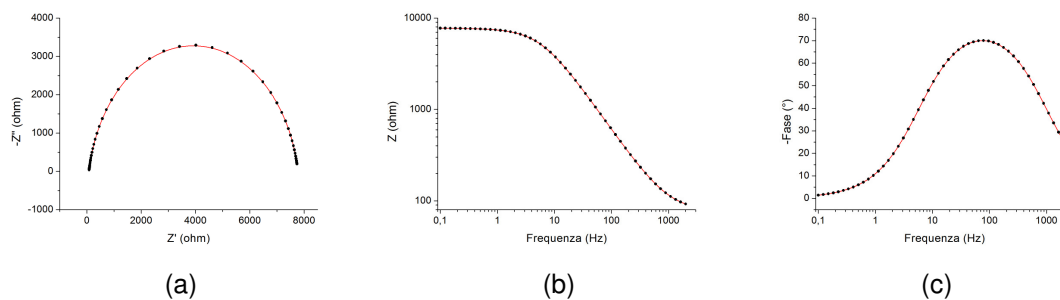
Il circuito assume così la forma generale R(QR) schematizzata in Figura 1.9, nella quale l'elemento  $C$  è sostituito da  $Q$ , che rappresenta il CPE.



**Figura 1.9** Circuito elettrico equivalente per una cella di Randles semplificata non ideale.

I grafici tipici di Nyquist e Bode per un circuito di questo tipo sono riportati in Figura 1.10.

Il diagramma di Nyquist è costituito da un semicerchio: la resistenza della soluzione è data dall'intercetta con l'asse reale in corrispondenza del valore a frequenza maggiore, mentre l'intercetta a frequenza minore, ossia il punto più a destra, fornisce la somma della resistenza della soluzione e della resistenza di polarizzazione. Il diametro quindi indica la resistenza di polarizzazione, come differenza dei due valori precedenti.



**Figura 1.10** Diagramma di Nyquist (a sinistra), di Bode-modulo (al centro) e di Bode-fase (a destra) per un circuito elettrico equivalente a una cella di Randles semplificata non ideale.

I diagrammi di Bode permettono di ottenere la frequenza di risonanza, proprietà intrinseca del sistema.

#### 1.2.4.2 Cella di Randles

La diffusione può anch'essa creare un'impedenza nel sistema, l'impedenza di Warburg, in funzione della frequenza del potenziale applicato in cella. A basse frequenze assume un valore elevato poiché i reagenti diffondono percorrendo maggiori distanze.

L'impedenza infinita di Warburg è esprimibile in funzione della frequenza,

$$Z_w = \sigma \omega^{-1/2} (1 - j) \quad , \quad (1.29)$$

dove  $\sigma$  è il coefficiente di Warburg:

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \cdot \left( \frac{1}{c_{O,b} \sqrt{D_O}} + \frac{1}{c_{R,b} \sqrt{D_R}} \right) \quad , \quad (1.30)$$

con  $A$  che rappresenta l'area dell'elettrodo e  $D_O$  e  $D_R$  rispettivamente i coefficienti di diffusione delle specie ossidata e ridotta. La (1.30) è valida solo se lo strato di

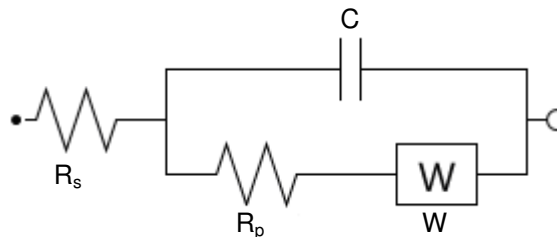
diffusione ha uno spessore infinito. Per strati di diffusione confinati, si parla di impedenza finita di Warburg:

$$Z_o = \sigma \omega^{-1/2} (1 - j) \tanh \left( \delta \sqrt{\frac{j\omega}{D}} \right), \quad (1.31)$$

dove  $\delta$  è lo spessore dello strato di diffusione e  $D$  è il valore medio dei coefficienti di diffusione delle specie che diffondono.

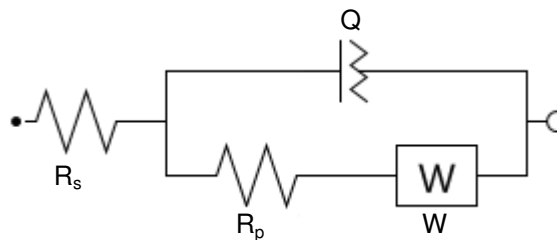
Si può notare che per alte frequenze ( $\omega \rightarrow \infty$ ) o per spessori infiniti ( $\delta \rightarrow \infty$ ), la (1.31) si riconduce alla (1.30).

Considerando una cella elettrochimica nella quale sia presente, oltre alla resistenza della soluzione  $R_s$ , al doppio strato capacitivo  $C$  e alla resistenza di polarizzazione  $R_p$ , anche il fenomeno diffusivo che controlla la cinetica, si può rappresentare il sistema con un circuito  $R(C[RW])$ , secondo la Figura 1.11, dove  $W$  indica l'impedenza di Warburg.



**Figura 1.11** Circuito elettrico equivalente per una cella di Randles ideale.

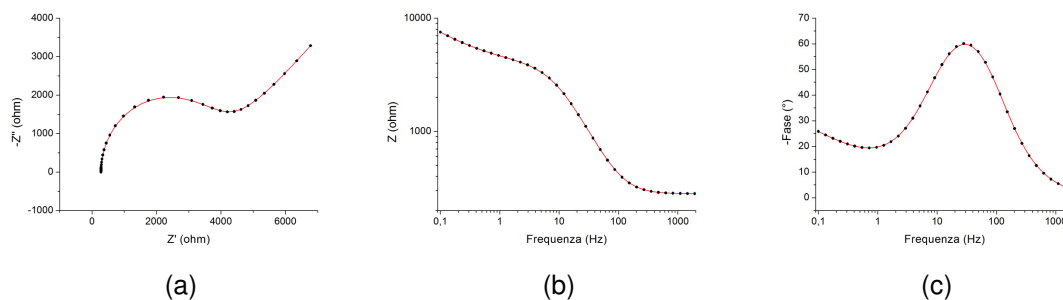
Similmente, il caso generale si ha quando la capacità  $C$  viene sostituita da un elemento a fase costante  $Q$ : il circuito  $R(Q[RW])$  è riportato in Figura 1.12.



**Figura 1.12** Circuito elettrico equivalente per una cella di Randles non ideale

I corrispondenti diagrammi di Nyquist e Bode sono riportati in Figura 1.13.

Si può notare che l'impedenza di Warburg appare nel diagramma di Nyquist come una retta che forma un angolo di  $45^\circ$  con l'asse reale.



**Figura 1.13** Diagramma di Nyquist (a sinistra), di Bode-modulo (al centro) e di Bode-fase (a destra) per un circuito elettrico equivalente a una cella di Randles non ideale.

Il modello rappresenta quindi un sistema nel quale la polarizzazione avviene in seguito alla combinazione di fenomeni cinetici e di diffusione.

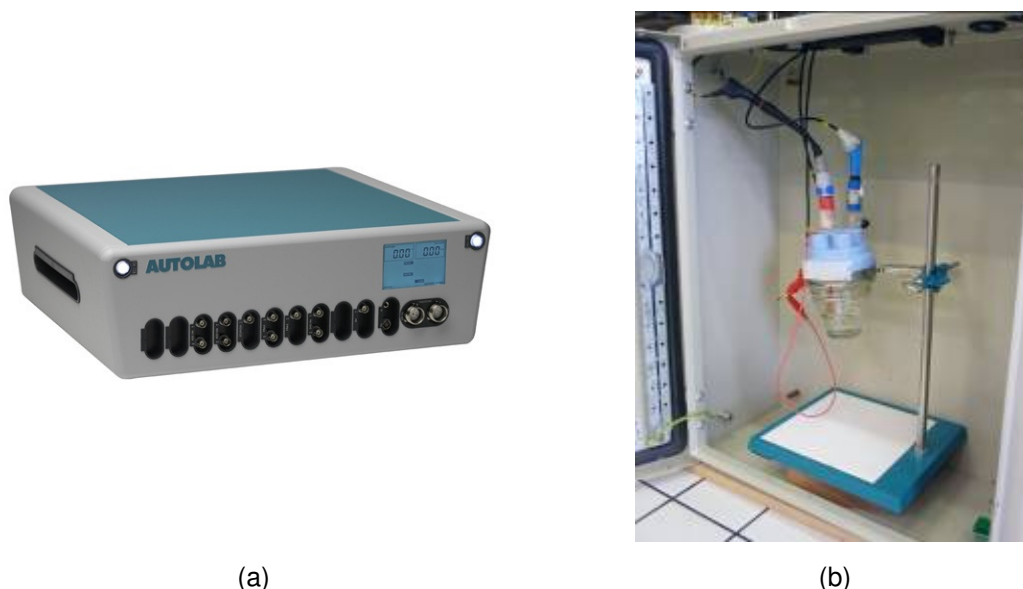
#### 1.2.4.3 *Fitting*

La scelta del modello più appropriato per rappresentare i dati ottenuti mediante la EIS richiede un'analisi approfondita dei fenomeni fisici che interessano il sistema elettrochimico in esame. Come si è visto, nei casi più complessi e di non idealità è necessario considerare elementi nel circuito che non hanno un significato fisico ma che trovano giustificazione nel tipo di modello utilizzato per rappresentare il fenomeno fisico che si sta osservando. La determinazione dei parametri richiede, dal punto di vista matematico, la soluzione di un sistema di equazioni non lineari complesse, che viene condotta con tecniche di calcolo apposite, come il metodo non lineare dei minimi quadrati (*non-linear least squares*, NLLS).

#### 1.2.5 *Sistema di acquisizione dati*

Tutte le misure elettrochimiche di questo lavoro di Tesi sono state effettuate per mezzo di un potenziostato-galvanostato (Autolab PGSTAT 128N Ecochemie, NL), Figura 1.14, interfacciato a un computer e gestito da apposito software (Nova 1.8) che permette anche la memorizzazione e visualizzazione dei dati.

Il potenziostato-galvanostato è uno strumento in grado di controllare il potenziale tra un elettrodo di lavoro e un controlettrodo e di applicare una differenza di potenziale tra l'elettrodo lavorante e un elettrodo di riferimento, secondo un programma definito da un generatore di funzioni. Il segnale digitale elaborato dal calcolatore viene inviato allo strumento attraverso un convertitore digitale-analogico (DAC).



**Figura 1.14** Potenziostato-galvanostato (a sinistra), cella elettrochimica e gabbia di Faraday (a destra).

Il potenziostato è stato quindi collegato ad una cella elettrochimica a tre elettrodi, formata da un elettrodo lavorante (W), che costituisce l'interfaccia di studio, un elettrodo di riferimento (R), che controlla il potenziale dell'elettrodo di lavoro, e un elettrodo ausiliario, chiamato anche contro elettrodo (C), che sostiene e misura la corrente all'elettrodo di lavoro. La cella elettrochimica è alloggiata all'interno di una gabbia di Faraday in modo da poter schermare le radiazioni elettromagnetiche provenienti dall'ambiente circostante e che possono disturbare le misure. Con questa configurazione è possibile misurare il potenziale e la corrente in maniera indipendente. Per effettuare le misure elettrochimiche è stato impiegato il ferrocene-metanolo (Sigma Aldrich®), in concentrazione 500  $\mu\text{M}$ , come tracciante redox, in una soluzione tampone di PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X.

I dettagli riguardanti il materiale e la forma degli elettrodi impiegati vengono descritti nel prossimo Capitolo.

### 1.3 Tecnica di caratterizzazione XPS

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) è una tecnica di spettroscopia quantitativa utilizzata per valutare la composizione della superficie dei materiali. Essa consente infatti di conoscere il tipo e la quantità degli elementi chimici che compongono la superficie di un materiale e di determinarne lo stato di legame. Le misure XPS si ottengono irradiando il campione con un fascio di raggi X e rilevando il numero e l'energia degli elettroni che vengono espulsi dalla superficie del materiale, in condizioni di vuoto quasi assoluto (*ultra-high vacuum*, UHV). Si tratta di una

tecnologia ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) poiché permette lo studio della chimica di superficie di un materiale, al suo stato inalterato oppure dopo aver subito dei trattamenti chimico-fisici.

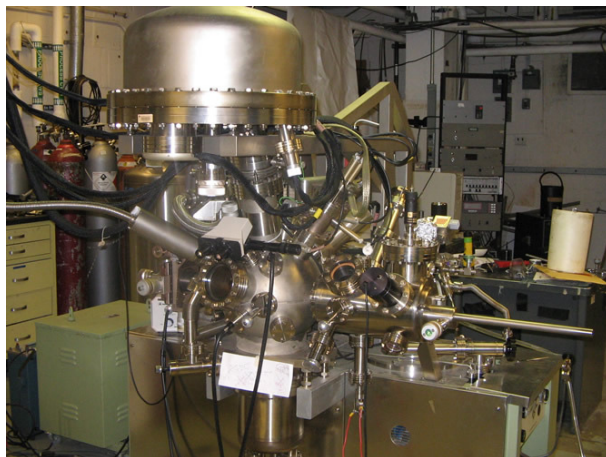
I fotoni che colpiscono ed entrano nel materiale con una certa energia  $E_{ph}$  subiscono alcune interazioni, quali l'effetto fotoelettrico e l'emissione Auger. Il risultato finale è l'espulsione di elettroni dalla superficie del campione in esame, con un'energia cinetica  $E_k$  che dipende dall'energia di legame  $E_b$  (*binding Energy*) indicativa dell'elemento chimico interessato:

$$E_b = E_{ph} - (E_k + \Phi) \quad , \quad (1.32)$$

dove  $\Phi$  è la funzione lavoro, chiamata anche lavoro di estrazione, dello spettrometro, ossia l'energia necessaria per strappare un elettrone da un metallo. L'energia dei fotoni  $E_{ph}$  è data dal prodotto tra la costante di Planck  $h$  e la frequenza  $\nu$  dei fotoni.

La tecnica permette di analizzare i primi strati atomici che compongono la superficie, con profondità dell'ordine di alcuni nm, poiché solo gli elettroni eccitati in prossimità della superficie riescono a fuoriuscire dal campione senza subire interazioni che dissipano parte dell'energia che li caratterizza e fornendo con precisione le informazioni che li caratterizzano.

La Figura 1.15 rappresenta l'impianto per ottenere le misure di caratterizzazione XPS.



**Figura 1.15** *Impianto per analisi XPS.*

Ciascuna misura necessita di un tempo di analisi di alcune ore, in relazione all'ampiezza dello spettro di emissione che si vuole ottenere, soprattutto nel caso in cui si desideri indagare la presenza di diversi elementi sullo stesso campione. È necessaria anche una fase accurata di pulizia e preparazione del campione, che deve soddisfare alcune esigenze strutturali e dimensionali.

Si tratta comunque di un'analisi molto accurata e sensibile, in grado di rilevare elementi presenti in superficie a concentrazioni dell'ordine dei 100 ppm. Le grandi potenzialità sono dovute anche alla capacità di determinare in modo univoco il tipo di legame chimico che interessa il singolo atomo.

## 1.4 Sviluppo di un biosensore

La realizzazione del trasduttore avviene mediante una serie di 4 *step*, che vengono di seguito descritti. Tutte le soluzioni acquose vengono realizzate mediante l'impiego di acqua milli-Q.

