UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Sviluppo e caratterizzazione di sensori bioriassorbibili

una soluzione sostenibile ed integrata per tracciare la salute in modo sicuro

Relatore: Prof. ssa Sarah Tonello

Laureando: MATTIA PEZZATO

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

19/07/2023

A tutte le persone coraggiose
che affrontano una malattia cronica

ABSTRACT

L'elettronica transitoria e biodegradabile, ad oggi, risulta non solo essere un'ottima soluzione per far fronte alle problematiche ecologiche ed ambientali e alle loro conseguenze relative alla salute pubblica ma, con le dovute accortezze, permette anche di ottenere oggetti bioriassorbibili e biocompatibili.
La possibilità di utilizzare piccoli dispositivi stampati flessibili ed indossabili che possono scomparire fisicamente in modo controllato, senza produrre sostanze nocive, può essere impiegata nella progettazione di sensori per l'acquisizione di dati biomedici integrati, che lavorano a stretto contatto con i tessuti biologici, sicuri, caratterizzati da potenzialità di misura mai vista fin ora e a basso costo.

Questo lavoro si propone di fornire una descrizione di tali strumenti delineando i tratti distintivi dell'elettronica usata, facendo distinzione tra device di tipo attivo e passivo, illustrando come possono essere resi indipendenti, tramite moduli di alimentazione e scambio dati wireless, presentando i materiali che spesso sono coinvolti, discriminando per conduttori e dielettrici ed indicando le specifiche che fanno parte delle caratterizzazioni morfologica, elettrica, statica, dinamica e ambientale.

Alla sezione bibliografica ne segue una sperimentale nella quale, dopo aver introdotto la tecnica di spettroscopia elettrochimica di impedenza, si vogliono confrontare i risultati ottenuti mediante questo metodo utilizzando dei sensori interdigitati di tipo standard, stampati con traccia conduttiva di argento su kapton, con degli altri, disegnati con un inchiostro a base di PEDOT: PSS, un polimero biodegradabile, su una struttura polimerica a base di PET. Le misure sono state completate cospargendo prima l'elemento sensibile di PBS (tampone salino fosfato) e in seguito applicando un coating di gelatina, a simulare uno strato di cellule.
Tramite l'analisi dello spettro dell'impedenza è possibile lo studio delle popolazioni cellulari per quanto riguarda la proliferazione, la differenziazione e la motilità.

INDICE

INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE 1

1.1 E-Waste, biodegradabilità e bioriassorbibilità 1

CIRCUITI ELETTRONICI BIODEGRADABILI: DAL SENSORE ALLA TRASMISSIONE DEI DATI 3

2.1 La catena di acquisizione 3

2.2 Sensori: elettrodi e transistor 4

2.3 Sensori organici e bioriassorbibili 6

2.3.1 Sensori passivi 6

2.3.2 Sensori attivi 7

2.4 Il circuito di condizionamento: circuiti integrati e stampati 9

2.5 Moduli di alimentazione e scambio dati 11

MATERIALI BIODEGRADABILI DI INTERESSE 14

3.1 Materiali conduttivi 14

3.2 Materiali dielettrici 16

3.2.1 Caratterizzazione meccanica 16

3.2.2 Principali materiali usati 18

3.2.2.1 Seta 19

3.2.2.2 Cellulosa 19

3.2.2.3 Amido 20

3.2.2.4 Polimeri sintetici 20

APPLICAZIONI DI SENSORI BIODEGRADABILI E BIORIASSORBIBILI 22

CARATTERIZZAZIONE DI SENSORI BIODEGRADABILI 24

5.1 Caratterizzazione morfologica 24

5.2 Caratterizzazione elettrica 24

5.3 Caratterizzazione statica e dinamica 25

5.4 Caratterizzazioni ambientali e di stabilità 27

5.5 Studio ed impiego del segnale 27

ATTIVITÀ SPERIMENTALE **29**

6.1 Sensori per Electro Chemical Cells Impedence Spettroscopy 29

6.2 Caratterizzazione di sensori per EICS biodegradabili 37

6.2.1 Materiali e metodi 37

6.2.2 Risultati 42

CONCLUSIONI **50**

BIBLIOGRAFIA **52**

INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE

1.1 E-Waste, biodegradabilità e bioriassorbibilità

I dispositivi elettronici medicali sono essenziali per la diagnosi, il monitoraggio e il trattamento delle malattie. La loro produzione e il loro smaltimento tuttavia possono avere un impatto significativo sull'ambiente e sulla salute pubblica.
La produzione di rifiuti elettronici, o *e-waste*, è un problema crescente a livello globale poiché l'avanzamento della tecnologia e della connettività hanno portato ad un aumento della quantità di dispositivi prodotti che devono essere smaltiti correttamente. In particolare, questi strumenti si compongono di materiali preziosi ma anche di sostanze nocive come piombo, mercurio, cadmio e policlorobifenili che, se non vengono smaltiti correttamente, possono contaminare il suolo e l'acqua causando danni all'ambiente e alla salute pubblica. Un altro pericolo è dato dalla presenza di plastica e metallo, sostanze che presentano una lenta degradabilità.

Nel 2019, la produzione mondiale di rifiuti elettronici è stata di 53.6 milioni di tonnellate metriche, pari ad una media di 7.3 kg per persona. Di questi, solo il 17.4% è stato ufficialmente documentato come raccolto e riciclato correttamente. Rispetto al 2014, la generazione totale di rifiuti elettronici è aumentata di 9,2 milioni di tonnellate e i dati dimostrano che le attività di riciclaggio non stanno tenendo il passo con la crescita globale dei rifiuti elettronici. In media, il consumo globale di dispositivi elettronici cresce annualmente di 2.5 milioni di tonnellate metriche e si stima che il numero complessivo annuo di rifiuti elettronici sia destinato a crescere fino a 74.7 milioni di tonnellate entro il 2030.
L'aumento degli e-waste è principalmente alimentato da tassi di consumo più elevati di EEE (apparecchiature elettriche ed elettroniche), cicli di vita brevi e poche opzioni di riparazione [1].

Un modo per ridurre l'impatto ambientale dei dispositivi medici è quello di limitare, quando possibile, l'impiego degli usa e getta, incentivare la progettazione di dispositivi elettronici che siano più facilmente riparabili e aggiornabili, in modo da estendere la loro durata e ridurre la necessità di sostituirli, ed infine promuovere pratiche di riciclaggio e smaltimento responsabile. Purtroppo, il costo del riciclaggio dei dispositivi medici può essere elevato, e ciò potrebbe scoraggiare alcuni utenti finali dal comportamento etico. Una soluzione è quella di usare una strumentazione biodegradabile.
La ***biodegradabilità*** è la capacità di un oggetto di decomporsi in sostanze più semplici e meno inquinanti per l'ambiente.
La biodegradazione, di per sé, è un processo spontaneo ma la velocità con cui avviene dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale considerato e dalle circostanze ambientali come temperatura, umidità e presenza di determinati agenti chimici.

Usare dei materiali appropriati costituisce quindi la chiave di volta per ottenere sistemi eco-friendly.
La produzione di tali soluzioni presenta diversi vantaggi, tra cui:

1. Riduzione dell'impatto ambientale:
   I dispositivi biodegradabili possono essere scomposti in modo naturale dall'ambiente senza causare inquinamento. Ciò significa che il loro smaltimento non rappresenta un pericolo ecologico ma anche che la loro produzione richiede meno risorse e può quindi contribuire a ridurre l'impatto ambientale complessivo.

2. Riduzione dei rischi per la salute:
   Nella letteratura appare evidente la correlazione tra l'esposizione all'inquinamento ambientale e l'insorgenza di diverse patologie. Oggi questo fenomeno rappresenta una seria minaccia per la salute umana. È stato provato che l'inquinamento è un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari e respiratorie, malattie autoimmuni come Parkinson e anche tumori. Inoltre può aumentare il rischio di sviluppare il diabete e peggiorare il controllo glicemico in coloro che già ne soffrono [2]–[5].
   L'importanza di vivere in un ambiente sano è testimoniata anche dalla costituzione italiana che si propone di tutelare l'ambiente e la biodiversità come paradigmi da tutelare da parte dell'economia, al pari della sicurezza, della libertà e della dignità umana [6], [7].

3. Migliori prestazioni e sviluppo di nuovi campi di applicazione:
   Con le opportune accortezze, è possibile far operare questi strumenti in intimo contatto con i tessuti biologici minimizzando il più possibile le eventuali reazioni avverse o di rigetto da parte dell'organismo ottenendo degli strumenti biocompatibili.
   La ***biocompatibilità*** di un materiale consiste nella caratteristica di stabilire interazioni non sfavorevoli con i sistemi viventi con i quali è a contatto [8].
   Secondo la definizione, un materiale che subisce una progressiva degradazione nel sistema biologico senza provocare rigetto o effetti tossici è detto ***bioriassorbibile***.