### 1.4.1 1° step

Il 1° *step* è quello che vede l'induzione della ionizzazione dello *spacer*, in modo da legare stabilmente sulla superficie dell'elettrodo una molecola chimicamente attivabile. In questo lavoro sono stati impiegati due *spacer*: i sali di diazonio e la cisteamina. Il legame tra lo *spacer* e l'elettrodo di lavoro è stato effettuato applicando, sull'elettrodo lavorante immerso in soluzione, un prefissato potenziale chimico: questa procedura prende il nome di *electrografting* (EG), o semplicemente *grafting*.

Le tecniche di EG possibili e utilizzate in questo lavoro sono due: in un caso il potenziale applicato in cella rimane costante nel tempo e pari al potenziale redox  $E^0$  della specie elettroattiva, altrimenti, nel secondo caso, il potenziale viene variato a cicli all'interno di una finestra prefissata di valori attorno a  $E^0$  e con una determinata velocità di scansione.

È possibile osservare una diminuzione della reversibilità del ferrocene all'aumentare del tempo di *grafting*, poiché quanto più il *grafting* è migliore, tanto maggiore è la quantità di sostanze isolanti adsorbite sulla superficie, peggiorando il trasferimento di carica all'elettrodo: una prova di ciò è data dalla minore altezza, in valore assoluto, dei picchi di riduzione e ossidazione in una CV effettuata dopo il *grafting* rispetto a una CV dello stesso campione prima della modifica.

I dettagli operativi saranno trattati nel prossimo Capitolo, di seguito vengono riportati solamente i materiali impiegati.

#### 1.4.1.1 Sali di diazonio

I materiali usati per lo sviluppo del primo tipo di *spacer* sono:

- *p*-fenilendiammina  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NH}_2$  (Sigma Aldrich®);
- nitrito di sodio  $\text{NaNO}_2$  (Sigma Aldrich®);
- acido cloridrico  $\text{HCl}$  (Sigma Aldrich®).

### 1.4.1.2 Cisteammina

I materiali usati per lo sviluppo del secondo tipo di *spacer* sono:

- cisteammina HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 5 mM;
- acetonitrile NC-CH<sub>3</sub> (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) come solvente;
- argon Ar (gorgogliamento a 0.5 bar, 30') per deaerare la soluzione.

### 1.4.2 2° step

Il 2° *step* prevede l'attacco della biotina (PM 244.31 g mol<sup>-1</sup>):

- biotina-nhs (biotina succinimide, Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 20 mM;
- piridina C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 20 mM;
- dimetilsulfossido (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO (DMSO, Sigma Aldrich<sup>®</sup>) come solvente.

### 1.4.3 3° step

Il 3° *step* consiste nel legare l'avidina (PM 66÷69 kDa):

- avidina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 0.02 mg mL<sup>-1</sup>;
- PBS 1X (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) come solvente.

### 1.4.4 4° step

Il 4° *step* prevede l'attacco dell'enzima glucosio ossidasi (PM 160 kDa), o glucosidasi, GOx, all'avidina. Questo avviene preparando prima una soluzione di biotinilazione:

- biotina-nhs (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 20 mM in acqua milli-Q;

Successivamente si prepara la soluzione con la GOx biotinata:

- GOx (da *Aspergillus Niger*, Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 20 mg;
- *biotinylation solution* 25.2 μL;
- acqua milli-Q 480 μL.

## 1.5 Sistema di regolazione delle portate

La movimentazione dei fluidi all'interno del *chip* microfluidico viene effettuata per mezzo di una pompa a siringa (11 ELITE I/W Dual, HARVARD Apparatus, US) in grado di garantire un controllo altamente accurato delle portate, di ordini di grandezza anche micronici. Lo strumento si compone di un *holder* per l'alloggiamento delle siringhe, fino a 2, provvisto di una ganascia che ne garantisce il fissaggio. Gli stantuffi delle siringhe sono bloccati in un *rack* che si muove parallelamente alla ganascia per mezzo di una vite senza fine. Le siringhe impiegate sono in polistirene da 3 mL o 5 mL (Beckton & Dickinson Co., US). L'interfaccia con l'utente è costituita da un display *touch screen* per mezzo del quale è possibile inserire il modello e la capacità delle



siringhe montate e i valori di portata desiderati. La pompa può funzionare in modalità infusione o aspirazione. Inoltre è possibile impostare dei programmi dall'utente, che può introdurre elementi come tempi di attesa o cicli di operazioni.

La pompa a siringa è opportunamente collegata al sistema appositamente costruito per l'alloggiamento del *chip* microfluidico, che verrà descritto nel successivo Capitolo.

Tutto il sistema microfluidico di trasporto dei fluidi è stato realizzato mediante tubi in PTFE (Cole Parmer<sup>®</sup>, IT) del diametro interno di 0.56 mm ed esterno di 1.1 mm, opportunamente raccordati alla pompa e al *chip*.



# Capitolo 2

## Risultati

Verranno ora descritti e discussi i risultati sperimentali di questo lavoro, suddivisi in tre parti.

Inizialmente saranno fatte delle considerazioni di carattere generale, riguardanti il tipo di analita impiegato per le misure elettrochimiche e l' idoneità per l'ITO ad essere impiegato come elettrodo lavorante.

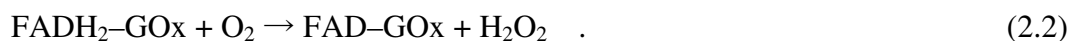
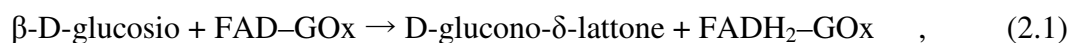
Successivamente verranno analizzati i dati relativi al comportamento di un biosensore elettrochimico realizzato attraverso un processo discontinuo, secondo un approccio *bottom-up*.

Infine si illustrerà il sistema impiegato per la realizzazione del *chip* microfluidico e si riporteranno i risultati finali raggiunti.

### 2.1 Considerazioni generali

In questo lavoro di Tesi si considera come *case study* la realizzazione di un biosensore per la determinazione della concentrazione di glucosio in una soluzione acquosa.

La rilevazione del glucosio avviene in via indiretta mediante la misura della corrente elettrica che si genera in seguito alla scarica di acqua ossigenata sulla superficie dell'elettrodo. Si tratta di una reazione redox a due stadi:



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



Il flusso di elettroni è funzione della concentrazione di acqua ossigenata, che a sua volta si produce in quantità stechiometrica rispetto al glucosio reagente nel primo stadio del

processo, secondo la (2.1) e (2.2). Di conseguenza, la corrente prodotta risulta proporzionale alla concentrazione di glucosio nell'analita.

### 2.1.1 Valutazione dell'efficienza del grafting

I trattamenti elettrochimici utilizzati per la modifica diretta della superficie dell'elettrodo prevedono la formazione di un legame tra una specie elettroattiva in soluzione e la superficie elettrodica, in seguito all'applicazione, sullo stesso elettrodo lavorante, di un certo potenziale chimico, secondo la tecnica dell'*electrografting* (§ 1.4.1).

Come riportato nel §1.2.5, le misure elettrochimiche per la caratterizzazione degli elettrodi durante le diverse fasi di trattamento vengono effettuate impiegando l' $\alpha$ -metilferrocenemetanolo ( $\alpha$ -MeFcMeOH) come tracciante redox, in concentrazione 500  $\mu$ M in PBS 1X. Questa scelta è giustificata dal fatto che si tratta di un sistema elettrochimico con un comportamento reversibile, che segue la legge di Nernst.

Quando viene applicata all'elettrodo di lavoro una differenza di potenziale di +0.25 V rispetto all'elettrodo di riferimento di Ag/AgCl, si instaura la reazione di ossidazione, che comporta il passaggio dalla forma ridotta a quella ossidata del ferrocene, rispettivamente lo ione ferrocianuro e lo ione ferricianuro:



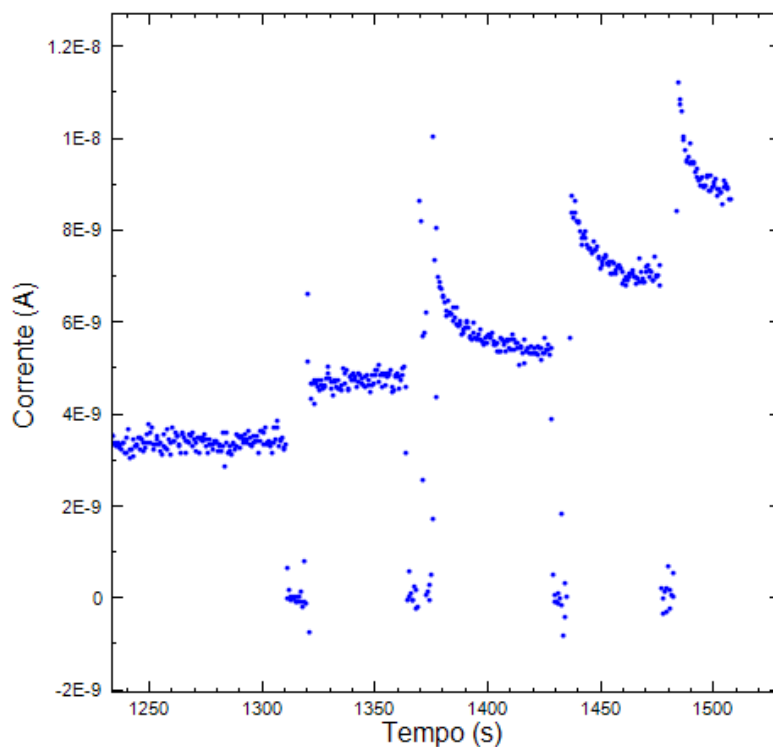
La risposta in corrente è proporzionale alla concentrazione di analita presente in soluzione, secondo l'equazione di Cottrell (1.10).

### 2.1.2 Verifica con acqua ossigenata

Preliminarmente è stata effettuata una prova sperimentale per accertare se un elettrodo lavorante in ITO è sufficientemente conduttivo da rilevare la scarica, sull'elettrodo, di acqua ossigenata, che costituisce il prodotto finale dell'ossidazione del glucosio.

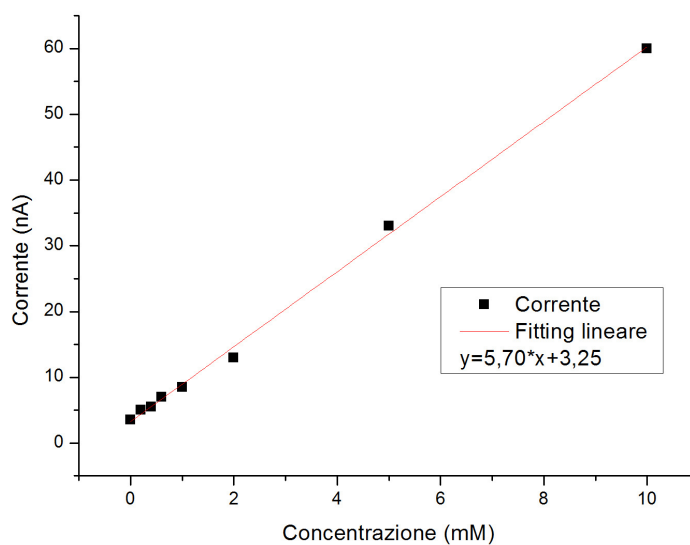
Tale verifica è stata condotta applicando un potenziale costante di +0.7 V contro un elettrodo di riferimento di Ag/AgCl, in una soluzione di PBS 1X ed effettuando delle aggiunte in cella di acqua ossigenata a concentrazioni note.

La Figura 2.1 riporta la misura della corrente rilevata nel tempo a potenziale applicato costante: ad ogni nuova concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  si può osservare l'aumento del segnale di corrente, con un andamento "a gradini".



**Figura 2.1** Verifica della capacità catalitica dell'ITO all' $\text{H}_2\text{O}_2$ , in seguito all'applicazione di un potenziale costante pari a 0.7 contro Ag/AgCl.

In Figura 2.2 vengono riportati i valori delle correnti rilevate al variare della concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  in soluzione.



**Figura 2.2** Relazione tra corrente rilevata e concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  per un elettrodo di ITO: i valori sperimentali si dispongono lungo una retta (indice di correlazione  $R = 0.99784$ ).

Si può osservare che la relazione tra le due grandezze è lineare e pertanto si può affermare che l'ITO è un materiale utilizzabile per la costruzione di un biosensore per il rilevamento indiretto del glucosio.

## 2.2 Realizzazione del biosensore tramite processo discontinuo

Appurata la capacità dell'ITO di svolgere la funzione di elettrodo lavorante, l'attenzione è stata rivolta alla definizione e messa a punto di una metodologia per legare covalentemente a questa superficie una molecola chimicamente attivabile, chiamata *spacer*, al fine di poter realizzare il biosensore enzimatico.

Si tratta di trovare un particolare agente accoppiante che possa stabilire un legame forte con la superficie dell'ITO e al contempo permettere l'attacco dell'enzima, in questo caso la GOx, mediante una catena intermedia di molecole e proteine specifiche.

In questo lavoro si analizzano due tipi di *spacer*: i sali di diazonio e la cisteamina.

L'indagine sperimentale è mirata a ottimizzare il funzionamento dell'elettrodo di ITO in previsione di una sua miniaturizzazione.

### 2.2.1 Sali di diazonio

È stato dimostrato (Lyskawa e Bélanger, 2006) che è possibile modificare un elettrodo di oro mediante la tecnica dell'*electrografting*, in modo da renderne la superficie chimicamente attiva. La specie impiegata per effettuare questo tipo di *grafting* è il sale di diazonio. La chimica alla base dei sali di diazonio vede le ammine quali reagenti principali, come sintetizzato in Figura 2.3.

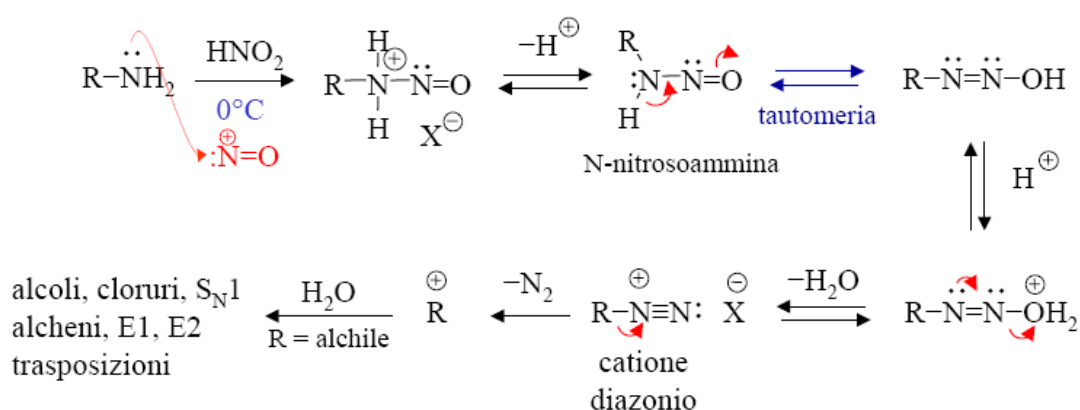


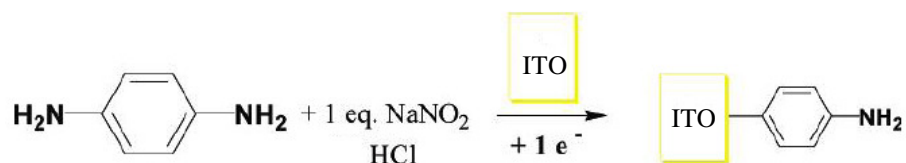
Figura 2.3 Chimica dei sali di diazonio

Nell'esempio di letteratura è stata considerata una soluzione 5 mM di *p*-fenilendiammina ( $NH_2-C_6H_4-NH_2$ ) con nitrito di sodio ( $NaNO_2$ ) equimolare e acido

cloridrico 0.5 M ed è stato applicato all'elettrodo lavorante un potenziale pari a -0.4 V (contro Ag/AgCl) per 400 s. In condizioni acide, l'acido nitroso che si forma dal nitrito di sodio sviluppa *in situ*, in presenza dell'ammina, il sale di diazonio corrispondente che, a sua volta, si scinde nel catione amminofenil-monodiazonio. Durante il *grafting* a potenziale costante, è stata osservata una reazione di riduzione di questo catione, che va a legarsi sulla superficie elettrodica, passivando l'elettrodo d'oro a causa della formazione di un *self-assembled monolayer* (SAM) di gruppi amminofenilici immobilizzati sul metallo, mediante un legame forte e stabile. Questo risultato è stato confermato attraverso caratterizzazione elettrochimica della superficie, condotta utilizzando la voltammetria ciclica e la spettroscopia a impedenza elettrochimica, e morfologica, impiegando la microscopia a forza atomica.