L'elettronica transitoria è un concetto emergente, volto a realizzare un futuro più sostenibile mitigando il problema dell'accumulo di rifiuti elettronici.
In ambito medico, dispositivi che possono scomparire fisicamente in modo controllato, senza produrre sostanze nocive, aprono un'ampia gamma di opportunità in particolare nel campo dell'acquisizione di dati biomedici in real-time offrendo applicazioni nel settore del monitoraggio in vivo dei pazienti in modo sicuro ed integrato. Inoltre, le tecnologie transitorie che sono biocompatibili e possono essere biologicamente riassorbite hanno un grande potenziale per le applicazioni negli impianti medici temporanei, poiché eliminano la necessità di costose operazioni di recupero del dispositivo e riducono i rischi di infiammazione ed infezione causati dai dispositivi non biodegradabili.
La produzione di elettronica flessibile stampata rappresenta uno strumento molto promettente in grado di combinare efficienza di costo e di tempo, con la massima possibilità di personalizzazione e prestazioni geometriche ed elettroniche ottimali [9], [10].

CIRCUITI ELETTRONICI BIODEGRADABILI: DAL SENSORE ALLA TRASMISSIONE DEI DATI

2.1 La catena di acquisizione

Una grandezza tempo-variante che determina la variazione di una grandezza fisica misurabile è detta segnale.

I sistemi di acquisizione si compongono di mezzi che possano rilevare il segnale da studiare, di dispositivi per il suo condizionamento nella forma analogica, di dispositivi per la sua conversione nella forma digitale e di moduli che possano rielaborarlo. Segue una sezione dedicata all'output, ovvero il segnale di risposta in uscita al dispositivo, e degli eventuali sistemi per la memorizzazione che può comprendere o meno il trasferimento dei dati.

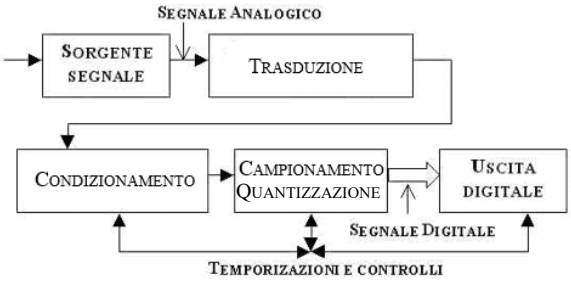


Figura 2.1 – Catena di acquisizione

La figura rappresenta un tipico schema a blocchi della catena di acquisizione che riassume il trattamento del segnale dalla sua generazione alla sua conversione in digitale.

Il primo agente della catena di acquisizione è il *trasduttore*, il dispositivo atto a convertire una misura di carattere non elettrico in un segnale elettrico.

Per poter registrare dei dati è necessario uno strumento che, interfacciandosi con il mondo fisico, sia in grado di quantificare le sue proprietà. A questo fine, si rende indispensabile nel trasduttore la presenza di una componente sensibile alla misura detta sensore. L'elemento sensibile, nel complesso, può sfruttare diversi principi fisici classificandosi in resistivo, induttivo, capacitivo, ottico, piezoelettrico, elettrochimico o altro e si può formare di elettrodi oppure di uno o una combinazione di transistor.

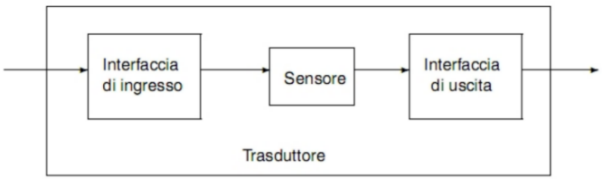


Figura 2.2 – Schema di un trasduttore

Il trasduttore è seguito da uno o più moduli che hanno la funzione di elaborare il segnale ricevuto in modo da renderlo utilizzabile in operazioni future. Fra questi è possibile individuare dei blocchi per il

condizionamento in analogico quali i filtri tra cui va ricordato l'*anti-aliasing*, e i blocchi per la conversione in digitale che comprendono *campionamento* e *quantizzazione*.
Al segnale digitale possono in seguito venire applicati altri filtraggi.
I dati ricavati sono al termine trasmessi ad altre strutture per essere ulteriormente elaborati o memorizzati.

2.2 Sensori: elettrodi e transistor

Si è già visto come il primo elemento della catena di acquisizione di segnali tramite elettronica biodegradabile è rappresentato dall'elemento sensibile alla grandezza che si vuole monitorare: il sensore. Poiché l'interazione del sensore con il misurando assume necessariamente la forma di uno scambio di energia, si è soliti classificare i sensori in attivi e passivi.
I primi sono in grado di fornire in uscita un segnale elettrico, convertendo la potenza entrante del misurando che assorbono dal sistema sottoposto alla misura, mediante una trasformazione di energia. Si possono schematizzare attraverso gli equivalenti di Norton e Thevenin.
Nei secondi il misurando è in grado di influenzare una grandezza elettrica passiva che, venendo sollecitata elettricamente da una sorgente ausiliaria, è in grado di alterare l'uscita. Vengono solitamente schematizzati come parallelo tra un generatore di tensione ausiliario e l'impedenza del sensore.
Nella fase di progettazione è necessario decidere se utilizzare soluzioni passive oppure attive.

Gli *elettrodi* sono oggetti passivi che permettono il flusso degli elettroni in un sistema elettrochimico e che sono in grado di misurare il potenziale elettrico.

Il 16 dicembre 2022 si è celebrato il 75° anniversario di una delle più importanti scoperte tecnologiche del XX secolo: l'invenzione del *transistor*.
Questi elementi, che possono essere utilizzati come sensori, sono di tipo attivo perché devono essere continuamente alimentati attraverso una tensione, detta di polarizzazione, per poter funzionare.
Si può affermare che la nascita dell'elettronica come la si intende oggi ebbe luogo nei Bell Labs statunitensi quando William Shockley, John Bardeen e Walter Brattain nel 1947 diedero la luce al primo transistore della storia. Tale conquista fu, in un primo momento, di cruciale impatto soprattutto nell'amplificazione dei segnali elettrici e nella costruzione di interruttori segnando il passaggio da una società basata sulle macchine, figlia della rivoluzione industriale, a quella attuale, fondata sull'elaborazione, la trasmissione e la gestione dell'informazione: l'information age. A giustificare la suddetta affermazione si pensi che il componente elettronico più prodotto al mondo è il transistor MOSFET, inventato nel 1959, segno che questo oggetto è ormai imprescindibile per il controllo di quasi tutti i circuiti e sistemi elettronici utilizzati nel campo della ricerca ma anche nella vita quotidiana.

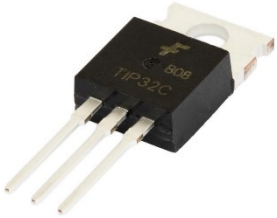


Figura 2.3 – Transistor

Alla base del funzionamento dello strumento vi è la giunzione p-n ottenuta facendo interagire più substrati semiconduttori drogati tra loro adiacenti. A questi sono applicati tre terminali che connettono il dispositivo al circuito in cui è inserito.
Il drogaggio, ovvero l'aggiunta di piccole percentuali di atomi esogeni al semiconduttore stesso, che si usa per aumentare la sua conducibilità elettrica, avviene diversamente nelle due zone della giunzione che poi saranno interfacciate.
Si identifica un drogaggio di tipo *n*, che distingue lo *strato n*, caratterizzato da un eccesso di lacune e uno di tipo *p*, proprio dello *strato p*, riconoscibile per un'eccedenza di elettroni.
Nel processo di drogaggio si utilizzano quantità di elementi droganti molto piccole in modo che le impurità presenti nei semiconduttori possano modificare le loro caratteristiche elettriche ma non quelle chimiche. L'entità del drogaggio si quantifica in *atomi/cm³*.
Le procedure più comuni per drogare un sottile strato superficiale di semiconduttore sono la diffusione termica e l'impiantazione ionica.
Nella regione di carica, ovvero il confine tra le due zone, si generano sia una differenza di potenziale, quindi un campo elettrico dovuto alla presenza di ioni di cariche opposte, che delle correnti di diffusione dovute allo spostamento dei portatori nelle zone contrapposte.

Esistono diversi tipi di transistor che sfruttano principi elettrochimici differenti.

Il *transistor a giunzione bipolare*, indicato spesso con l'acronimo BJT (Bipolar Junction Transistor), è una tipologia utilizzata in elettronica sia come componente analogico, quando si ha necessità di un amplificatore di corrente o di tensione, che come componente logico per ottenere un interruttore.
La struttura è riconoscibile dalla presenza di tre regioni contigue di materiale semiconduttore che sono drogate alternativamente. I tre connettori prendono i nomi di *collettore*, *emettitore* e *base*.
I primi due sono destinati alla conduzione della corrente mentre il terzo agisce come fattore di controllo sull'erogazione della stessa attraverso la quantificazione del flusso di carica tra lo stesso e un altro nodo.

I *transistor ad effetto di campo*, anche chiamati con l'acronimo FET (Field-Effect Transistor), sono una tipologia largamente usata nel campo dell'elettronica digitale e diffusa, in maniera minore, anche nell'elettronica analogica.

Si tratta di dispositivi pilotati in tensione che vengono definiti unipolari perché il loro funzionamento dipende dal flusso dei soli portatori maggioritari. Sulla base della natura dei portatori di carica si differenziano in modelli di tipo p o n; si distinguono inoltre due tipi di FET:
J (a giunzione, in inglese junction) e *MOS* (acronimo di Metal-OxideSemiconductor).
Analogamente al caso precedente sono presenti tre terminali denominati *source*, *drain* e *gate* nello stesso schema. Ancora una volta ciò che determina la corrente nei nodi del dispositivo non è il potenziale assoluto, ma una condizione dovuta alle proprietà elettriche del gate. La differenza sostanziale rispetto ai BJT è che le grandezze caratteristiche che determinano la corrente erogata dal dispositivo non sono correnti ma differenze di potenziale tra i nodi del dispositivo.

2.3 Sensori organici e bioriassorbibili

Per costruire sensori biocompatibili è necessario utilizzare materiali che non causino reazioni avverse nel tessuto vivente e che siano in grado di lavorare in modo affidabile nel contesto biologico. I materiali comunemente utilizzati sono polimeri organici, che, impiegati come substrati, possono essere funzionalizzati per migliorare la loro biocompatibilità e metalli biodegradabili per la realizzazione degli elettrodi.

2.3.1 Sensori passivi

Per quanto riguarda i sensori basati su semplici elettrodi, è possibile definire una caratterizzazione in base al loro principio di funzionamento e al loro utilizzo. Si è soliti distinguere in:

1) Elettrodi per la rilevazione di grandezze fisiche
   Sfruttano fenomeni fisici come la variazione della resistenza causata dall'influenza dell'ambiente per misurarne i dati. Alcuni esempi si ritrovano nelle sonde di temperatura o nei sensori di deformazione.
2) Elettrodi per rilevare grandezze chimiche
   Utilizzano tecniche potenziometriche o amperometriche, ovvero di misura di rispettivamente della differenza di potenziale e dell'intensità di corrente, per determinare la presenza di una o più specie chimiche e di biomolecole elettronicamente attive e la loro concentrazione.
   Fanno parte di questa categoria gli elettrodi a vetro per il pH, gli elettrodi a membrana selettiva utilizzati per la misura della concentrazione di ioni specifici in una soluzione e gli elettrodi per l'impedenzometria le quali applicazioni saranno approfondite in seguito.

2.3.2 Sensori attivi

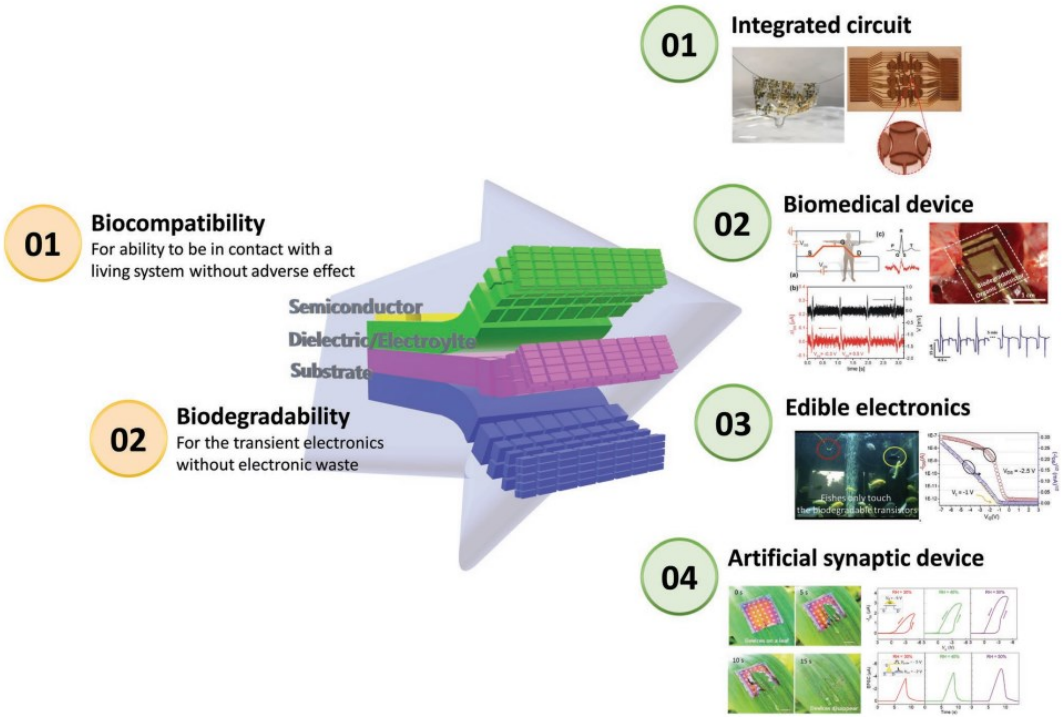


Figura 2.3 – Applicazione di elettronica biocompatibile e bioriassorbibile

La figura 2.3 schematizza la struttura dei sensori a transistor organici, le loro potenzialità e alcune sfere di impego tra cui: (1) circuiti integrati, (2) dispositivi biomedici, (3) elettronica ingeribile, (4) dispositivi sinaptici artificiali.

I primi passi verso i transistor organici biodegradabili sono stati riportati nel 2010 da Bettinger et al. con la fabbricazione di un transistor avente alcool polivinilico (PVA) come dielettrico, acido poli lattico-co-glicolico (PLGA) come substrato biodegradabile e 5,5'-bis-(7-dodecil-9H-fluoren-2-il)-2,2'-bitiofene come semiconduttore organico [11]. Il dispositivo è rimasto relativamente intatto per un mese ed è stato completamente degradato entro 70 giorni in una soluzione tampone a base di citrato (pH 4,0) a 37°.
In seguito, sono state segnalate progettazioni di transistor completamente commestibili utilizzando capsule di gelatina rigida come substrato, perilene-diimide (PDI) come semiconduttore organico e acido desossiribonucleico (DNA) come dielettrico [10].
Utilizzare materiali organici è vantaggioso poiché sono economici, presentano una flessibilità senza precedenti, risultano facili da lavorare e sono sintetizzabili su misura.

I transistor organici si dividono in quattro grandi classi: transistor a effetto di campo organici (OFET), transistor a effetto di campo organici a gate elettrolitico (EGOFET), transistor elettrochimici organici (OECT) e transistor sinaptici organici (OST).

1) OFET: transistor a effetto di campo organici
   Un transistor a effetto di campo organico può essere paragonato ad un FET che utilizza un semiconduttore organico nel suo canale.

2) EGOFET: transistor a effetto di campo organici a gate elettrolitico
   Gli EGOFET funzionano grazie all'uso di un elettrolita come gate dielettrico che viene utilizzato per modulare la conduttività del materiale semiconduttore organico presente nel canale del dispositivo. L'elettrolita, infatti, agisce come un conduttore ionico, permettendo il passaggio degli ioni attraverso il materiale organico e modulando la corrente in uscita, rendendolo adatto per applicazioni quali la rilevazione nei biosensori.

3) OECT: transistor elettrochimici organici
   In questi dispositivi, un elettrolita viene posto in contatto con il semiconduttore per controllare il flusso di carica attraverso il dispositivo modificando la conduttività dell'inchiostro tramite reazioni chimiche redox con il materiale.
   Gli OECT sono solitamente utilizzati in applicazioni a bassa frequenza dove riescono ad essere più sensibili e ad amplificare il segnale.

4) OST: transistor sinaptici organici
   Gli OST sono dispositivi che incorporano una funzione sinaptica, ovvero possono emulare la plasticità sinaptica delle sinapsi biologiche e modulare la loro forza di connessione in base all'attività neuronale, ovvero hanno la capacità di modificare la forza della connessione tra i neuroni in base alla loro attività.
   Queste caratteristiche fanno si che gli OST possano essere impiegati per costruire circuiti neurali artificiali capaci di apprendere e adattarsi a nuove situazioni in modo simile al cervello umano.

La degradazione dei materiali elettronici deve avvenire subito dopo il termine del periodo di funzionamento attraverso idrolisi, degradazione ossidativa o reazioni metaboliche operate da microorganismi. I transistor organici per applicazioni elettroniche transitorie indossabili devono essere eliminati o digeriti senza la liberazione di sottoprodotti nocivi. A questo proposito, la biodegradazione può essere testata utilizzando fluidi biologici simulati di pH fisiologico (7,4) e temperatura fissa a 37°C.

Nel realizzare un dispositivo organico temporaneo, la biodegradazione del materiale di supporto può essere considerata l'aspetto più importante poiché determina generalmente oltre il 99,5% della massa del dispositivo.
La progettazione di oggetti simili rimane una sfida tecnologica complessa che richiede la collaborazione di esperti in diverse discipline come la biologia, la chimica, la fisica e l'ingegneria dei materiali. Nonostante siano stati fatti importanti progressi nella realizzazione di elettronica completamente

biodegradabile, la ricerca nel campo dell'elettronica transitoria è ancora in fase iniziale. Le sfide che oggi più provano gli esperti sono la ricerca di materiali adatti con le relative strutture ottimizzate e conformi alle loro proprietà e lo studio delle tecniche di produzione.
Attraverso reti elettriche che si compongono di elementi circuitali come quelli visti in precedenza è possibile costruire un'ampia classe di strumenti elettronici utili in svariati ambiti; in questo elaborato ci si vuole soffermare sugli apparati finalizzati all'acquisizione di dati.