#### 1.2.1.6 1° step

Partendo da questi risultati di letteratura, l'obiettivo della prima fase del lavoro è stato quello di realizzare il processo di *grafting* considerato su un elettrodo di ITO, secondo lo schema mostrato in Figura 2.4.



**Figura 2.4** Formazione di uno strato amminofenilico sulla superficie dell'ITO.

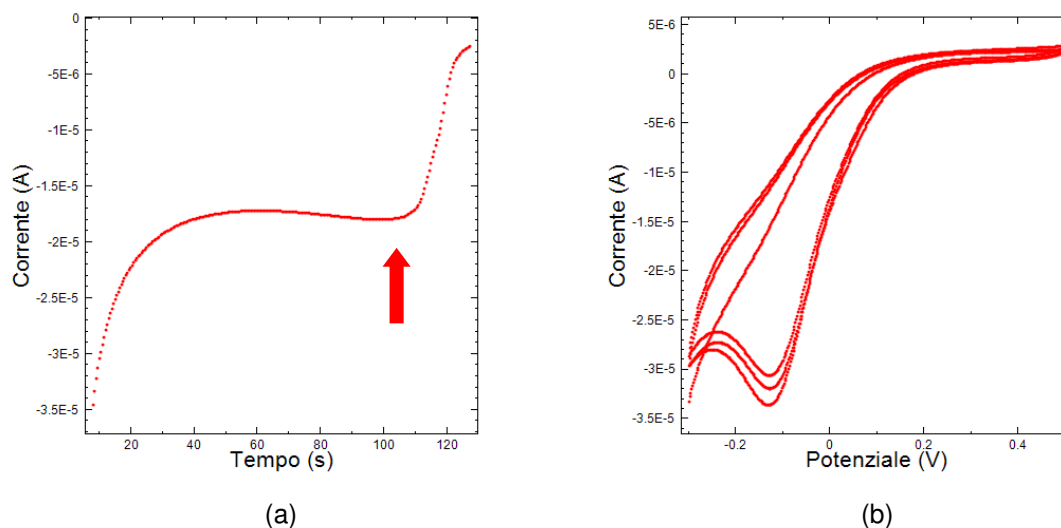
La cella elettrochimica è costituita da un elettrodo di ITO come lavorante, un elettrodo di Ag/AgCl come riferimento e un elettrodo di Pt come contro elettrodo.

Nel caso in studio si utilizza la *p*-fenilendiammina e il nitrito di sodio in concentrazione equimolare a quella dell'ammina, pari a 5 mM in una soluzione acquosa di acqua milli-Q. L'ambiente acido è ottenuto mediante aggiunta di acido cloridrico concentrato.

La tecnica di *grafting* a potenziale costante presuppone la conoscenza del potenziale redox  $E^0$  della specie elettroattiva in soluzione: dato che in letteratura non sono disponibili dati coerenti per il potenziale di riduzione dei sali di diazonio, si è deciso di far riferimento al valore di -0.4 V proposto per l'elettrodo di oro (Lyskawa e Bélanger, 2006).

Nelle prove condotte adottando il metodo del potenziale applicato a cicli, considerando che l'ITO si corrode a pH acidi, in particolare a bassi potenziali, si è deciso di lavorare con valori di potenziale più elevati, in un intervallo da -0.3 V a 0.5 V.

Inoltre, proprio per prevenire un eventuale *etching* dell'ITO da parte dell'acido cloridrico, si è deciso di verificare preliminarmente l'efficacia della reazione di formazione del sale di diazonio, diluendo l'acido in quantità tali da ottenere soluzioni a concentrazioni finali diverse, 5, 50, 100, 200 e 500 mM. Anche i tempi di immersione in soluzione dell'elettrodo di ITO sono stati attentamente valutati per impedire il deterioramento della superficie dell'elettrodo: da una decina di secondi a pochi minuti. In Figura 2.5 sono riportati due esempi di corrosione completa dell'ITO avvenuta in seguito al trattamento acido dovuto al *grafting*, effettuato una volta (Figura 2.5a) a potenziale costante di  $-0.4$  V per 180 s in soluzione 200 mM di HCl e una volta (Figura 2.5b) a potenziale a cicli, con 3 cicli  $-0.3 \div 0.5$  V in soluzione 500 mM di HCl. In entrambi i casi, dopo il *grafting* non è più possibile rilevare, mediante un comune tester, la presenza di ITO sulla superficie dei campioni: questo indica che sono state superate le condizioni critiche tollerate dal sottile film di ITO depositato su vetro. La freccia in Figura 2.5a indica le condizioni nelle quali si raggiunge la completa corrosione del campione trattato a potenziale costante: la corrente sale immediatamente a zero.

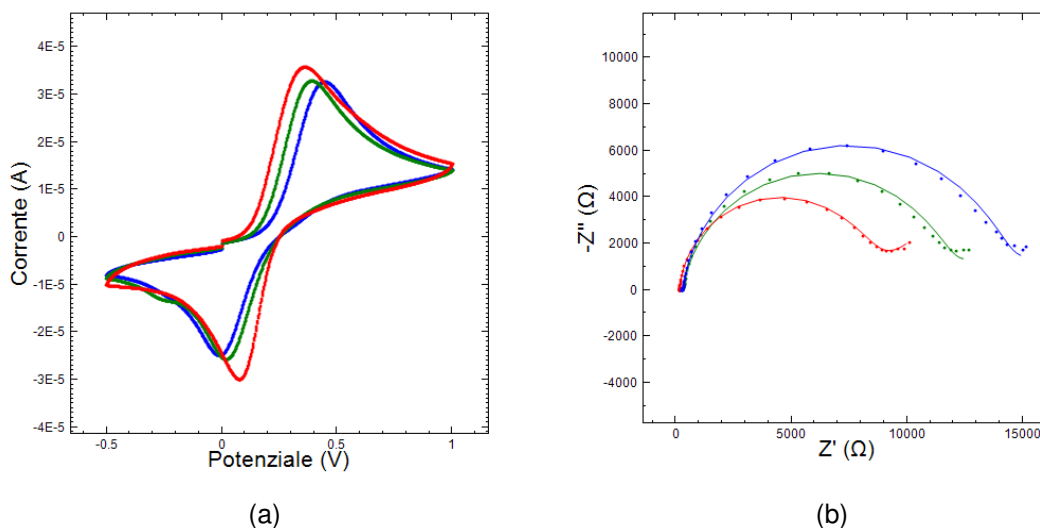


**Figura 2.5** Etching dell'ITO: (a) dopo *grafting* con potenziale applicato costante a  $-0.4$  V per 180" in soluzione 200 mM di HCl; (b) dopo *grafting* con potenziale applicato a 3 cicli  $-0.3 \div 0.5$  V con velocità di scansione 50 mV/s in soluzione 500 mM di HCl. Si può notare che nel caso del *grafting* a potenziale costante il punto di corrosione totale del film di ITO è indicato dalla freccia. Nel secondo caso invece la corrosione non si deduce direttamente dal grafico, ma solo dopo una verifica con un multimetro.

Per verificare la specificità della reazione di *grafting* del sale di diazonio sull'ITO, è stata preliminarmente effettuata una prova immergendo l'elettrodo nella soluzione utilizzata per il processo senza però applicare il potenziale all'elettrodo. I risultati di prove elettrochimiche condotte sul campione così ottenuto sono posti a confronto in Figura 2.6 con quelli relativi a un elettrodo di ITO che ha subito *grafting* a potenziale



costante per un tempo pari al periodo di immersione. In particolare vengono considerate le misure di CV e EIS, riportate in Figura 2.6.

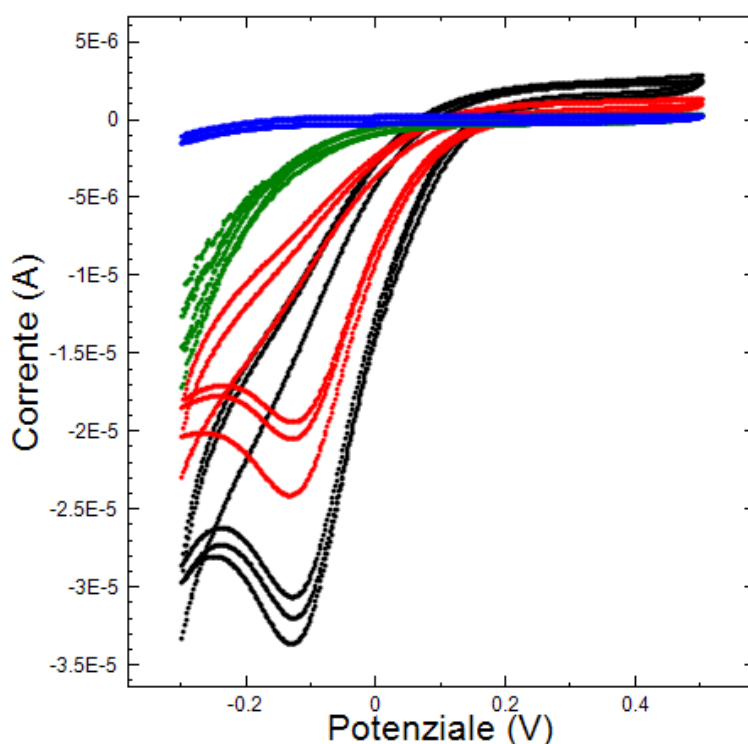


**Figura 2.6** Effetto dell'immersione dell'ITO nella soluzione di grafting: CV (a) e EIS (b) in ferrocene di un campione tal quale (curva blu), di un campione dopo semplice immersione 200'' in soluzione 100 mM di HCl (curva verde), di un campione dopo grafting a -0.4 V per 200'' in soluzione 100 mM di HCl (curva rossa).

Si può osservare che il grafico della CV sul campione di ITO sottoposto a semplice immersione (curva verde) mostra un avvicinamento dei picchi di ossidazione e riduzione rispetto al campione che non ha subito alcun trattamento (curva blu): questo fa supporre che sia avvenuta una semplice pulizia della superficie dell'ITO, grazie alla presenza dell'acido cloridrico in soluzione. Il campione che ha subito *grafting* (curva rossa), invece, mostra un comportamento diverso: i picchi si avvicinano e crescono in intensità di corrente. La differenza tra la posizione del picco di ossidazione e quello di riduzione è infatti di 0.36 V per il campione immerso mentre per l'ITO dopo *grafting* è di 0.27 V, più vicino al valore di 0.059 V corrispondente alla massima reversibilità elettrodica, secondo l'equazione di Nernst (1.2). Inoltre, l'innalzamento dei picchi registrato per il campione che ha subito *grafting* può essere attribuito un aumento dell'area elettrodica attiva indicando che il materiale depositato sull'elettrodo è conduttivo. Il fatto che il diazonio fissato sulla superficie conduce è confermato anche dalle misure EIS: si può notare che la resistenza di polarizzazione dell'elettrodo, data dal diametro della semicirconfenza nel diagramma di Nyquist, diminuisce per l'elettrodo dopo immersione (11.33 k $\Omega$ ) rispetto all'elettrodo non modificato (13.83 k $\Omega$ ) ed è ancora più piccola (8.68 k $\Omega$ ) per l'elettrodo dopo *grafting*. Questo risultato è giustificabile dalla struttura della molecola di diazonio: l'anello benzenico, infatti, grazie all'alta densità di elettroni  $\pi$ , facilita il passaggio dell'elettrone dall'interfaccia con la soluzione all'elettrodo. Si può quindi assumere che la semplice immersione non è

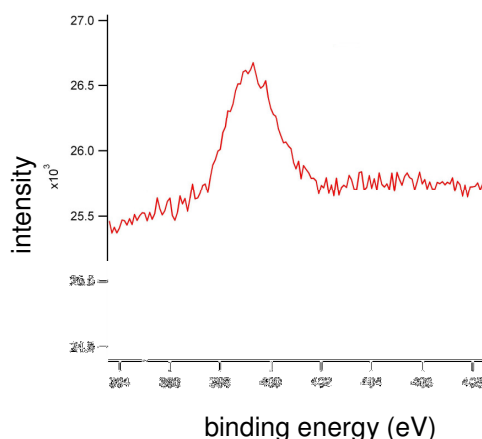
in grado di formare un SAM stabile sulla superficie dell'ITO. È pertanto necessario effettuare il *grafting* per legare covalentemente lo *spacer*.

In Figura 2.7 vengono riportate le curve di *grafting* relative a 4 campioni, effettuato a cicli  $-0.3 \div 0.5$  V con velocità di scansione  $50 \text{ mV s}^{-1}$  in soluzioni a concentrazioni diverse di HCl, rispettivamente 5, 50, 200 e 500 mM. Si può osservare che, a differenza dei campioni trattati con le prime due soluzioni, le CV corrispondenti alle concentrazioni di 200 e 500 mM di HCl presentano un picco di riduzione a  $-0.1$  V, che corrisponde alla riduzione dell'ammina in soluzione. Tuttavia, fra i due, solo il campione trattato a 200 mM non risulta corrosivo in seguito al *grafting*, come si è potuto verificare in seguito con un multimetro.



**Figura 2.7** Grafting effettuato a cicli di diazonio su ITO: 3 cicli  $-0.3 \div 0.5$  V con velocità di scansione  $50 \text{ mV s}^{-1}$  in soluzione 5 mM (blu), 50 mM (verde), 200 mM (rosso) e 500 mM (nero) di HCl. Il campione immerso nella soluzione più acida presenta etching completo, come rilevato successivamente mediante multimetro.

Si è quindi deciso di effettuare il *grafting* utilizzando soluzioni ad una concentrazione di 100 mM di HCl, intermedia ai valori di 50 mM e 200 mM, in modo da permettere la produzione di diazonio in soluzione senza però deteriorare la superficie di ITO. L'analisi XPS, effettuata su un elettrodo di ITO che ha subito *grafting* di diazonio a potenziale costante di  $-0.4$  V per 200 s in una soluzione 5 mM di *p*-fenilendiammina e 100 mM di HCl mostra una elevata presenza di specie contenenti azoto, rappresentata da un picco a 400 eV dovuto a N 1s (Figura 2.8).



**Figura 2.8** Analisi XPS per verificare la presenza di azoto su un campione di ITO con grafting di diazonio a  $-0.4$  V per 200'' in soluzione 100 mM di HCl. In ascissa viene rappresentata l'energia di legame, mentre l'ordinata riporta l'intensità del segnale rilevato dallo strumento, espressa in unità arbitrarie. I valori di energia prossimi a 400 eV corrispondono all'energia di legame di N 1s.

La presenza di azoto nel campione in analisi dimostra che effettivamente è stato realizzato un ricoprimento della superficie di ITO da parte del diazonio.

#### 1.2.1.7 2° step

Il secondo step per la realizzazione del biosensore prevede l'attacco della biotina allo *spacer*. L'elettrodo di ITO viene quindi bagnato con alcune gocce di biotina sulle quali si appoggia poi un coprivetrino, al fine di garantire un controllo diffusivo della biotina e allo stesso tempo di ostacolare l'evaporazione all'aria del liquido. Il campione viene lasciato riposare per 24 ore, in modo da dare il tempo alla biotina di legarsi al gruppo amminico  $-NH_2$  esposto sulla superficie dell'ITO: si ha la formazione di un legame ammidico tra ammina e carbossile libero della biotina. La presenza della piridina, una base forte, serve per facilitare la reazione di deprotonazione del carbossile.

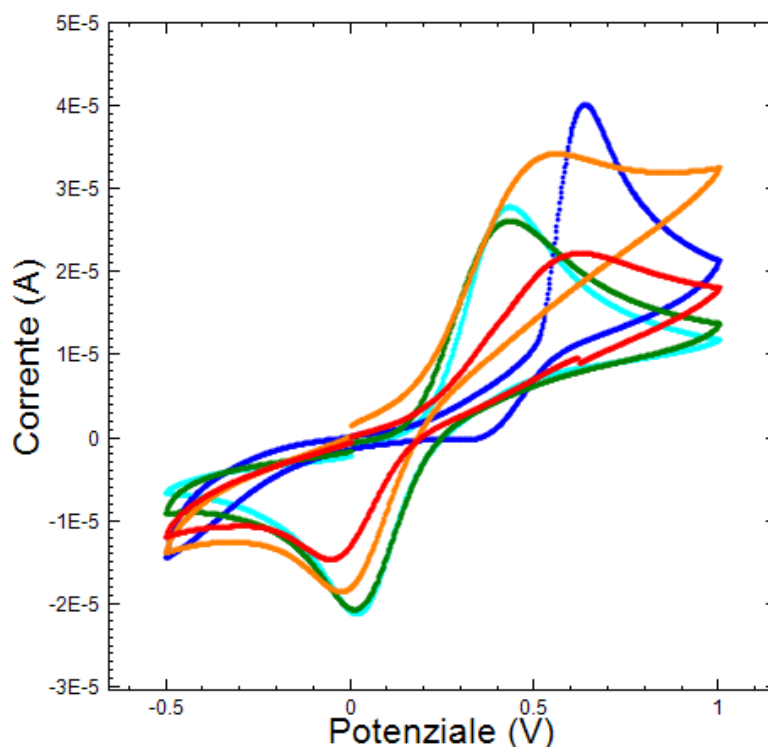
#### 1.2.1.8 3° step

Il terzo step è un esempio di *click chemistry*, (chimica ad incastro), in quanto prevede la formazione del legame biotina-avidina. Si tratta di uno dei legami non covalenti più forti presenti in natura ( $K_d = 10^{-15}$  M): ogni molecola di avidina può legare fino a 4 molecole di biotina contemporaneamente poiché l'avidina è una proteina tetramerica costituita da 4 subunità, ciascuna in grado di unirsi con una molecola di biotina. Si utilizza una soluzione di avidina in concentrazione  $0.02$  mg mL<sup>-1</sup> in PBS 1X che viene depositata a gocce sulla superficie dell'elettrodo, dopo un lavaggio accurato in DMSO e acqua milli-Q. Anche in questo caso si appoggia un coprivetrino per assicurare una

omogenea bagnatura della superficie attiva dell'elettrodo. Il campione viene lasciato a temperatura ambiente per 1 ora e quindi lavato con PBS 1X e acqua milli-Q.

#### 1.2.1.9 4° step

Infine, nel quarto step si fa avvenire l'attacco dell'enzima GOx, opportunamente legato alla biotina e purificato, in concentrazione di 1 mg/mL di soluzione PBS 1X. La procedura seguita prevede di appoggiare un coprivetrino sul liquido e lascia riposare per 1 ora. Successivamente viene effettuato un lavaggio finale con PBS 1X e acqua milli-Q. La Figura 2.9 riporta le CV effettuate dopo ogni step di trattamento dell'ITO, per un elettrodo che ha subito *grafting* a potenziale costante di -0.4 V per una durata di 200'' usando una soluzione acida a 100 mM di HCl: si è trovato, infatti, che questi valori corrispondono alle condizioni ottimali per la realizzazione di un buon *coating conduttivo* di diazonio sull'ITO.

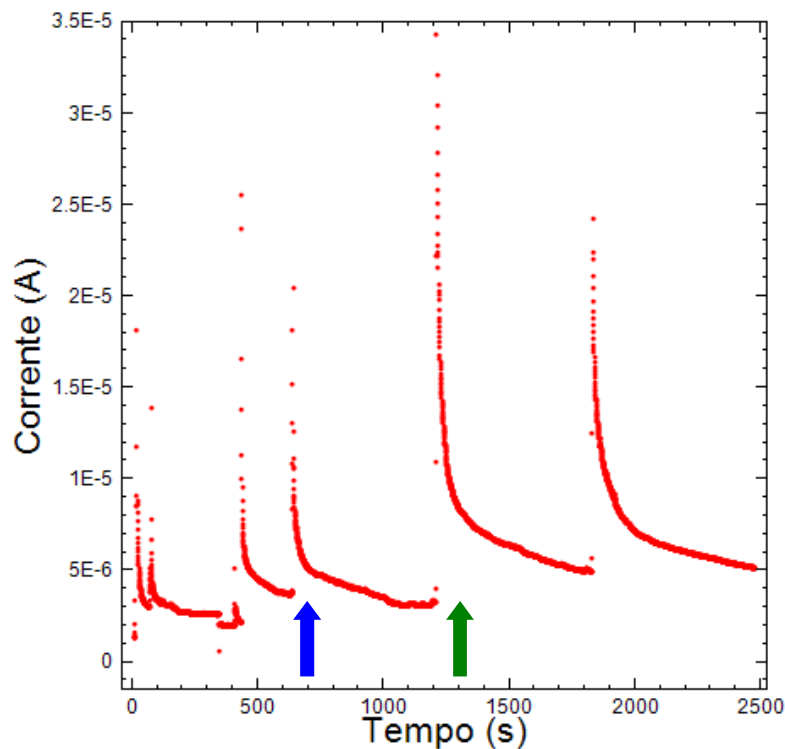


**Figura 2.9** *Grafting di diazonio e click chemistry su un elettrodo di ITO: CV in ferrocene del campione iniziale (curva celeste), dopo grafting di diazonio a -0.4 V per 200 s in soluzione 100 mM di HCl (curva blu), dopo biotina (curva verde), dopo avidina (curva arancione) e dopo GOx (curva rossa).*

Si può osservare che la curva finale relativa alla CV dopo l'attacco dell'enzima presenta un abbassamento dei picchi, ad indicare un progressivo ricoprimento della superficie dell'elettrodo: la scarica del ferrocene sull'elettrodo infatti viene ostacolata a causa

dell'ingombro sterico della catena di molecole presenti sulla superficie del sensore, riducendo l'area attiva dell'elettrodo.

il sensore così ottenuto è stato quindi testato mediante un'amperometria potenziostatica in PBS 1X. Allo scopo è stato applicato all'elettrodo lavorante di ITO modificato un potenziale di +0.7 V contro Ag/AgCl e sono state eseguite delle aggiunte di glucosio in modo da ottenere concentrazioni note nella soluzione presente nella cella elettrochimica.



**Figura 2.10** Amperometria potenziostatica per la misura della concentrazione di glucosio in PBS 1X: aggiunte di glucosio per ottenere una concentrazione 1mM a 700 s (freccia blu) e 3 mM a 1300 s (freccia verde). I picchi che si osservano nei primi 500 s e a 1800 s sono dovuti a mescolamenti meccanici della soluzione in cella elettrochimica.

In Figura 2.10 vengono riportati gli *step* di corrente in risposta a concentrazioni di 1 e 3 mM di glucosio: il biosensore riconosce effettivamente la presenza di glucosio in soluzione in quanto l'enzima GOx produce  $H_2O_2$  che si va a scaricare sull'elettrodo di ITO al potenziale di +0.7 V, confermando i dati ottenuti nei test preliminari con  $H_2O_2$  e riportati in Figura 2.1.

In base a questi risultati si può affermare che il procedimento proposto permette di ottenere un biosensore in grado di rilevare per via indiretta la presenza di glucosio. Tuttavia, in previsione di realizzare il biosensore all'interno di una piattaforma microfluidica, si è ritenuto opportuno valutare la possibilità di impiegare un diverso tipo

di *spacer* per evitare di incorrere nelle problematiche di corrosione che l'impiego dei sali di diazonio ha evidenziato.

### 2.2.2 Cisteammmina

In sostituzione del diazonio, per effettuare il primo step nella realizzazione del biosensore elettrochimico si è fatto impiego della cisteammmina  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{SH}$ , ammina con struttura lineare che presenta un gruppo tiolico  $-\text{SH}$  (Figura 2.11).

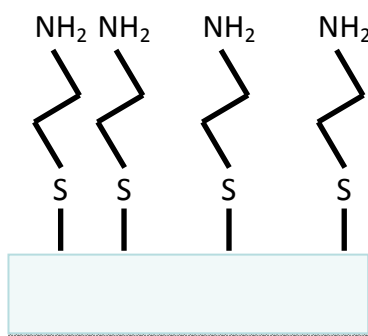


**Figura 2.11** Struttura della cisteammmina.

La cisteammmina, in concentrazione di 5 mM, è stata disciolta in acetonitrile  $\text{NC}-\text{CH}_3$ , solvente aprotico, ovvero la cui struttura molecolare non presenta un atomo di idrogeno dissociabile come ione  $\text{H}^+$ .

#### 2.2.2.1 1° step

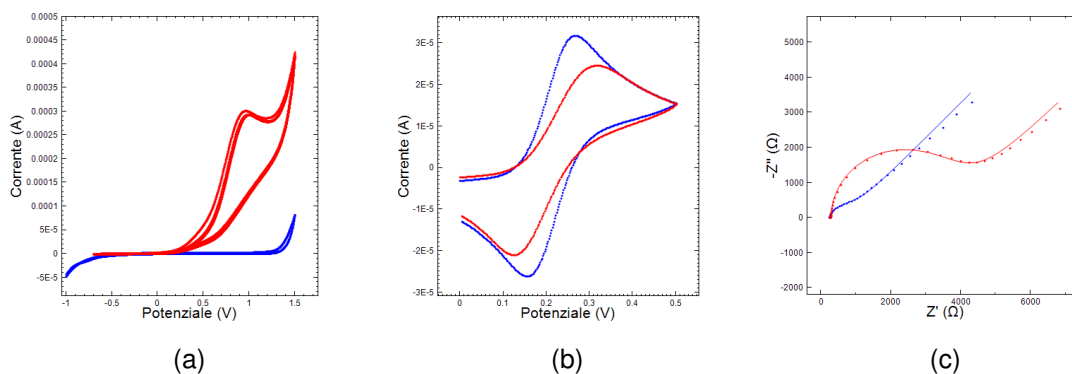
In seguito all'applicazione di un potenziale in cella elettrochimica, la cisteammmina in soluzione subisce una deprotonazione del gruppo tiolico e, ossidandosi, si scinde nello ione  $\text{H}^+$  e nello ione negativo  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{S}^-$ . Questo anione, a causa della reazione redox, va a legarsi covalentemente alla superficie di ITO, come mostrato in Figura 2.12.



**Figura 2.12** Formazione di uno strato cisteammminico sulla superficie dell'ITO.

Al fine di mantenere completamente deossigenata la soluzione di acetonitrile e cisteammmina e favorire quindi la deprotonazione del gruppo tiolico dell'ammina senza che questa, nel frattempo, possa legarsi con l'ossigeno eventualmente disciolto in soluzione, è stato fatto gorgogliare dell'argon  $\text{Ar}$  all'interno della soluzione a una pressione relativa di 0.5 bar, per 15 minuti, prima di effettuare il grafting.

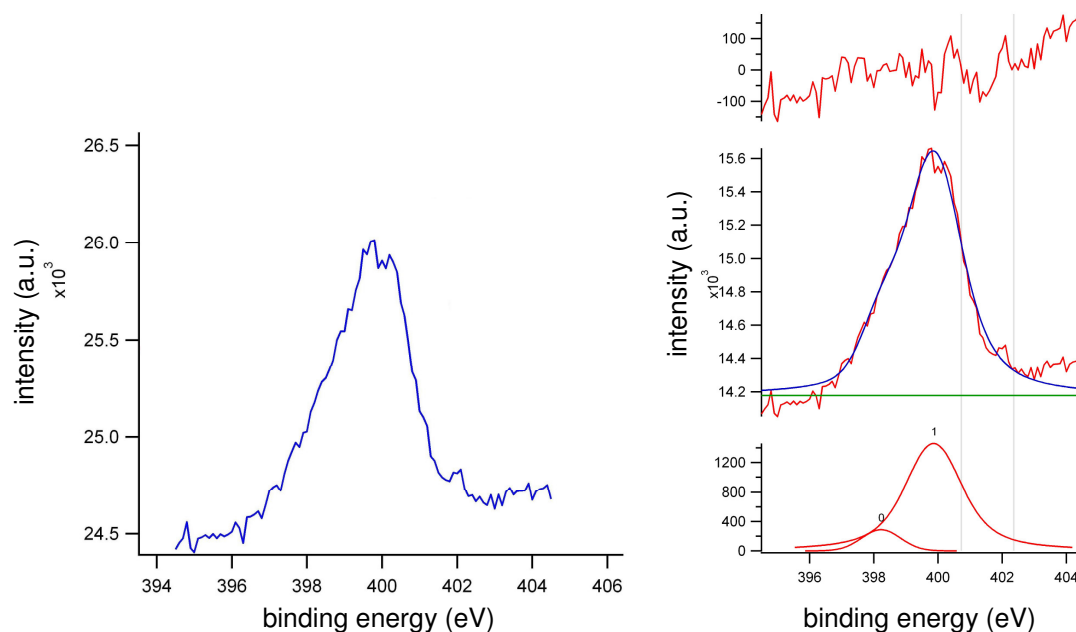
Anche per la cisteammina l'elettrografting può essere effettuato mediante l'applicazione di un potenziale costante oppure con una serie di cicli a potenziale applicato variabile. La Figura 2.13 riporta le misure elettrochimiche relative a un elettrodo di ITO modificato con *grafting* di cisteammina mediante potenziale applicato a cicli.