2.4 Il circuito di condizionamento: circuiti integrati e stampati

Al fine di ottenere un dispositivo completo, la progettazione di ciascun sensore non può prescindere dalla contemporanea definizione di un dedicato circuito di condizionamento, deputato a far avvenire in modo corretto la trasduzione del segnale.
Sia gli elettrodi che le varie tipologie di transistor descritte in precedenza possono essere interfacciati con circuiti miniaturizzati dedicati alla loro alimentazione e al trattamento del segnale in uscita. Nel caso di elementi sensibili basati sulla stessa tecnologia del transistor, questi possono essere direttamente riprodotti in minima scala all'interno di circuiti integrati o su CHIP (figura 2.2 - a). Tali oggetti costituiscono oggi la base della microelettronica e dei dispositivi di archiviazione.
Il primo esemplare di IC (integrated circuit) fu costruito nel 1958 e si componeva di una decina di componenti elementari. Oggi, nei circuiti a complessità più elevata, si contano fino a dieci milioni di transistor.
I circuiti integrati non vanno confusi con i circuiti stampati (figura 2.2 - b) che costituiscono invece uno dei più recenti passi avanti nell'industria elettronica.
A differenza dei transistor tradizionali che vengono montati su circuiti integrati, i transistor stampati sono fatti di materiali plastici conduttivi come il polimero a base di PEDOT: PSS (polistirensulfonato) e sono utilizzati in applicazioni a basso costo, come i circuiti stampati flessibili.

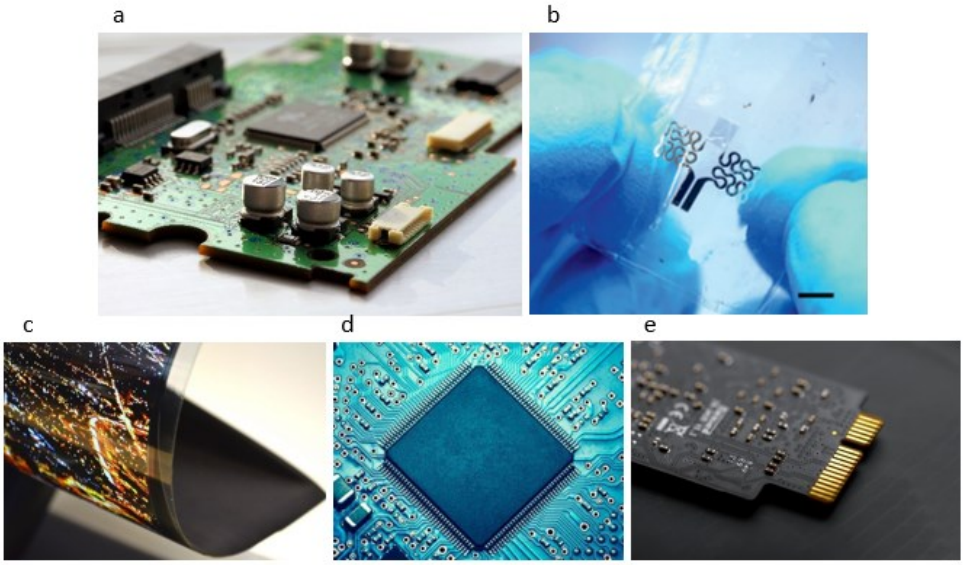


Figura 2.2 – Evoluzione nell'uso dei transistor

Il funzionamento di un transistor stampato è basato sulla modulazione della corrente elettrica attraverso un materiale plastico conduttivo, consentendo di amplificare o controllare un segnale elettrico in modo simile a un transistor tradizionale.
Il primo esemplare funzionante è stato sviluppato nel 2003 nei laboratori dell'università di Cambridge, da allora questa tecnologia è oggetto di intensa ricerca e sviluppo in tutto il mondo.
Oggi, questi dispositivi trovano spazio in molte applicazioni, come i display a matrice di punti OLED (figura 2.2 - c), i microprocessori (figura 2.2 – d), le memorie a stato solido (figura 2.2 - e) e molti altri dispositivi elettronici.

Per stampare un transistor si utilizzano tecniche di stampa a getto o a litografia.
Nel caso della *stampa a getto di inchiostro*, l'inchiostro conduttivo viene depositato sul substrato attraverso una testina di stampa, in modo simile alla stampa su carta. La testina di stampa è dotata di piccoli ugelli attraverso i quali viene spruzzato l'inchiostro sulla superficie del substrato. Il processo può essere ripetuto molte volte formando infine un transistor a film sottile.
Un'alternativa è la *stampa a getto di aerosol* (AJP, Aerosol Jet Printing), una procedura che tramite una sorgente di gas o di aria compressa, cosparge la superficie del substrato di una nebulizzazione di particelle di metallo o di altri materiali conduttivi. Queste particelle vengono quindi depositate sulla superficie del substrato in modo casuale, dando luogo ai tratti e i punti necessari per realizzare il circuito.
In generale, la stampa a getto di inchiostro offre una maggiore precisione e controllo rispetto alla stampa a getto d'aerosol, poiché la testina è in grado di controllare con maggiore precisione il posizionamento dell'inchiostro. Tuttavia, la stampa a getto d'aerosol può essere più veloce e meno costosa, poiché non richiede l'uso di inchiostri speciali e può essere utilizzata per la produzione di circuiti stampati su scala industriale.
Nel caso della *litografia*, si utilizzano tecniche fotolitografiche per depositare strati di materiali conduttivi e isolanti sulla superficie del substrato. Il processo di litografia prevede l'utilizzo di maschere fotografiche e di luce UV per controllare il deposito selettivo dei materiali sul substrato. Questo processo è altamente preciso e può essere utilizzato per fabbricare transistor molto piccoli e complessi.
Dopo aver depositato gli strati di materiali conduttivi, l'elettrodo di base, l'emettitore e il collettore vengono ottenuti e aggiunti attraverso un processo di incisione chimica o di deposizione selettiva di materiali conduttivi.

I circuiti stampati, rispetto ai circuiti integrati, presentano vari vantaggi come la possibilità di essere riparati sostituendo componenti danneggiati o ripristinando le interconnessioni, la ridotta dimensione, la più alta affidabilità nel tempo, il costo inferiore e la possibilità della produzione su vasta scala.
Solitamente, per proteggere le piste conduttrici che si ossidano facilmente, vengono sottoposti ad un trattamento superficiale.

Gli IC vengono per lo più adibiti al supporto e al collegamento dei i vari componenti elettronici in modo da costituire un vero e proprio circuito elettrico propriamente detto oppure possono essere usati come base per la generazione diretta di componenti elettronici passivi.
Grazie alla conoscenza acquisita sui fenomeni fisici che stanno alla base dei transistori, sui polimeri sintetici e sulla loro produzione e sui nuovi schemi di assemblaggio come la stampa che ha implementato le tecniche microtecnologiche più convenzionali, oggi è possibile l'impiego di un ampio spettro di materiali per la fabbricazione di dispositivi le cui proprietà chimiche e fisiche possono essere cucite addosso a specifiche applicazioni.
In questo testo verranno approfonditi alcuni scenari in cui è richiesta trasparenza, flessibilità, biodegradabilità fino ad arrivare alla bioriassorbibilità.

2.5 Moduli di alimentazione e scambio dati

Per ottenere elettroniche completamente bioriassorbibili ed impiantabili all'interno di un tessuto, è necessario che siano del tutto indipendenti e che possano interagire con l'esterno attraverso dei sistemi wireless. Anche se comporta un aumento della complessità del circuito, nel caso di oggetti biocompatibili, un sistema di questo tipo è di fondamentale importanza per ridurre al minimo il rischio di infezioni dovute all'interfaccia della pelle con il filo che non permette la rimarginazione della ferita. Si vuole inoltre garantire al soggetto una migliore mobilità che consenta di usare strumenti simili nell'ambiente ospedaliero ma anche in quello casalingo.

L'uso di moduli come il Bluetooth permette di ricevere in tempo reale i dati ricavati dai dispositivi impiantabili atti alla ricezione di dati, di trasmetterli a memorie esterne per ulteriori rielaborazioni e di controllare alcune funzionalità del mezzo da remoto.
Parametri significativi per la scelta del protocollo Bluetooth sono la potenza ERP, definita come la massima potenza trasmissiva in radiofrequenza, comprendente l'incremento dovuto al guadagno in trasmissione dell'antenna del dispositivo e la portata in termini di distanza entro la quale può avvenire il collegamento.
Un'alternativa al bluetooth è rappresentata dall'NFC (Near Field Communication), una tecnologia a corto raggio che consente la comunicazione tra dispositivi elettrici e il passaggio di piccole quantità di dati. Nel caso dei sensori impiantabili, anche se il trasferimento avviene più lentamente, questo sistema presenta diversi vantaggi rispetto al precedente. In primo luogo, dato che il protocollo è ideato per funzionare quando il dispositivo di lettura si trova ad un massimo di 10 cm dall'antenna, sono garantiti maggiore sicurezza e privacy e si riducono i rischi di interferenze e di hacking. Questo sistema presenta inoltre un basso consumo energetico e consente un'associazione più veloce che, completandosi con il contatto, esclude la necessità di inserire password di associazione rendendo l'applicazione fruibile anche agli anziani che potrebbero trovarsi in difficoltà nell'uso coordinato di più mezzi informatici.

Tuttavia, bisogna tenere in considerazione che l'uso di NFC non è consigliato per applicazioni che richiedono il trasferimento di un elevato volume di dati o in cui la posizione dell'antenna influisca sulla qualità del segnale poiché i tessuti del corpo umano possono attenuarlo.