**Figura 2.13** (a) Grafting effettuato a cicli di cisteammina su ITO: 5 cicli  $-0.7 \div 1.5$  V con velocità di scansione  $100 \text{ mV s}^{-1}$  in soluzione  $5 \text{ mM}$  di cisteammina (la curva blu è riferita al solo elettrolita di supporto); (b) CV e (c) EIS in ferrocene, prima (curva blu) e dopo (curva rossa) il grafting.

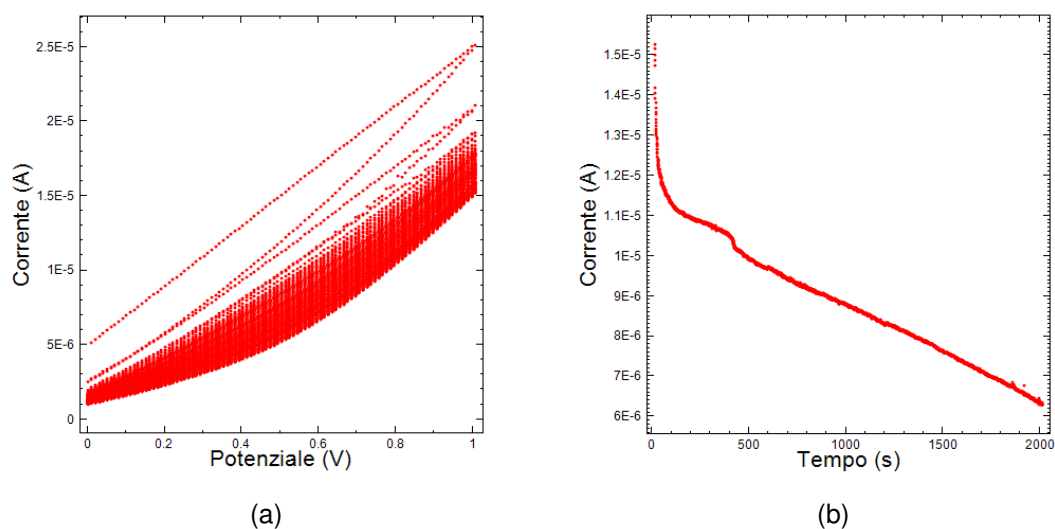
La curva di *grafting* (Figura 2.13a) manifesta un picco a 1 V, corrispondente all'ossidazione dell'ammina. Il controllo negativo invece è completamente piatto e non presenta picchi di ossidazione né di riduzione, eccezion fatta per la scarica del solvente agli estremi della finestra di potenziale. Sorprendentemente, si può osservare che in questo caso il comportamento è diverso da quello riscontrato per i sali di diazonio. Infatti il *grafting* di cisteammina causa un aumento della resistenza alla polarizzazione dell'elettrodo, in quanto i picchi di ossidazione e riduzione nella CV (Figura 2.13b) si allontanano tra loro e si abbassano rispetto al campione non trattato, così come il diagramma di Nyquist (Figura 2.13c) che mostra un allargamento del semicerchio. Questo risultato è giustificabile se si considera che il *layer* di cisteammina non è conduttivo, a differenza del diazonio, visto che non ci sono elettroni disponibili per la conduzione lungo la catena alifatica. Risultati analoghi si ritrovano variando il numero di cicli di *grafting*.

Per un campione di ITO sul quale è stato effettuato un *grafting* di cisteammina con potenziale applicato a cicli, la misura XPS mostra anche una spiccata presenza di specie azotate, come si vede dal picco a 400 eV dovuto a N 1s, (Figura 2.14). La deconvoluzione del segnale XPS mostra un picco predominante a 400 eV, relativo all'azoto amminico, e uno meno intenso, a 398 eV, corrispondente all'azoto dei nitruri presenti sulla superficie dell'ITO.



**Figura 2.14** Analisi XPS per verificare la presenza di azoto su un campione di ITO con grafting di cisteammina effettuato a cicli  $-0.7 \div 1.5$  V (a sinistra). I valori prossimi a 400 eV corrispondono all'energia di legame di N 1s. Viene riportata anche la deconvoluzione dei picchi di N (a destra): il picco a 400 eV corrisponde alle ammine, mentre quello a 398 eV è riferito ai residui di nitruri in superficie.

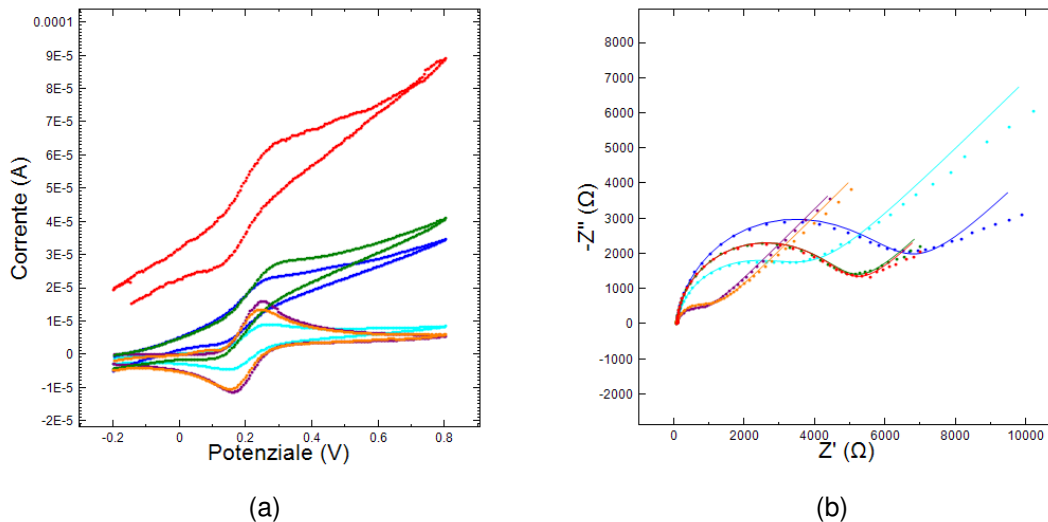
In Figura 2.15 vengono riportati i dati relativi alle due diverse modalità di *grafting* considerate di cisteammina su due diversi campioni di ITO: a sinistra il potenziale è variato a cicli da 0 a 1 V per 100 volte a una velocità di scansione di 100 mV/s, mentre a destra è mantenuto costante a 1 V per 2000 s, tempo equivalente per effettuare la prima misura.



**Figura 2.15** Grafting effettuato a cicli di cisteammina su ITO: (a) 100 cicli  $0 \div 1$  V con velocità di scansione  $100 \text{ mV s}^{-1}$  in soluzione 5 mM di cisteammina; (b) grafting di cisteammina su ITO effettuato a potenziale costante: 1 V per 2000 s in soluzione 5 mM di cisteammina..

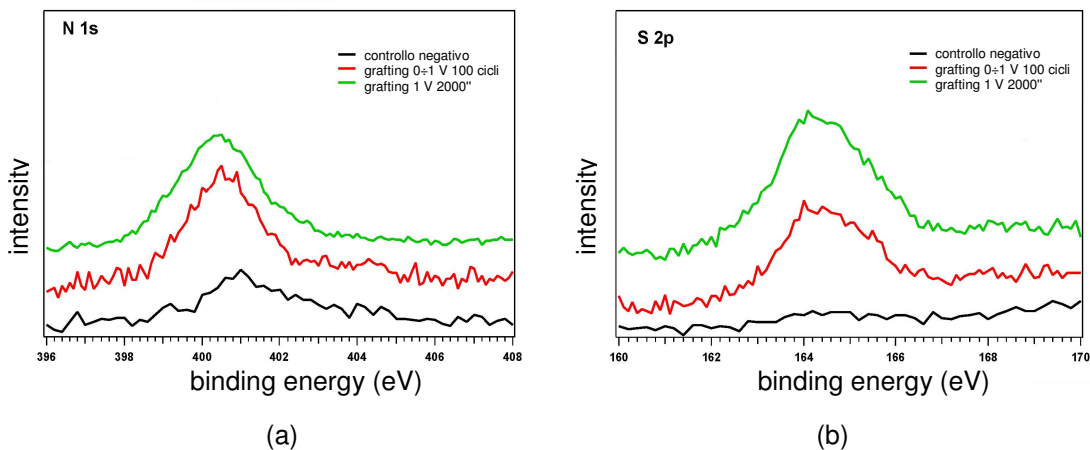


Le relative CV e EIS sono riportate in Figura 2.16: la sostanziale coincidenza dei risultati ottenuti con le due diverse tecniche non permette di individuare la metodologia sperimentale migliore per ottenere una modifica omogenea della superficie.



**Figura 2.16** CV (a) e EIS (b) in ferrocene di campioni con grafting di cisteamina 5 mM: a potenziale costante di 1 V per 2000 s prima (curva viola) e dopo (curva verde); a potenziale applicato 0÷1 V per 100 cicli prima (curva arancione) e dopo (curva rossa). Viene anche riportato il controllo negativo prima (curva celeste) e dopo (curva azzurra) grafting fittizio a 1 V per 2000 s in acetonitrile pura.

Una prova definitiva che i risultati migliori si ottengono con il metodo a potenziale costante viene data solamente dall'analisi XPS, condotta sui medesimi campioni (Figura 2.17).



**Figura 2.17** Analisi XPS per verificare la presenza di N e S su tre campioni di ITO modificati: con grafting di cisteamina a potenziale costante di 1 V per 2000 s (curva verde), con grafting di cisteamina a potenziale applicato 0÷1 V per 100 cicli (curva rossa), controllo negativo dopo grafting fittizio a 1 V per 2000 s in acetonitrile pura (curva nera). I picchi a 400 e a 164 eV sono dovuti rispettivamente a N 1s e a S 2p.

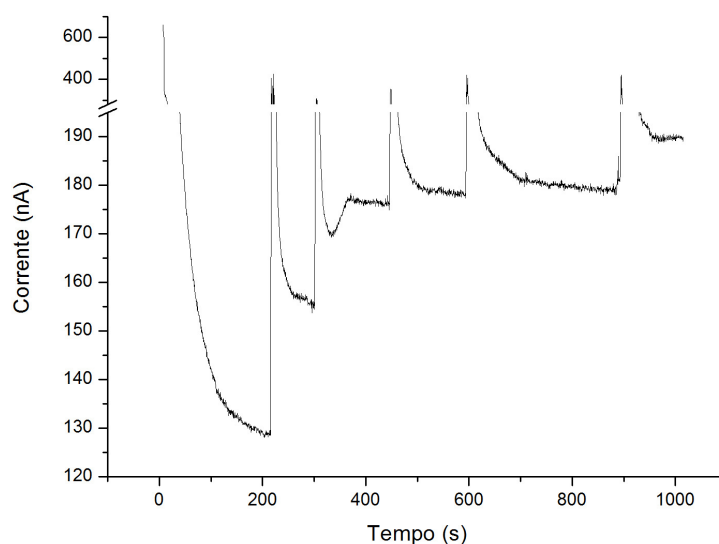
La presenza di N dell'ammina e di S del gruppo tiolico deprotonato risulta più accentuata nel campione che ha subito *grafting* a potenziale costante di 1 V per 2000 s. Infatti, l'intensità dei picchi a 400 eV e a 164 eV, relativi rispettivamente a N 1s e S 2p, sono più marcati nel campione di ITO trattato con *grafting* a potenziale costante.

Per queste ragioni, al fine di realizzare un grado superiore di *coating*, è stata scelta la tecnica di *grafting* a potenziale costante.

### 2.2.2.2 2° step e *click chemistry*

È quindi possibile procedere agli step successivi per la fabbricazione del biosensore.

Il procedimento è analogo a quello adottato per i campioni trattati con diazonio, salvo il fatto che l'elettrodo viene lavato con acetonitrile anziché con semplice acqua milli-Q.



**Figura 2.18** Amperometria potenziostatica a +0.7 V per la misura della concentrazione di glucosio in PBS 1X da parte di un biosensore con *grafting* di cisteammina 5 mM a potenziale costante di 1 V per 2000": aggiunte di glucosio per ottenere una concentrazione 1mM a 220 s, 2 mM a 300 s, 3 mM a 600 s, e 10 mM a 900". Il picco che si osserva a 450 s è dovuto a mescolamento meccanico della soluzione in cella elettrochimica.

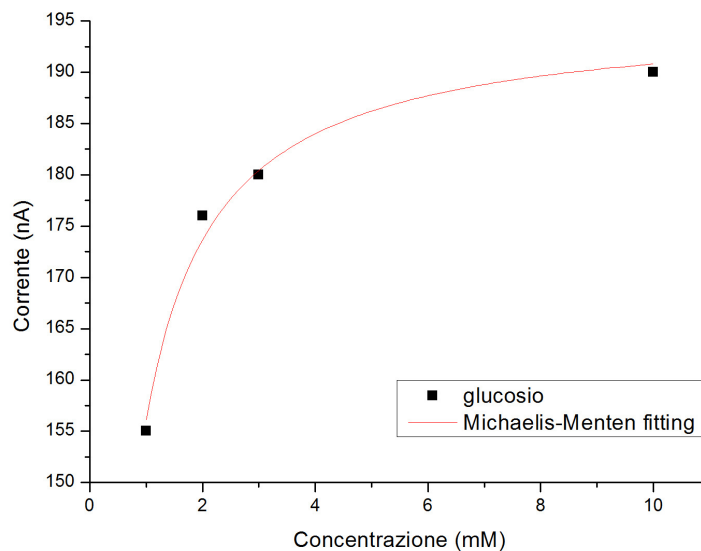
La Figura 2.18 mostra l'amperometria potenziostatica in PBS 1X per la verifica del funzionamento del biosensore ottenuto in seguito al *grafting* di cisteammina a potenziale costante di 1 V per 2000 s. La misura della corrente all'elettrodo viene effettuata applicando come sempre un potenziale di +0.7 V contro Ag/AgCl e praticando delle aggiunte di glucosio a concentrazioni note.

I valori d'intensità di corrente in funzione della concentrazione di glucosio, per il medesimo campione vengono diagrammati in Figura 2.19.

Risulta evidente come la correlazione tra le due grandezze è quella caratteristica della cinetica di reazione enzimatica descritta dal modello di Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \quad (2.4)$$

dove  $v$  è la velocità di reazione iniziale,  $[S]$  la concentrazione di substrato, in questo caso glucosio e  $K_M$  la costante di Michaelis-Menten. La curva esibisce un tratto lineare fino al valore di concentrazione limite pari a circa 2 mM. Per concentrazioni superiori l'enzima raggiunge la saturazione completa dei suoi siti attivi e la reazione enzimatica si arresta; in queste condizioni il valore massimo di corrente prodotta si assesta su un valore massimo e diventa indipendente dalla quantità di glucosio presente in soluzione.



**Figura 2.19** Curva di taratura per il glucosio da parte di un biosensore con grafting di cisteamina 5 mM a potenziale costante di 1 V per 2000 s e fitting con il modello di Michaelis-Menten.

In base a questi risultati, si può affermare che un siffatto biosensore elettrochimico è potenzialmente implementabile su scala microfluidica. L'impiego della cisteamina come *spacer* del biosensore presenta numerosi vantaggi rispetto al diazonio: la soluzione non corrosiva della cisteamina permette di eseguire dei *grafting* anche per tempi lunghi, in modo da aumentare l'efficienza del ricoprimento della superficie di ITO, senza peraltro correre il rischio di danneggiare l'elettrodo stesso.