Un'altra difficoltà che si incontra per ottenere strumenti completamente bioriassorbibili è la necessità di incorporare un impianto di alimentazione che non necessiti di collegamenti fisici con l'esterno del corpo del paziente.
Le fonti di energia interne già esistenti, utilizzate ad esempio nei pacemaker e negli stimolatori per la corteccia profonda, dipendono principalmente dalle batterie non biodegradabili, spesso causano calore interno, perdita di capacità e guasti nel lungo periodo. In più, una volta che queste hanno completato le loro funzioni, i pazienti devono sottoporsi ad altri interventi chirurgici per rimuoverle che, oltre a causare dolore e disagi, comportano ingenti oneri economici.
Come alternativa, finora sono stati sviluppati dispositivi per lo più di tipo passivo ma, per ottenere impianti elettrici attivi, sono indispensabili alimentatori adatti come batterie bioriassorbibili, raccoglitori di energia o circuiti degradabili per il trasferimento di energia wireless.

Oggetti flessibili e sottili come i micro-supercondensatori (μSC) con proprietà come flessibilità, miniaturizzazione, biocompatibilità e biodegradabilità possono essere largamente impiegati per tali sistemi.
Nello studio condotto nel 2018 da Hu Li et al [12], è presentato un condensatore completamente bioriassorbibile, valido per impianti a vita, in grado di funzionare non solo in aria ma anche in ambiente liquido che può essere utilizzato come unità di stoccaggio dell'energia per l'elettronica transitoria a tempo di vita regolabile. Il μSC presentava una struttura a strati composta di una pellicola di acido polilattico (PLA), elettrodi di ferro, uno strato di Ossido di zinco (ZnO) e un idrogel a base di alcool polivinilico (PVA).
Tutti i materiali usati, che verranno approfonditi nell'apposita sezione di questo elaborato, sono soggetti a degradazione autonoma nel giro di 4-5 mesi in PBS (Phosphate Buffered Saline), una soluzione tampone comunemente impiegata per simulare la concentrazione di sali e l'osmolarità del corpo umano a pH costante, rispettivamente per: polverizzazione, corrosione e idrolisi autocatalitica.
Il condensatore ha raggiunto una tensione di funzionamento di 1.5V ed è stato stimato che è in grado di mantenere il 70% della carica fino a 3000 cicli.

I wireless charger funzionano sfruttando il principio fisico dell'induzione elettromagnetica consentendo di ripristinare le risorse energetiche di un dispositivo attivo senza una vera e propria conduzione.
Questa caratteristica garantisce in primo luogo di accedere alla batteria di un oggetto impiantato senza sottoporre l'ospite ad interventi e inoltre lo mette in sicurezza da potenziali correnti conduttive.
Il sistema si compone di due bobine, una interna al dispositivo e una esterna. Sulla seconda, detta di trasmissione, è fatta circolare della corrente in grado di generare un campo magnetico che ha effetto

sulla prima, inducendo così su quest'ultima una forza elettromotrice di intensità proporzionale al rapporto tra il numero delle spire nei due avvolgimenti.

Una tendenza che sta prendendo piede negli ultimi anni consiste nel progettare strumenti che possano fornire energia sfruttando i processi fisiologici ed anatomici del corpo umano.
Ne è un esempio lo studio condotto nel 2016 al Beijing Institute of Nanoenergy and Nanosystems che propone un nanogeneratore triboelettrico biodegradabile per la conversione a breve termine dell'energia biomeccanica in vivo. Il prototipo si componeva si una struttura multistrato di polimeri biodegradabili e metalli bioriassorbibili, consentiva una corrente in uscita di 1 mA, una tensione in uscita fino a circa 40 V e dopo aver completato il suo ciclo di lavoro era in grado di degradarsi e venire riassorbito in un corpo animale senza alcun effetto collaterale a lungo termine [13].

MATERIALI BIODEGRADABILI DI INTERESSE

Si vogliono ora analizzare i principali materiali adoperati nella realizzazione di sensori bioriassorbibili e le loro proprietà. Oggetti di questo tipo presentano solitamente una struttura composita in cui è possibile osservare l'uso di diversi materiali conformi alla funzione dello specifico modulo.
Nella scelta della materia prima, oltre alla biodegradabilità e alla biocompatibilità, è necessario valutare il processo di produzione, poiché alcuni materiali potrebbero non essere conformi alle operazioni necessarie alla fabbricazione di sensori, e il tempo di attività del prodotto finito in modo che questo si degradi in modo sicuro e naturale al termine della sua vita utile.

Il processo di biodegradazione avviene quando la materia organica viene decomposta dagli enzimi presenti nei microrganismi, ad esempio funghi e batteri. Il suo meccanismo si divide in biodeterioramento, biofermentazione e assimilazione.
Il metodo di biodegradazione più comune è quello di dissoluzione e avviene in presenza di adeguati solventi acidi o alcalini. Le reazioni primarie che avvengono sono l'idrolisi e l'ossidazione insieme ad altri fenomeni che generano piccoli frammenti che, nel caso dei materiali bioriassorbibili, non devono essere nocivi e che verranno ulteriormente deteriorati tramite ossidazione microbica e degradazione.
La degradazione può essere anche resa un processo attivo.
Nei casi in cui i materiali funzionali subiscono una rapida degradazione in un ambiente specifico rilevante per la sua applicazione, la durata operativa può essere controllata mediante l'uso di uno strato di incapsulamento che può interagire con stimoli esterni quali la luce, la temperatura, l'umidità, il pH, ecc. e controllare la cinetica di degradazione. In questo modo è possibile dare inizio alla degradazione *on demand* [10].

3.1 Materiali conduttivi

Un sensore, in quanto tale, necessita di componenti conduttrici che possano trasmettere impulsi e condurre misure elettriche ed elettrochimiche. Per la produzione degli elettrodi e della traccia conduttiva, nei dispositivi medici bioriassorbibili, si utilizzano metalli che possano essere degradati e riassorbiti dal corpo senza causare una risposta immunitaria negativa.
Oro e argento, che ad oggi si riscontrano più frequentemente negli elettrodi tradizionali, non possono essere utilizzati in quanto, anche se bioinerti, permangono nell'organismo e devono essere rimossi chirurgicamente una volta che non sono più necessari. La scelta ricade su metalli corrodibili presenti in piccolissime quantità all'interno del corpo umano come magnesio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe), carbonio (C), tungsteno (W), molibdeno (Mo) e i relativi ossidi.
In quanto metalli è necessario considerare il rischio della corrosione, un processo chimico che potrebbe comportare la formazione di ossidi, solfati o altri prodotti di degradazione potenzialmente tossici e in grado di compromettere le caratteristiche fisiche e chimiche dell'oggetto.

Questo processo dannoso avviene come insieme di una reazione di ossidazione, detta anodica, e una di riduzione, detta catodica. Nel complesso si parla di reazione di ossidoriduzione (o redox) quando avviene un trasferimento di elettroni da un reagente ad un altro.
La tendenza alla corrosione di un metallo può essere determinata sulla base della serie elettrochimica dei potenziali di Nernst o potenziali standard di riduzione. In genere dato l'ambiente in cui poniamo il materiale, se il potenziale di riduzione standard dell'oggetto considerato è più alto di quello ambientale si ha riduzione, in caso contrario si va incontro ad ossidazione.

La biodegradazione dei metalli nel corpo umano avviene principalmente per idrolisi e per azione degli ioni cloro.
L'idrolisi è una reazione chimica che avviene quando una sostanza viene scissa dall'acqua, a causa dell'interazione tra le molecole della sostanza e le molecole dell'acqua. Il processo può avvenire sia in soluzione acquosa che in presenza di vapore acqueo e sia in ambiente acido che alcalino. A guidare la degradazione vi è la rottura dei legami chimici tra gli atomi presenti nella sostanza colpita, con la formazione di nuovi legami tra gli stessi e le molecole d'acqua.
La corrosione da cloro, invece, si verifica quando gli ioni cloro reagiscono con il metallo, causando la formazione di cloruri metallici instabili che possono poi reagire ulteriormente con l'acqua e l'ossigeno per formare acidi cloridrici accelerando ulteriormente la corrosione del metallo.
Rimane, in ogni caso, significativa la composizione del tessuto vicino al sito del sensore e la presenza di fluidi biologici come sangue, linfa e altri liquidi corporei.

A titolo di esempio, sono riportati i riferimenti di un lavoro del 2017 in cui, per la produzione di sensori di temperatura flessibili e bioriassorbibili, sono stati usati una serpentina di magnesio di ampiezza 10μm, uno strato attivo spesso 250 nm e degli strati di biossido di silicio (SiO_2) e nitruro di silicio (Si_3N_4) a delimitarli (figura 3.1) [14]. Il magnesio è biocompatibile, si dissolve in acqua, è presente nel corpo umano, nel cibo e nei fertilizzanti agricoli ed è stato provato che il nitruro e il diossido di silicio sono biocompatibili e si dissolvono anch'essi in acqua.