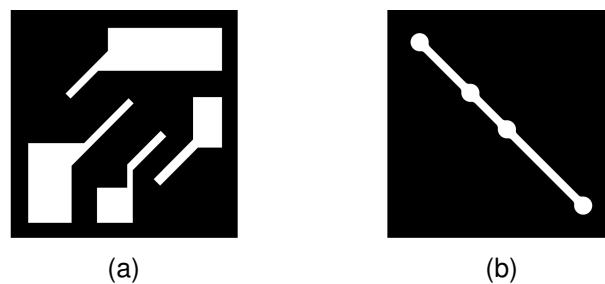
## 2.3 Realizzazione del biosensore in un sistema microfluidico

In questa sezione vengono descritti i risultati ottenuti su microscala, in seguito alla realizzazione e caratterizzazione di un biosensore elettrochimico integrato in una piattaforma microfluidica.

### 2.3.1 Chip microfluidico

La costruzione del biosensore microfluidico avviene in una serie di fasi diverse.

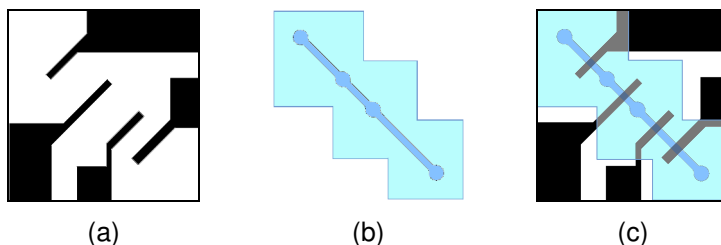
Come mostrato nel §1.1, per prima cosa è necessario ottenere, mediante fotolitografia, il circuito di ITO su supporto di vetro. In Figura 2.20a è riportata la fotomaschera che permette di stampare un circuito elettrico con quattro differenti elettrodi. Il vetrino ha forma quadrata, di lato 2.5 cm. La scelta di progettare un circuito con quattro elettrodi deriva dalla possibilità di avere due elettrodi lavoranti all'interno dello stesso *chip* microfluidico. In questo modo si può assegnare a uno dei due la funzione di controllo negativo per valutare la specificità della superficie elettrodica durante i vari *step* della realizzazione del biosensore. In alternativa è possibile modificare il secondo elettrodo lavorante per utilizzarlo come un secondo sensore per la misurazione di una diversa specie chimica presente in soluzione. In questo modo si possono controllare due distinti parametri biologici con il medesimo *chip* microfluidico.



**Figura 2.20** Fotomaschere per la realizzazione del chip microfluidico: a) fotomaschera per il circuito di ITO su vetro; b) fotomaschera per lo strato superiore in PDMS del chip. Le immagini sono in dimensione reale.

La fotomaschera utilizzata per realizzare lo strato superiore di PDMS di 7 mm è riportata in Figura 2.20b. Per mezzo di essa si fabbrica uno stampo su wafer di silicio che permette di ottenere, con la tecnica della soft-litografia, il PDMS di copertura del *chip*. L'elemento in silicene che si ottiene ha anch'esso una sezione quadrata di lato 2.5 cm e presenta, sulla superficie inferiore, un canale disposto diagonalmente in modo da attraversare perpendicolarmente gli elettrodi del circuito. Una volta effettuato l'accoppiamento tra il circuito di ITO e la porzione superiore di silicene, il canale risulta essere largo 1 mm e alto 100  $\mu\text{m}$ .

In Figura 2.21a viene rappresentato il circuito di ITO su vetro, mentre in Figura 2.21b viene mostrata la forma finale del PDMS, ottenuta in seguito a sagomatura e foratura manuale.



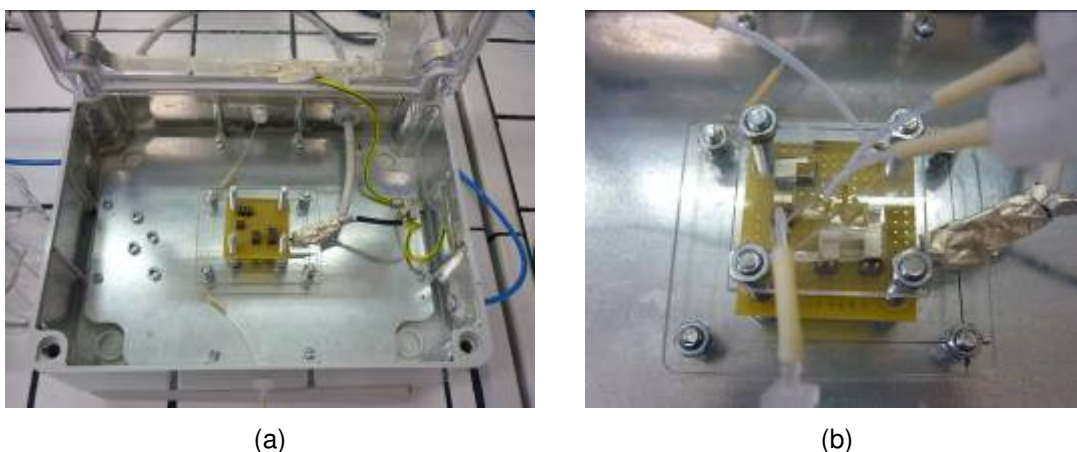
**Figura 2.21** Chip microfluidico: a) circuito di ITO su vetro di forma quadrata 2.5 cm x 2.5 cm; b) sagoma del PDMS con il canale nella superficie inferiore; c) chip microfluidico.

In Figura 2.21c si può osservare il *chip* microfluidico completo, ottenuto unendo irreversibilmente tra loro le due parti in vetro e in silicone mediante trattamento a UV-ozono *cleaner* per 30 minuti e successiva pressatura su piastra riscaldante a 100°C per ulteriori 30 minuti.

### 2.3.2 Sistema di alloggiamento del chip

Per l'alloggiamento del *chip* viene realizzato un sistema di contenimento con coperchio progettato e costruito *ad hoc* per rispondere a specifiche esigenze.

In primo luogo è necessario assicurare un sostegno al *microchip*. Questo è realizzato mediante dei supporti in plexiglas.



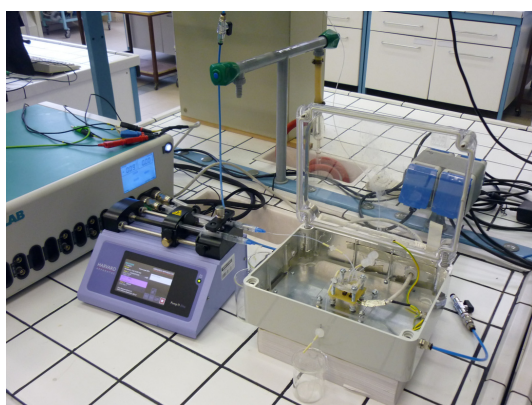
**Figura 2.22** Sistema di alloggiamento del chip microfluidico: a) contenitore con coperchio: si possono notare la sede per il chip provvista di contatti elettrici a molla e fissata con viti e bulloni alla lastra di plexiglas sottostante ancorata al basamento metallico, i cavi elettrici in uscita dalla sede del chip, i cavi per l'isolamento elettrico del sistema, i tubi blu per l'entrata e l'uscita del gas, i tubi microfluidici per lo spostamento dei reagenti liquidi; b) particolare del chip fissato nella sua sede e con i tubi microfluidici inseriti.

Come si può osservare in Figura 2.22a e nel dettaglio riportato in Figura 2.22b, il *chip* è appoggiato sopra una base isolante che presenta dei contatti elettrici a molla opportunamente disposti: i 4 elettrodi di ITO ricevono il segnale elettrico attraverso i contatti elettrici per mezzo di una pellicola metallica conduttiva applicata sulla superficie esposta degli elettrodi e adeguatamente ripiegata sulla superficie inferiore del *chip*. Nella parte sottostante della base sono realizzati i collegamenti elettrici con il sistema di alimentazione e di rilevazione del segnale (galvanostato-potenziostato). La posizione del *chip* viene mantenuta solidale rispetto ai contatti elettrici presenti sulla base per mezzo di una copertura piana di plexiglas, fissata al sistema con delle viti e dei bulloni. Si può anche osservare che le pareti del contenitore sono dotate di due fori per il passaggio dei tubi microfluidici, in modo da permettere il flusso dei reagenti liquidi anche quando il coperchio del contenitore è chiuso.

In secondo luogo, dovendo operare in atmosfera controllata, tutto il sistema di alloggiamento del *chip* è contenuto in un apparato a tenuta di gas munito, come si può notare in Figura 2.22°, di condotti per l'ingresso e l'uscita di argon.

Infine, il sistema è attrezzato internamente con delle sottili lastre e dei rivestimenti metallici muniti di messa a terra, in modo da costituire una gabbia di Faraday per isolare il *chip* da radiazioni elettromagnetiche esterne. Il sistema così realizzato è in grado di garantire una buona protezione entro un campo di frequenze compreso tra 0.1 e 20000 Hz.

L'impianto sperimentale si completa con il potenziostato-galvanostato e la pompa a siringa, entrambi collegati al sistema di alloggiamento del *chip*, come mostrato in Figura 2.23a.



(a)



(b)

**Figura 2.23** Impianto sperimentale: a) potenziostato e pompa a siringa collegati al sistema di alloggiamento del *chip* microfluidico; b) sistema miscelato per la deossigenazione della cisteammina.

La Figura 2.23b illustra il sistema di deossigenazione della cisteammina, provvisto di tubazioni flessibili per il trasporto e il gorgogliamento dell'argon nella soluzione 5 mM di cisteammina in acetonitrile, mantenuta miscelata per mezzo di un agitatore magnetico. I gas in uscita vengono convogliati all'interno del sistema di alloggiamento del *chip*, in modo da realizzare al suo interno un'atmosfera controllata povera di ossigeno. La cisteammina viene prelevata dal serbatoio mediante un tubo microfluidico collegabile al *chip*.

Si può notare che il contenitore della cisteammina è posto ad una quota sopraelevata rispetto al piano di lavoro, in modo da formare un battente di liquido in ingresso al *chip* stesso: come verrà spiegato in seguito, si adotta questo accorgimento per evitare l'instaurarsi di sottopressioni all'interno del *chip*, causate dalla pompa a valle configurata in modalità aspirazione.

### 2.3.3 Realizzazione e caratterizzazione elettrochimica del biosensore

Dopo aver posizionato il *chip* all'interno della sua sede, si provvede a collegarlo alla pompa a siringa, impostata in modalità infusione, mediante appositi tubi microfluidici e si effettua una prova preliminare di tenuta idraulica, con acqua milli-Q. Prove condotte al variare della portata hanno permesso di evidenziare che si possono trattare portate fino a  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  per tempi prolungati, senza che il *chip* subisca danneggiamenti o si verifichino perdite di liquido. I risultati ottenuti confermano la validità del trattamento a UV-ozono *cleaner* adottato per realizzare una buona adesione tra il PDMS e l'ITO.

Il *chip* viene quindi collegato al potenziostato in maniera da assegnare a ciascuno dei 4 elettrodi un ruolo ben preciso: un elettrodo diventa il lavorante, un secondo il contro elettrodo, un terzo il riferimento e infine l'ultimo viene lasciato come elettrodo per il controllo negativo o come secondo lavorante.

Prima di procedere con il *grafting* di cisteammina, si esegue una caratterizzazione elettrochimica dell'elettrodo lavorante utilizzando ferrocene come specie redox di riferimento.

Quindi si collega il *chip* alla pompa posizionata a valle rispetto alla direzione del flusso mentre, a monte, si connette il tubo per l'ingresso della cisteammina degasata. terminate queste operazioni si chiude il coperchio del sistema di alloggiamento del *chip*. L'area bagnata dell'elettrodo lavorante è pari a  $1 \text{ mm}^2$  e il volume di liquido che in ogni momento si trova sopra l'elettrodo è di  $1 \text{ mm}^3$ : al fine di garantire un sufficiente ricambio di liquido a contatto con l'elettrodo e quindi assicurare un continuo apporto di reagente, si opera in flusso, con una portata tale da permettere alla specie chimica di diffondere verso la superficie dell'elettrodo.

Per una qualsiasi specie in soluzione, il tempo caratteristico di diffusione  $t$  è calcolabile secondo la seguente relazione:

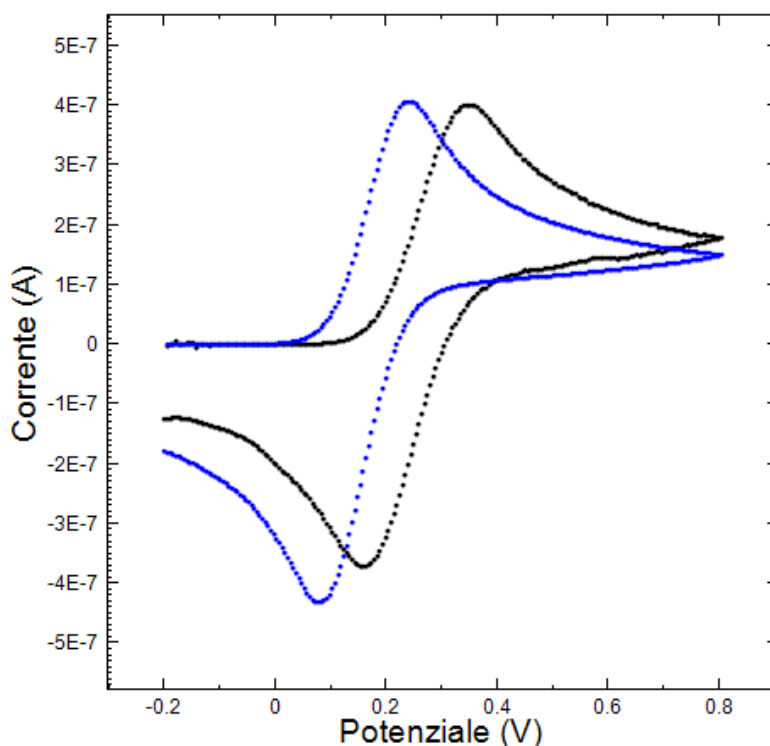
$$t = \frac{L^2}{\mathcal{D}} \quad , \quad (2.5)$$

dove  $\mathcal{D}$  rappresenta il coefficiente di diffusione della specie e  $L$  è la lunghezza caratteristica del sistema.

Per la cisteamina,  $\mathcal{D}$  è pari a  $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ : assegnando a  $L$  il valore dell'altezza del canale microfluidico ( $10^{-2} \text{ cm}$ ), si ottiene un tempo di diffusione di 10 s. Imponendo un uguale tempo di permanenza del liquido nel volume sovrastante la superficie dell'elettrodo, si ottiene una portata di  $0.6 \mu\text{L min}^{-1}$ . Il *grafting* di cisteamina viene effettuato applicando un potenziale costante di 1 V all'elettrodo lavorante e, allo stesso tempo, azionando la pompa in aspirazione con una portata di  $0.6 \mu\text{L min}^{-1}$ , per un tempo di trattamento complessivo di 2000 s. Al termine si effettua un doppio lavaggio con acetonitrile e acqua milli-Q, ciascuno a una portata di  $100 \mu\text{L min}^{-1}$ , per 1 minuto.

Al termine della fase di *grafting*, il comportamento dell'elettrodo modificato viene analizzato utilizzando la voltammetria ciclica.

La Figura 2.24 riporta in blu la voltammetria ciclica dell'elettrodo lavorante all'interno del *chip* microfluidico allo stato iniziale e in nero la curva che si ottiene dopo il *grafting*.

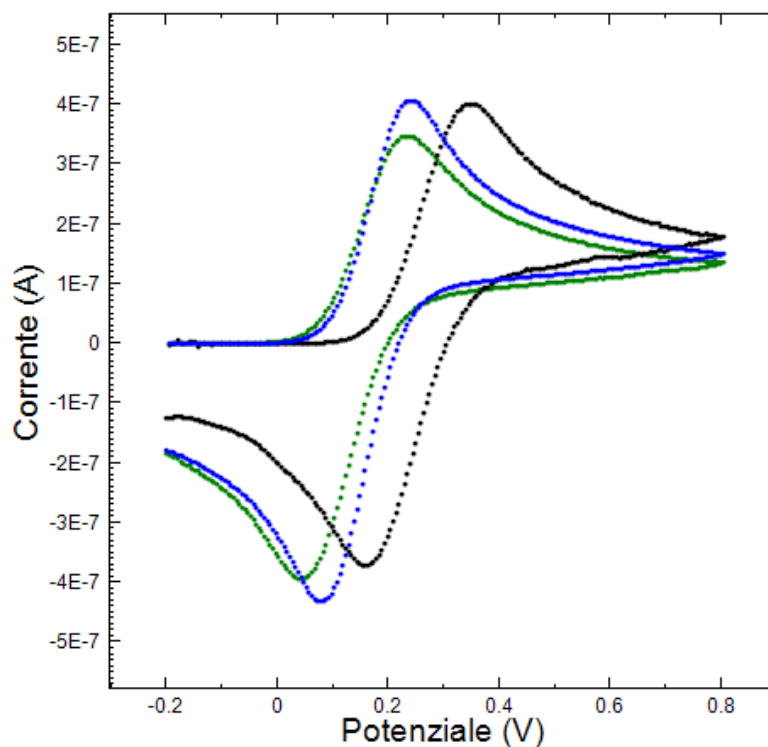


**Figura 2.24** Voltammetria ciclica dell'elettrodo lavorante nel chip microfluidico: elettrodo iniziale (curva blu) e dopo il *grafting* di cisteamina (curva nera).



Si può notare che in questo secondo caso l'altezza dei picchi diminuisce, a causa della maggiore resistenza al trasferimento di carica sulla superficie dell'elettrodo.

La traslazione di entrambi i picchi verso potenziali più alti non ha un significato diretto sulle caratteristiche dell'elettrodo lavorante, piuttosto è da ascrivere a un possibile sporcamento aspecifico della superficie dell'elettrodo di riferimento all'interno del *chip*. Il secondo *step* per la realizzazione del biosensore microfluidico consiste nell'effettuare l'attacco della biotina al gruppo amminico libero della cisteammina. Considerando per la biotina un coefficiente di diffusione  $\mathcal{D}$  pari a  $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , si calcola, mediante la (2.5), che il tempo di diffusione per questa specie nel sistema in esame è di circa 20 s. Convertendo la pompa in modalità infusione e collegandola a monte del *chip* microfluidico, si effettuano 20 cicli di iniezione di biotina all'interno del canale del *chip*, intervallati da un *delay time* pari al tempo di diffusione. In tal modo si realizzano condizioni di lavoro che favoriscono l'attacco della biotina sulla superficie elettrodica, incrementando la resa dello *step*.



**Figura 2.25** Voltammetria ciclica dell'elettrodo lavorante nel *chip* microfluidico: elettrodo iniziale (curva blu), dopo il grafting di cisteammina (curva nera) e dopo lo *step* di biotina (curva verde).

Per proteggere il secondo elettrodo lavorante del *chip*, in questa fase si realizzano condizioni di polarizzazione sullo stesso elettrodo, in modo da sfruttare le proprietà del punto di carica zero (PZC) come descritto nel §1.2.1.5. Si provoca così un'induzione di cariche sulla superficie dell'elettrodo che si vuole proteggere, con il risultato di inibire,

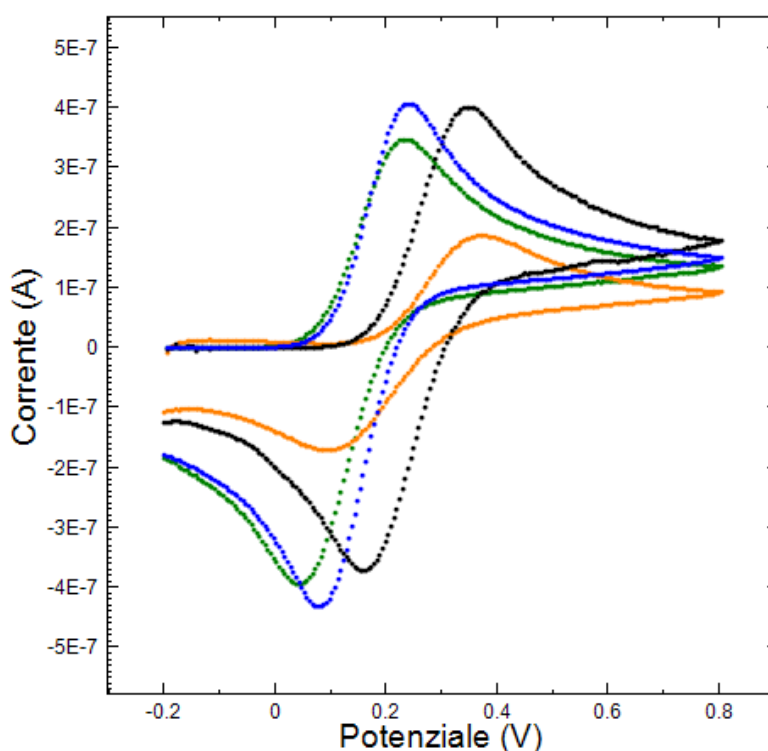
a causa della repulsione elettrostatica, la deposizione aspecifica di specie chimiche elettroattive. Il potenziale applicato al secondo elettrodo lavorante, per tutta la durata dello *step* di trattamento con biotina, è di -0.6 V.

La Figura 2.25 estende i risultati di Figura 2.24 alla CV dell'elettrodo modificato dopo il secondo *step* (curva verde).

L'analisi voltammetrica viene eseguita dopo aver effettuato un lavaggio dell'elettrodo prima con dimetilsulfossido e poi con acqua milli-Q, entrambi a una portata di  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  per 1 minuto.

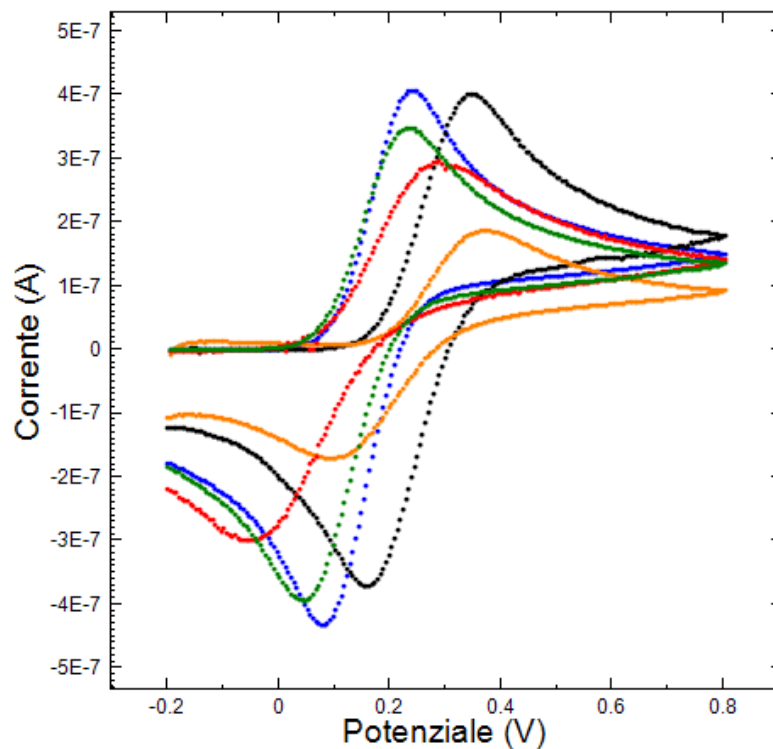
Si può osservare che entrambi i picchi di riduzione e ossidazione del tracciante redox ritornano nella stessa posizione assoluta ottenuta per l'elettrodo non modificato, confermando che lo spostamento precedente non era dovuto a un fenomeno specifico ma alla presenza di un deposito sulla superficie dell'elettrodo di riferimento, che nella fase successiva è stato rimosso.

Inoltre, come previsto, l'altezza dei picchi risulta ulteriormente inferiore rispetto a quella delle due curve precedenti, indicando una maggiore resistenza al trasferimento di carica sull'elettrodo modificato, man mano che si procede con la costruzione del sensore sulla superficie di ITO.



**Figura 2.26** Voltammetria ciclica dell'elettrodo lavorante nel chip microfluidico: elettrodo iniziale (curva blu), dopo il grafting di cisteamina (curva nera), dopo lo *step* di biotina (curva verde) e dopo lo *step* di avidina (curva arancione).

Il terzo *step*, che si realizza mediante l'introduzione dell'avidina nel sistema, viene condotto in maniera simile al precedente. In questo caso il coefficiente di diffusione  $\mathcal{D}$  vale  $5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  e il tempo caratteristico risulta pari a circa 3 minuti. Di conseguenza, la pompa viene programmata per compiere dei cicli di infusione intervallati da tempi di attesa di 3 minuti, per 5 volte consecutive, al fine di massimizzare la resa del trattamento. Questa volta il potenziale applicato per proteggere il secondo elettrodo lavorante è pari a +0.6 V. Terminato il trattamento, si effettua una pulizia dell'elettrodo iniettando PBS 1X e acqua milli-Q a una portata di  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  per 1 minuto ciascuno. In Figura 2.26 viene riportata, in arancione, la CV dopo questo *step*: si osserva un ulteriore e marcato abbassamento dei picchi di ossidazione e riduzione del ferrocene, a testimonianza di un aumento della resistenza al trasferimento di carica offerta dall'ulteriore strato depositato.



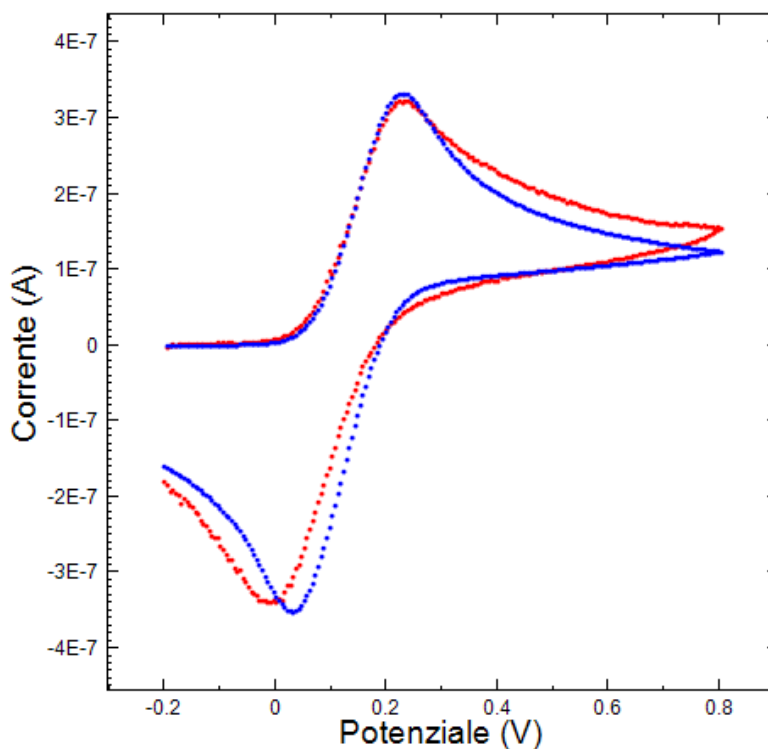
**Figura 2.27** Voltammetria ciclica dell'elettrodo lavorante nel chip microfluidico: elettrodo iniziale (curva blu), dopo il grafting di cisteamina (curva nera), dopo lo step di biotina (curva verde), dopo lo step di avidina (curva arancione) e dopo lo step finale di GOx (curva rossa).

Il quarto e ultimo *step* per la realizzazione del biosensore microfluidico prevede l'attacco all'avidina dell'enzima GOx biotinilato: si stima in questo caso un coefficiente di diffusione  $\mathcal{D}$  pari a  $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ : il tempo necessario all'enzima per diffondere fino alla superficie dell'elettrodo è dell'ordine di 10 minuti. Vengono quindi effettuati 5 cicli di infusione, intervallati da 10 minuti nei quali il fluido è stagnante nel sistema

microfluidico. La protezione dell'elettrodo per il controllo negativo viene effettuata applicando un potenziale costante di  $-0.6$  V. Una volta completato questo ultimo *step*, si effettua una pulizia finale con PBS 1X e acqua milli-Q, nelle medesime condizioni operative di prima. La CV finale dell'elettrodo dopo il trattamento con GOx è rappresentata in Figura 2.27 (curva rossa).

Si osserva che, dopo l'ultimo *step*, avviene un allontanamento dei picchi di ossidazione e riduzione, ad indicare una perdita di reversibilità del tracciante nell'elettrolita. Il confronto tra la CV registrata prima di iniziare il trattamento di modifica della superficie elettrodica (curva blu) e la CV finale (curva rossa) evidenzia come il deposito sulla superficie rallenti il trasferimento di carica.

La verifica che il secondo elettrodo lavorante non ha subito modifiche nel corso dei precedenti *step* viene mostrata in Figura 2.28, nella quale, per chiarezza grafica, vengono riportate solamente la CV iniziale e finale dell'elettrodo avente funzione di controllo negativo. Si osserva che le due curve sono pressoché identiche, confermando l'efficacia del procedimento di polarizzazione adottato per proteggere il secondo elettrodo durante la fase di preparazione del primo.



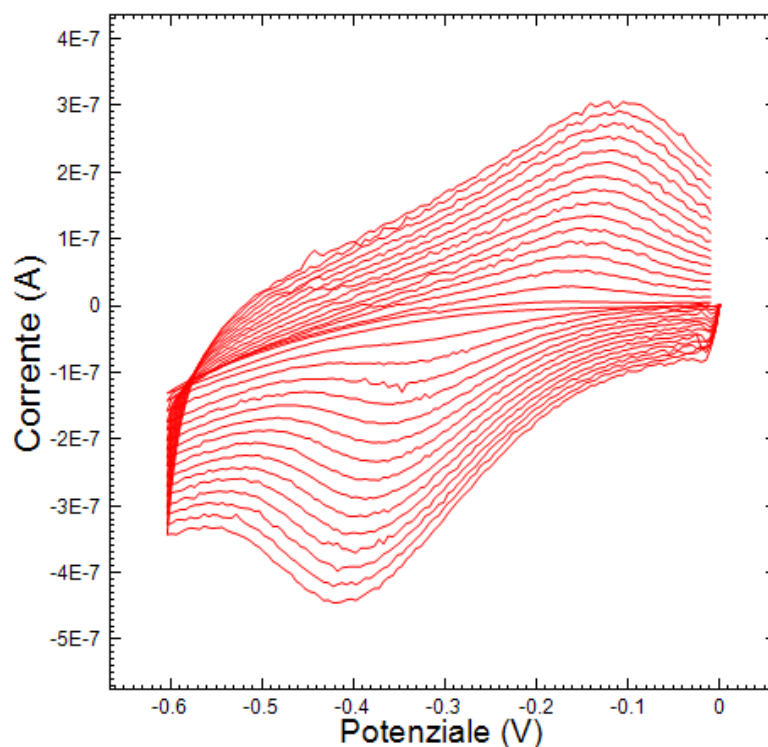
**Figura 2.28** Voltammetria ciclica del secondo elettrodo lavorante nel chip microfluidico, avente la funzione di controllo negativo: elettrodo iniziale (curva blu) e dopo lo *step* finale di GOx (curva rossa). Si osserva che i due tracciati sono quasi sovrapponibili, dimostrando l'efficacia della protezione dell'elettrodo mediante la tecnica del potenziale di carica zero.