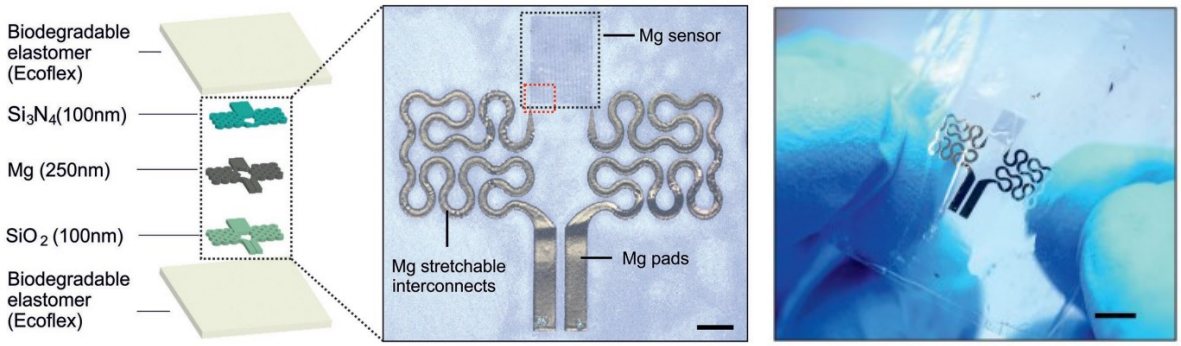


Figura 3.1 – Composizione del sensore stampato

Il dispositivo che si è ottenuto garantiva: tempo di risposta pari a 10 ms, variazione della resistenza inferiori allo 0.7% per ripiegamenti sotto il 10% e funzionamento elettronico stabile per 24 ore che è sufficiente per l'elettronica monouso. Siccome le tracce di magnesio si dissolvono in acqua deionizzata e in soluzioni saline (150mmol) a 25°C in rispettivamente 70 e 18 minuti, che è un tempo troppo breve per qualsiasi applicazione, è stato necessario incapsularle in una struttura di ECOFLEX, un polimero che verrà meglio analizzato nella sezione *3.2 - materiali dielettrici.*

Un'alternativa all'uso dei metalli conduttori è il PEDOT: PSS (miscela di poli 3,4-etilendiossitiofene e polistirensulfonato), un polimero trasparente e conduttivo che viene spesso usato nei circuiti stampati, in particolare in quelli flessibili.
L'uso del PEDOT: PSS è vantaggioso perché il polimero è più resistente e meno soggetto alla corrosione di altri metalli, soprattutto se confrontato con le tecnologie tradizionali di produzione dei circuiti stampati. Poiché presenta una conducibilità relativamente bassa, il suo utilizzo è particolarmente adatto per applicazioni a bassa frequenza e a bassa potenza come nel caso dei dispositivi elettronici indossabili. La sua degradazione può essere causata da vari fattori ambientali come l'esposizione alla luce, il pH, l'umidità e la temperatura elevata.

3.2 Materiali dielettrici

I materiali isolanti rappresentano la base di ogni circuito stampato formando uno strato che fornisce supporto e isola elettricamente le parti conduttive. Inoltre, essendo il principale costituente del dispositivo, al substrato è affidato il compito di definire le sue proprietà meccaniche.
La scelta della sua corretta composizione risulta cruciale per la biodegradabilità del dispositivo, processo che generalmente si verifica a causa dell'attacco di solventi, a temperature elevate o per effetto della radiazione UV o visibile attraverso reazioni di rottura enzimatica, idrolisi, ossidazione, termoossidazione o fotoossidazione. La selezione del dielettrico più adatto inoltre dipende dal tipo di applicazione. A tal proposito si rende necessario valutare parametri come gli ordini di grandezza di tensione e corrente a cui è sottoposto l'oggetto, la frequenza massima dei segnali registrati e trasmessi, la potenza sviluppata dai componenti e la quantità di calore da dissipare.

3.2.1 Caratterizzazione meccanica

Prima di elencare i principali materiali usati per la costruzione di sensori biocompatibili, è necessario introdurre alcuni parametri per la caratterizzazione meccanica dei materiali da tenere in considerazione nella loro scelta.
Per un corpo elastico soggetto a tensione meccanica, P, si definisce S, la sua deformazione:

$$\mathrm{P} = \frac{\mathrm{F}}{\mathrm{A}}[\mathrm{Pa}] \qquad \mathrm{S} = \frac{dl}{l}[-]$$

Nelle formule, F è la forza applicata sulla superficie, A, e l è la dimensione longitudinale dell'oggetto. La rigidità dell'oggetto viene definita dal rapporto fra la sollecitazione applicata e la deformazione che ne deriva:

$$Y = \frac{P}{S}[N/m^2]; \text{ modulo di Young}$$

Spesso, nelle applicazioni cliniche, è vantaggioso che Y sia simile a quello dei tessuti biologici che compongono il sito di impianto del sensore.

Viene definito inoltre il coefficiente di Poisson come opposto del rapporto tra la deformazione trasversale, dr/r, e quella longitudinale, dl/l, al seguito della sollecitazione.

$$\nu = -\frac{dr * l}{dl * r} \; [-]$$

Per descrivere le proprietà meccaniche di un oggetto si è soliti costruire un grafico Sforzo/Deformazione:

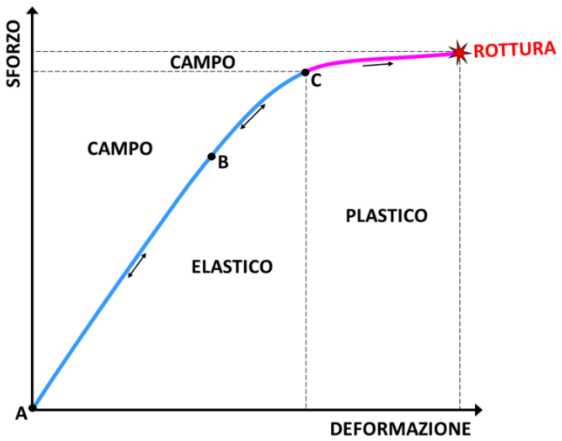


Figura 3.2 – Grafico sforzo/deformazione

Dal grafico è possibile individuare:

1. Una regione elastica, nella quale un oggetto sottoposto a tensione si deforma in maniera reversibile ovvero tornando allo stato iniziale qual' volta lo sforzo cessasse.
2. Una regione plastica, nella quale il materiale, se deformato, mantiene una modifica nella sua composizione anche se lo sforzo cessa.
3. La rottura del materiale, in corrispondenza del termine della curva.
4. Il modulo di Young, come coefficiente angolare della curva nella regione elastica.
5. La Toughness, rappresentata dall'area sottesa alla curva che quantifica la capacità del materiale di immagazzinare energia prima di rompersi

Si indica poi con il termine viscoelasticità la caratteristica di un materiale di presentare una curva sforzo-deformazione che dipende dal tempo o dalla frequenza della sollecitazione.
Altri parametri fondamentali sono i coefficienti di stiramento, di strappo, di rigonfiamento e di ripiegamento.
È bene considerare l'insieme di questi fattori perché il funzionamento dei circuiti viene assicurato solo per deformazioni entro precisi limiti strutturali. Se queste fossero eccessive, potrebbero potenzialmente comportare variazioni nella resistenza dei mezzi conduttori, generare maglie indesiderate a causa di contatti non previsti e danneggiare o rompere il substrato.

3.2.2 Principali materiali usati

In generale, è possibile identificare tre meccanismi principali di degradazione, un insieme di reazioni che decompone i polimeri in oligomeri o monomeri più piccoli:

1. La degradazione idrolitica, ovvero la rottura dei legami tra molecole ad opera dell'acqua;
2. La degradazione enzimatica, ovvero la rottura dei legami caratterizzata da enzimi;
3. La degradazione ossidativa, ovvero la disintegrazione delle macromolecole per azione dell'ossigeno con la conseguente formazione di radicali liberi.

Alcuni fattori strutturali possono influenzare la degradazione, fra questi l'idrofilia, che determina la tendenza di un materiale di rigonfiarsi di acqua, il peso molecolare, il numero di unità idrolizzabili, l'assenza di legami trasversali, la temperatura, il pH ambientale, l'ampiezza dell'area superficiale e la sua porosità.
Nel primo caso prima elencato, si distinguono la degradazione di tipo volumetrico e l'erosione superficiale.
Nella degradazione volumetrica, la velocità di diffusione dell'acqua è maggiore della velocità di idrolisi e ciò comporta la rottura non omogenea dei legami idrolizzabili del polimero con la conseguente perdita di massa non lineare nel tempo.
Quando si trattano polimeri idrofobi, invece, la velocità di diffusione dell'acqua nella matrice polimerica può essere significativamente inferiore a quella della rottura dei legami, per cui, questi materiali si degradano soprattutto mediante erosione superficiale con velocità di degradazione proporzionale all'area superficiale e perdita di massa lineare nel tempo.
Nel secondo caso elencato, la rottura idrolitica o ossidativa dei legami propri degli impianti esogeni è da imputare a specifici enzimi. Poiché l'attività enzimatica può variare da persona a persona, anche il tasso di degradazione risultante non è costante, rendendo difficile affidarsi per le applicazioni transitorie.
Nel terzo caso elencato, la degradazione avviene a partire dall'azione difensiva biologica intrapresa dalle cellule infiammatorie che generano antiossidanti che possono diffondere nel materiale da degradare [10].

I materiali biodegradabili con potenziali applicazioni elettroniche e transitorie possono essere di origine naturale o sintetica.
Grazie alla loro immediata disponibilità, polimeri naturali di origine animale, polisaccaridi di origine vegetale e altri composti naturali bio-organici, sono ampiamente studiati per essere impiegati nel substrato di dispositivi biodegradabili.
I polimeri naturali leggeri, a bassa densità e a basso costo come la cellulosa, il chitosano e la seta hanno buone proprietà chimiche e biodegradabili grazie ai loro elementi strutturali e funzionali unici.

3.2.2.1 Seta

Diversi animali, come i ragni e i bachi da seta, producono seta naturale che viene utilizzata dalla società umana da molto tempo anche a favore del basso costo.
Per le applicazioni sensoristiche, la seta trovata nei bozzoli del Bombyx mori, è particolarmente utilizzata per le sue caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità, resistenza, flessibilità, trasparenza, stabilità chimica e facilità di lavorazione che superano la maggior parte dei materiali biologici ed ingegneristici e la rendono ottima per applicazioni temporanee.
Questo materiale si compone principalmente di fibre di fibroina che forniscono la tipica resistenza meccanica mentre la sericina agisce come una colla proteica esterna. La struttura molecolare, che è responsabile della sua solubilità in acqua, può presentare cristalliti nanoscala.

La seta sta acquisendo popolarità per le sue applicazioni nei sensori elettrochimici, di umidità, di temperatura e di pressione.
Attraverso il trattamento con gli adeguati additivi, la sua struttura può essere alterata in modo tale da trattenere maggiori quantità di acqua formando così un idrogel conduttivo flessibile e trasparente che impedisce la formazione di cristalli.
Nella letteratura è possibile trovare riferimenti sull'impiego di tali materiali nella realizzazione di sensori di precisione per tracciare vari movimenti umani e monitorare molteplici segnali fisiologici come il movimento delle articolazioni, l'espressione facciale, il battito cardiaco e la respirazione [15].

3.2.2.2 Cellulosa

La cellulosa è uno dei biopolimeri più versatili del pianeta nonché il più abbondante.
Si tratta di un polisaccaride lineare composto da unità di D-glucosio tenute insieme da legami $\beta(1\rightarrow4)$.
Il suo grado di cristallinità e rigidità elevato è dovuto alla rete di legami idrogeno all'interno delle catene polimeriche che possono formarsi grazie alla presenza dei diversi gruppi ossidrilici (-OH).
Tra i vantaggi degli impianti in cellulosa si evidenziano: biocompatibilità, idrofilia, chiralità, alta trasparenza, flessibilità, bassa ruvidità superficiale e alta stabilità termica. La cellulosa inoltre è biodegradabile dai microorganismi e insolubile in acqua. Queste proprietà consentono di produrre e utilizzare i suoi derivati tra cui carta e plastiche. Inoltre, per soddisfare le esigenze di vari usi, il materiale

funzionalizzato con cellulosa può essere utilizzato in diverse forme, tra cui fibre, film, carta, aerogel e idrogel [15].

Oggi la cellulosa può essere ottenuta anche a partire da un processo fermentativo attuato da colture simbiotiche in modo del tutto naturale, che abbatte l'impatto ambientale sia nella produzione che nello smaltimento [16], ne sono un esempio i sensori indossabili di umidità e pressione basati su bioaerogel di grafene/cellulosa batterica biocompatibili per il monitoraggio wireless e l'avviso precoce della sindrome delle apnee notturne, sviluppati nel 2022 [17].
Combinando l'eccellente conducibilità del grafene e le alte proprietà meccaniche della cellulosa batterica, è stato possibile produrre un dispositivo in grado di misurare la pressione e l'umidità con eccezionali prestazioni (da 20 Pa a 30 kPa) unendo alta sensibilità e stabilità ciclica.

3.2.2.3 Amido

Anche l'amido, in quanto biodegradabile e bioriassorbibile, può essere utilizzato nell'elettronica sensoristica. Questo polisaccaride naturale è presente in molte piante, tra cui cereali, legumi e tuberi e si può estrarre, purificare e lavorare per ottenere un'ampia varietà di forme, tra cui pellicole, idrogeli e nanofibre.
Solitamente è proposto per le applicazioni di monitoraggio a lungo termine in cui il dispositivo di acquisizione dati deve essere lasciato all'interno dell'ospite per un periodo di tempo prolungato in seguito al quale va incontro a rottura enzimatica e conseguente formazione di glucosio che può essere riutilizzato dall'organismo. L'amido inoltre, può essere utilizzato come substrato per la crescita di cellule, il che lo rende un'ottima scelta per i sensori destinati all'uso in applicazioni biomediche [18].

3.2.2.4 Polimeri sintetici

Se i materiali di origine naturale sono da considerare per la loro reperibilità e la loro intrinseca tendenza a degradarsi via idrolisi, i polimeri sintetici offrono le importanti caratteristiche di riproducibilità e la possibilità di regolare le proprietà meccaniche ed elettroniche desiderate. Uno dei vantaggi principali è inoltre l'uniformità nella degradazione.

Tra i più utilizzati è possibile individuare:

- Poliesteri alifatici, come l'*acido polilattico* (PLA), l'*acido poliglicolico* (PGA) il *policaprolattone* (PCL) e l'*acido polilattico-co-glicolico* (PLGA). Sono noti per la loro resistenza meccanica, flessibilità, ampia disponibilità e facilità di lavorazione e vanno incontro a degradazione volumetrica in seguito alla produzione di sottoprodotti acidi che contribuiscono all'erosione mostrando tipicamente velocità di degradazione aumentate grazie ad un cambiamento locale del pH.

- Poliuretani, strutture dal backbone personalizzabile che vanno incontro a degradazione idrolitica. Alcuni esempi includono quelli a base di poliesteri, di policaprolattone, di poliesterammidi, di poliglicol e di proteine. Le loro caratteristiche dipendono dagli intermedi di reazione utilizzati nel processo di sintesi e consentono di ottenere consistenze rigide, elastiche, adesive o schiumose [8], [10].

Tutti i polimeri sintetici precedentemente citati sono biocompatibili e biodegradabili.

In precedenza, trattando dei metalli corrodibili, era già stato menzionato il polimero ECOFLEX.
Questo è un polimero sintetico, a base di poliuretano, ottenuto unendo amido di mais, di patata e acido polilattico ed è una delle poche plastiche biodegradabili che, per la sua composizione, è conforme alle direttive Europee e Americane sul contatto alimentare.
Dalle prove sperimentali, sembra evidente che l'ECOFLEX non modifica il processo di differenziazione e non altera l'attività metabolica delle cellule anche se non è possibile escludere categoricamente un lieve effetto citotossico o, almeno, un ritardo del processo di differenziazione.
Tra le sue proprietà si ritrovano: la resistenza all'acqua, allo strappo, la trasparenza alle radiazioni nello spettro del visibile ed un modulo di Young pari a 500 MPa che approssima quello del muscolo e della cartilagine umana [14]. Una rigidità tale è molto utile poiché è possibile costruire oggetti che possano interfacciarsi alle strutture molli dei tessuti biologici aderendo alla loro superficie senza la necessità di nastri o colle e per assecondare la deformazione derivante dalla deformazione multiassiale.

La soluzione proposta dall'articolo usava il polimero sia come substrato che come incapsulamento ed evidenziava che il sensore si dissolveva completamente in soluzioni saline 150 mmol a 25° in 67 giorni e presentava un coefficiente di rigonfiamento del 2.5% misurato come variazione di massa dopo aver lasciato un campione di (1 × 1 × 0,3) cm^3 in acqua a 25 °C per 24 ore [14]. È inoltre specificato che incapsulamenti più spessi ritarderebbero la dissoluzione in cambio di una riduzione della flessibilità.

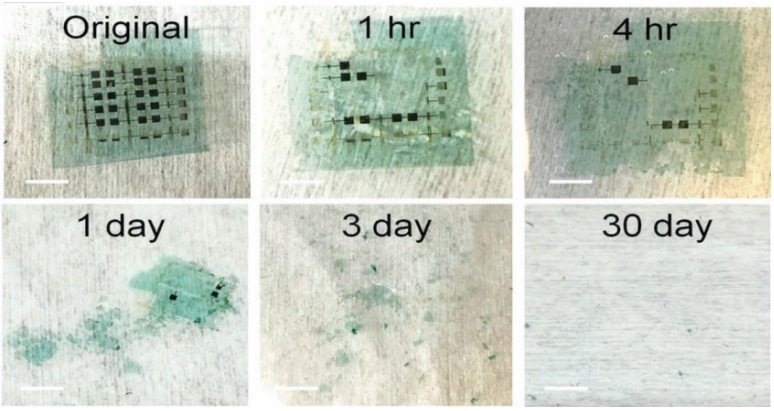


Figura 3.3 – Degradazione di un sensore stampato a diversi intervalli [10]

APPLICAZIONI DI SENSORI BIODEGRADABILI E BIORIASSORBIBILI

I materiali biodegradabili, compostabili e dissolvibili sono, oggi più che mai, sotto l'attenzione degli scienziati e dell'udienza pubblica a causa dei problemi collegati alla qualità del cibo, al cambiamento climatico e alla riciclabilità dei rifiuti. Nel campo dell'elettronica, gli impianti medico riassorbibili intelligenti costituiscono l'applicazione più immediata ma esistono altre opportunità di impiego che si vogliono qui sotto descrivere.
Tra i principali ambiti di interesse per l'applicazione di sensori biodegradabili vanno sicuramente menzionate: le applicazioni in ambito medico, ambientale, alimentare e l' integrazione in sistemi di Internet of Things.

In ambito biomedico i sensori biodegradabili trovano infinite applicazioni, tra cui il monitoraggio del paziente e dei suoi parametri vitali, la diagnostica medica quando vengono usati per rilevare la presenza di specifici marcatori, la terapia clinica poiché possono ricavare informazioni sull'efficacia dei trattamenti in corso e la ricerca dato che possono essere utilizzati per studiare la fisiologia e la patologia umana. I dispositivi in grado di deteriorarsi senza rilasciare prodotti nocivi per l'organismo stanno diventando sempre più importanti perché sicuri e versatili.