Tale risultato non solo permette in questa fase dello studio di poter disporre all'interno dello stesso *chip* di un "elettrodo di controllo", ma offre notevoli potenzialità per lo sviluppo di biosensori multiparametrici.

### 2.3.4 Verifica di funzionamento del biosensore

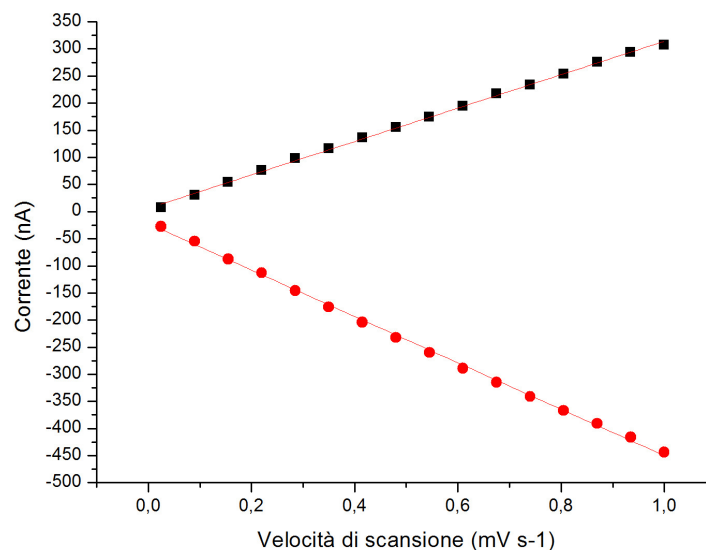
Il lavoro svolto si completa con un'indagine volta ad accertare l'effettiva presenza dell'enzima glucosidasi ancorato stabilmente all'elettrodo e con la verifica del funzionamento del biosensore realizzato.

In primo luogo sull'elettrodo modificato viene effettuata una serie di CV consecutive in PBS 1X, con velocità di scansione di potenziale crescenti (da 0.025 a 1 V s<sup>-1</sup>, con incrementi di 65 mV s<sup>-1</sup> a ogni successiva CV, per un totale di 16 CV). Il range di potenziale applicato va da -0.6 a 0 V, poiché all'interno di questa finestra di valori avviene l'ossidazione e la riduzione del FAD, il coenzima della GOx. I risultati sono rappresentati in Figura 2.29. La presenza di picchi di ossidazione e riduzione del FAD, riscontrabili rispettivamente a -0.1 e a -0.4 V, conferma la presenza dell'enzima GOx sulla superficie elettrodica.



**Figura 2.29** Voltammetrie cicliche effettuate a velocità di scansione diverse, per lo studio della presenza di enzima GOx sulla superficie elettrodica. Le curve più interne sono ottenute a basse velocità di scansione. I picchi in anodica e in catodica corrispondono rispettivamente all'ossidazione e alla riduzione del coenzima FAD.

Inoltre, se si considera l'altezza dei picchi delle CV relative a velocità di scansione diverse, si osserva che l'intensità di corrente corrispondente a ciascun picco è linearmente proporzionale alla velocità di scansione, come evidenziato in Figura 2.30. In accordo con l'equazione di Randles-Sevcik (1.16), si può quindi affermare che l'enzima GOx è effettivamente legato stabilmente all'elettrodo. Si stima che l'altezza dell'"albero" di elementi che costituiscono il biosensore sulla superficie dell'elettrodo di ITO sia pari o inferiore a 9 nm.



**Figura 2.30** Posizione dei picchi di ossidazione (in nero) e di riduzione (in rosso) del FAD ottenuti a diverse velocità di scansione di potenziale: si osserva una relazione lineare tra le due grandezze pertanto è possibile affermare, in accordo con l'equazione di Randles-Sevcik, che la GOx è effettivamente adsorbita irreversibilmente sul biosensore elettrochimico e che la reazione all'elettrodo è un processo confinato all'interfaccia.

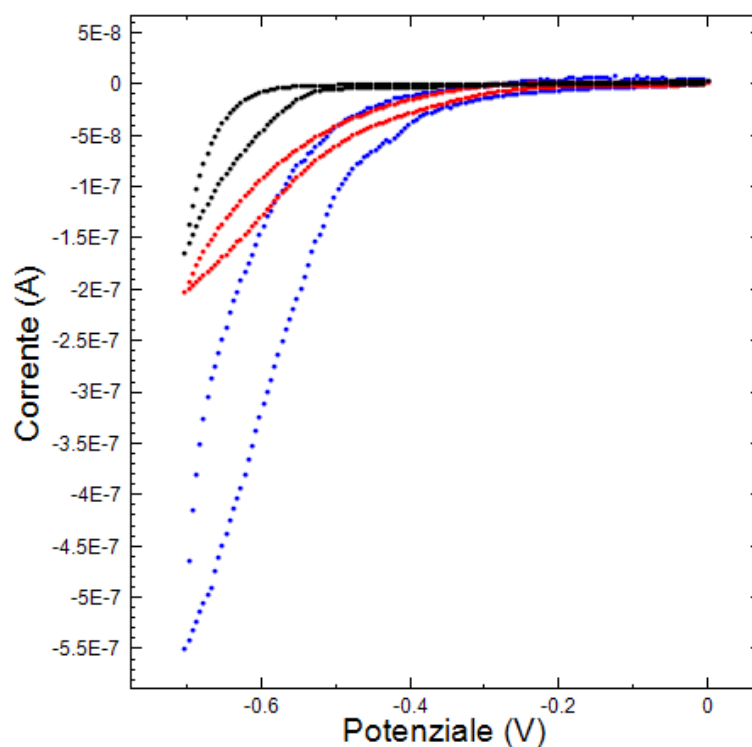
La funzionalità del biosensore così ottenuto viene verificata valutando la capacità di ossidazione del glucosio in soluzione da parte dell'enzima. Allo scopo, si effettua un'amperometria potenziostatica a +0.7 V in modo analogo a quanto descritto nel §2.2.2.2. A differenza del caso precedente, si rileva una risposta in corrente apprezzabile solo impiegando concentrazioni molto elevate di glucosio (maggiori o uguali a 10 mM), che forniscono misurazioni oltre il segnale di fondo di 4÷5 nA. La ridotta sensibilità manifestata dal biosensore può essere attribuita a una limitata attività dell'enzima. In questo caso, infatti, le dimensioni del canale microfluidico condizionano la superficie dell'elettrodo realizzabile con la tecnica *bottom-up*, limitando il numero di unità enzimatiche adsorbite.

A ulteriore conferma che il biosensore elettrochimico realizzato è effettivamente in grado di rilevare il glucosio in soluzione, viene studiato il comportamento dell'elettrodo modificato in presenza o meno di ossigeno. La Figura 2.31 riporta il tracciato di 3 CV,

effettuate per potenziali compresi tra -0.7 e 0 V e ottenute nelle seguenti condizioni operative:

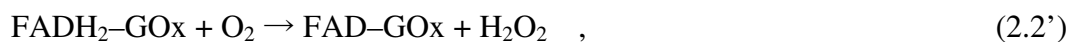
- curva blu: è ottenuta in presenza del solo elettrolita di supporto, PBS 1X, mantenuto in condizioni normali di aerazione;
- curva nera: è relativa alla CV che si ricava quando l'elettrolita di supporto è completamente deossigenato;
- curva rossa: si riferisce al biosensore immerso nell'elettrolita di supporto normalmente aerato e con l'aggiunta di glucosio 10 mM.

Si nota che quest'ultima misura presenta un tracciato che si interpone tra gli altri due, avvicinandosi maggiormente alle condizioni di anossia.



**Figura 2.31** Analisi dell'attività catalitica dell'elettrodo nel chip microfluidico, effettuata mediante voltammetria ciclica dell'elettrodo lavorante modificato: elettrodo in presenza di solo elettrolita di supporto (curva blu), elettrodo in presenza di solo elettrolita di supporto previa deossigenazione (curva nera), elettrodo in presenza di glucosio 10 mM nell'elettrolita di supporto (curva rossa).

Per analizzare questo comportamento, si considera il meccanismo proposto in letteratura per spiegare il funzionamento dell'enzima glucosidasi (2.1, 2.2), che può essere riscritto, secondo quanto suggerito da Wu *et al.* (2009), come:



Si osserva che la forma ridotta  $\text{FADH}_2$  si ossida a  $\text{FAD}$  solamente in presenza di ossigeno, che viene così consumato dalla soluzione: se in soluzione è presente del glucosio, la forma ossidata  $\text{FAD}$  può ridursi e ritornare  $\text{FADH}_2$ , ossidando nel frattempo il glucosio. La presenza di  $\text{O}_2$  in soluzione è quindi una condizione necessaria affinché avvenga l'ossidazione del glucosio. Di conseguenza, come si deduce confrontando la (2.3') con la (2.2'), il consumo di  $\text{O}_2$  disciolto in soluzione da parte dell'enzima è stechiometricamente pari al consumo di glucosio, che a sua volta è direttamente dipendente dalla concentrazione di glucosio in soluzione.

La curva rossa di Figura 2.30 conferma quindi la presenza di attività biocatalitica da parte dell'enzima  $\text{GOx}$ , poiché il biosensore, in presenza di glucosio, approssima le condizioni di anossia rappresentate dalla curva nera.

In tali termini, si evidenzia che la produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  assume quindi un ruolo meno rilevante ai fini della misurazione da parte del biosensore, in quanto la presenza di glucosio può essere valutata direttamente considerando l'enzima.



# Conclusioni

Nel presente lavoro di Tesi è stato sviluppato un biosensore elettrochimico microstrutturato per l'analisi in linea di metaboliti.

L'approccio utilizzato è stato di tipo *bottom-up*, consistente nella realizzazione del biosensore direttamente all'interno di una piattaforma microfluidica,

Le caratteristiche del biosensore sono state analizzate utilizzando tecniche di caratterizzazione elettrochimica e di spettroscopia fotoelettronica a raggi X.

Nella fase preliminare dello studio il sensore è stato realizzato e caratterizzato in un sistema statico. I risultati ottenuti hanno evidenziato la possibilità di effettuare l'*electrografting* su una superficie di ITO (*indium tin oxide*), un materiale ceramico costituito da un ossido di indio e stagno, impiegato come elettrodo. È stato inoltre possibile verificare l'efficacia della cisteammina quale *spacer* da utilizzare nella realizzazione del biosensore nel sistema microfluidico.

È stato quindi progettato un *chip* microfluidico, in seguito realizzato facendo ricorso a tecniche di microfabbricazione. Le conoscenze acquisite nella fase statica hanno permesso di mettere a punto una metodologia per effettuare i singoli *step* necessari all'attivazione del biosensore all'interno del *chip* stesso. In particolare la realizzazione di un sistema con due elettrodi lavoranti ha permesso di verificare la possibilità di agire selettivamente su ciascuno di essi. In tali circostanze si può pensare di realizzare nella stessa piattaforma sistemi multiparametrici, funzionalizzando opportunamente la superficie degli elettrodi con enzimi diversi.

Il dispositivo ottenuto permette di rilevare il glucosio in soluzione, sebbene con una limitata sensibilità di misura.

Miglioramenti in tal senso potranno essere ottenuti individuando le condizioni ottimali da utilizzare nel sistema microfluidico in termini di: durata di ciascuno *step*, portate da impiegare, pH a cui operare.

Un ulteriore aspetto che dovrà essere indagato è la possibilità di aumentare l'area elettrodica attiva.

Infine, la trasparenza del *chip* rappresenta un aspetto particolarmente interessante per applicazioni di questo tipo, in quanto permette di abbinare misure ottiche a misure elettrochimiche: per esempio, si può pensare di impiegare elementi fluorofori che, legati all'enzima, favoriscono l'individuazione dell'enzima stesso.



# Riferimenti bibliografici

- Flavel, B. S., A. J. Gross, D. J. Garrett, V. Nock e A. J. Downard (1985). A simple approach to patterned protein immobilization on silicon via electrografting from diazonium salt solutions. *American Chemical Society*, **2**, 1184-1190.
- Gamry Instruments (2010). Basics of electrochemical impedance spectroscopy – Application note.
- Gervais, T. e K. F. Jensen (2006). Mass transport and surface reactions in microfluidic systems. *Chemical Engineering Science*, **61**, 1102-1121.
- Lamberti, F., M. Giomo e N. Elvassore. (2011) Electrochemical biosensing with carbon nanotubes. In *Carbon Nanotubes - Growth and Applications* (Dr. Mohammad Naraghi, Ed.) InTech.
- Lyskawa, J. e D. Bélanger (2006). Direct modification of a gold electrode with aminophenyl Groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations. *Chem. Mater.*, **18**, 4755-4763.
- Mahouche-Chergui, S., S. Gam-Derouich, C. Mangeney e M. M. Chehimi (2011). Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surfaces. *Chem. So. Rev.*, **40**, 4143-4166.
- Pchelintsev, N. A., A. Vakurov, H. H. Hays e P. A. Millner (2011). Thiols depositions onto the surface of glassy carbon electrodes mediated by electrical potential. *Electrochimica Acta*, **56**, 2696-2702.
- Protti, P. (2001). Introduzione alle moderne tecniche di analisi voltammetriche e polarografiche. *Amel electrochemistry*, IV ed.
- Wu, X., F. Zhao, J. R. Varcoe, A. E. Thumser, C. Avignone-Rossa e R. C. T. Slade (2009). Direct electron transfer of glucose oxidase immobilizer in an ionic liquid reconstituted cellulose-carbon nano tube matrix. *Bioelectrochemistry*, **77**, 64-68.



# Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro, desidero innanzitutto esprimere la mia sincera gratitudine alla Prof. Monica Giomo per la costante disponibilità dimostratami, in particolare per quanto riguarda la stesura di questa Tesi.

Ringrazio vivamente il Dott. Francesco Lamberti, che in questi sei mesi ha saputo guidarmi con pazienza e assiduità durante le fasi sperimentali di questa importante esperienza.

Con la conclusione del mio cammino universitario, mi sembra doveroso anche salutare e ringraziare i miei compagni di Corso, in particolare Alberto, Marco, Franco e Riccardo e tutti coloro che mi sono stati vicini e con i quali ho condiviso la fatica e anche tante giornate di spensieratezza e di gioia.

Il mio pensiero, inoltre, va ai miei familiari, per il grande aiuto che mi hanno saputo dare in questi anni di studio, per il sostegno nelle situazioni più impegnative e per tutti i consigli grazie ai quali ho potuto raggiungere questo obiettivo.

Infine un sincero e speciale ringraziamento a tutte le persone a me care, per i bei momenti vissuti assieme e per l'insostituibile appoggio e incoraggiamento che generosamente mi hanno manifestato.