I sensori ambientali biodegradabili, ad esempio, sono dispositivi di monitoraggio progettati per raccogliere dati riferiti all'ambiente come temperatura, umidità e pressione. Tali strumenti possono essere utilizzati in ambienti sensibili o remoti come foreste e oceani dove il recupero può essere difficile e l'impatto ambientale significativo.
Fanno parte di questa categoria i sensori flessibili ottenuti stampando un inchiostro a base di carbonio su cellulosa, progettati nel 2021 per lo studio della qualità dell'acqua di laghi e fiumi che riescono ad individuare la presenza di inquinanti come arsenico e mercurio [20].

Anche le applicazioni nel campo dell'alimentare lasciano immaginare sviluppi rivoluzionari nei prossimi anni. I sensori biodegradabili possono essere utilizzati per tenere traccia della qualità e della sicurezza degli alimenti misurandone temperatura e umidità durante il trasporto e lo stoccaggio.
Ciò può aiutare a prevenire la proliferazione di batteri e altri microrganismi che possono causare la contaminazione del cibo e la sua alterazione. Questi strumenti possono anche essere utilizzati per rilevare la presenza di sostanze chimiche dannose negli alimenti come gas deterioranti, pesticidi o metalli pesanti.
Sviluppare sensori sottili e flessibili consente sia di integrarli al packaging che di farli aderire direttamente nel prodotto senza l'uso di collanti o nastri adesivi.

Questo sistema potrebbe contribuire ad alleggerire lo spreco alimentare fornendo informazioni ai consumatori sullo stato del cibo in ogni momento evitando che questo venga gettato se ancora sano.

Combinando diversi sensori in una configurazione matriciale è possibile ottenere dispositivi fluidici e microfuidici, degli oggetti intelligenti in grado di mappare il flusso di fluidi.
Strumenti tali sono implicati in diverse applicazioni quali l'analisi di campioni biologici, il tracciamento del trasferimento di calore e la misura della pressione su sezioni bidimensionali. Grazie alle loro dimensioni ridotte e alla capacità di manipolare piccole quantità di fluidi, i dispositivi microfluidici sono utilizzati anche per studi di biologia cellulare e di genetica.

Un'altra interessante possibilità di integrazione è offerta dalla combinazione di questi dispositivi nell'ambito delle tecnologie definite come *Internet of Things (IoT)*.
Con IoT, acronimo di Internet of Things, si intende un sistema di oggetti di uso quotidiano in grado di raccogliere e trasferire dati su una rete wireless senza bisogno dell'intervento umano. Ne fanno parte tutti i dispositivi a cui può essere associato un indirizzo IP.
L'organismo si compone di sensori che comunicano con il cloud, processori che elaborano i dati e attuatori che possono generare una risposta correlata alla decisione presa dal software di elaborazione come in un processo di retroazione.
La possibilità di associare dei biosensori ad altri dispositivi ed applicazioni è particolarmente utile poiché consente di processare un gran numero di dati in tempo reale e di sfruttarli efficacemente. Nel caso di misure fisiologiche è possibile ad esempio integrare i biosensori con altri dispositivi intelligenti come smartphone e tablet, offrendo ai portatori la possibilità di monitorare i propri parametri in modo comodo ed accessibile.
L'insieme di più dispositivi interconnessi rende possibile una divisione più netta dei task da portare a termine, permettendo di progettare sistemi più solidi, performanti e specifici per il compito prestabilito sfruttando al meglio le risorse e ottenendo complessità circuitali più elevate. In questo modo, inoltre, non si è limitati all'architettura di un singolo apparato elettronico ma è garantita una certa intercambiabilità nell'uso dei moduli più appropriati per raggiungere l'obbiettivo richiesto. In quanto autonomi, i moduli (hardware o software), possono essere migliorati e aggiornati periodicamente ottenendo così un numero di impieghi potenzialmente infinito.
L'approccio dell'Internet delle Cose offre inoltre varie opportunità per le applicazioni di nuova generazione in cui, secondo la tendenza attuale, il ruolo del machine learning e l'affiancamento all'intelligenza artificiale saranno fondamentali [19].

CARATTERIZZAZIONE DI SENSORI BIODEGRADABILI

La caratterizzazione di un sensore serve a definire le prestazioni del sistema di misura.
Tutte le specifiche del dispositivo devono essere necessariamente elencate nei suoi data sheet in modo tale da definire l'oggetto e facilitare il lavoro dei progettisti nella scelta del modello più adatto alle necessità del caso.

5.1 Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica è fondamentale per valutare la qualità della stampa. Saranno ora elencati i parametri più frequentemente valutati per definire le prestazioni dovute alla forma di un sensore stampato.
Le *dimensioni del sensore*, come la lunghezza, la larghezza e lo spessore, sono importanti per determinare la sua capacità di rilevare il segnale desiderato e per la sua integrazione in un sistema più ampio.
La *forma* del sensore può essere diversa, a seconda del tipo di sensore e delle sue applicazioni.
La *morfologia* del materiale utilizzato per la produzione del sensore può influenzare le sue prestazioni. Ad esempio, un materiale con una superficie ruvida può migliorare la sensibilità alla pressione.
La struttura interna del sensore, come la *disposizione* dei fili di conduttività o l'uso di elettrodi, può influenzare la sensibilità e la sua risposta.
L'*interfaccia* tra il sensore e il substrato o il materiale di *rivestimento* può influenzare la stabilità e la sua reattività.
I parametri sopracitati possono venire indagati avvalendosi di tecniche tra cui la *profilometria* e la *microscopia*.
La prima è una tecnica di misura della superficie che consente di analizzare la forma, le dimensioni e la rugosità della superficie di un oggetto per definire planarità, porosità, spessore o incisioni difettose nel sensore.
La seconda è un processo di analisi che consente di osservare oggetti di dimensioni molto piccole che viene utilizzata per valutare la presenza di difetti di adesione o porosità e per individuare eventuali contaminazioni sulla superficie del sensore. Permette anche di misurare le dimensioni delle particelle di inchiostro utilizzate nella stampa.

5.2 Caratterizzazione elettrica

La resistività e l'isolamento dei materiali sono due proprietà molto importanti che influenzano le prestazioni dei sensori stampati e che vengono studiate durante la fase di caratterizzazione elettrica. Questa può essere effettuata utilizzando strumenti di misura standard come l'oscilloscopio (figura 5.1-a), il generatore di segnali (figura 5.1 - b) e il multimetro (figura 5.1 - c) e può essere effettuata in

ambienti controllati come la camera anecoica o la camera climatica per valutare le prestazioni del sensore in diverse condizioni ambientali.

la *resistività* è misurata per determinare la capacità del materiale del sensore di condurre l'elettricità in modo affidabile. Per misurarla si utilizza un multimetro e si applica una tensione nota attraverso il corpo del sensore. La resistenza del materiale viene quindi calcolata utilizzando la legge di Ohm.

L*'isolamento* è una caratteristica importante perché previene le perdite di segnale elettrico e l'interferenza tra i sensori adiacenti. Può essere misurato mediante un tester di isolamento o un megohmmetro, che applica una tensione elevata attraverso il materiale e misura la corrente di perdita.

Figura 5.1 – Strumenti di laboratorio per misure elettriche

5.3 Caratterizzazione statica e dinamica

Le **caratteristiche statiche** si ricavano studiando la risposta del dispositivo in condizioni normali, nell'ipotesi di variazioni lente della grandezza misurata, in assenza di sollecitazioni esterne. Queste permettono di determinare una relazione tra input ed output del sensore che viene espressa attraverso la curva di taratura. Si vedono ora in rassegna alcuni dei parametri fondamentali che caratterizzano staticamente un sensore.

L*'accuratezza* quantifica di quando i valori misurati si possono discostare da quelli reali.

Il discostamento dal valore vero è legato a due fenomeni che sono definiti dalla norma ISO 5725.

Esattezza e *precisione* indicano rispettivamente la differenza tra il valore riportato dal sistema di misura e quello reale e la ripetibilità in misure indipendenti.

Una scarsa esattezza è solitamente dovuta ad un errore sistemico e può essere migliorata definendo un valore di offset che serve a correggere tutte le misure. Una cattiva precisione può essere dovuta all'errore casuale e deve essere gestita aumentando il numero di misure.

Un buon sensore presenta una buona accuratezza in tutto il campo di lavoro, ossia per ogni valore del misurando in uno specificato range.

La *linearità* descrive quanto la curva di taratura reale si discosta da quella ideale.

Per ogni strumento si determinano il *campo di misura*, ovvero l'intervallo entro cui l'ingresso è misurabile rispettando le specifiche dello strumento e la *massima deviazione di linearità* nel campo di misura.

Quando la curva di taratura reale si differenzia dalla curva ideale pur descrivendo una relazione lineare tra misura e misurando si fa riferimento alla *deriva*. La deriva può essere dovuta all'invecchiamento dei componenti dello strumento o ad altri segnali in ingresso al sistema di misura.
Si distingue in deriva di zero (o di offset), che è caratterizzata da una curva parallela a quella ideale ma traslata lungo l'asse delle ordinate, e in deriva di sensibilità (o di guadagno), in cui la curva reale presenta un coefficiente angolare diverso da quello della curva ideale.
Il modo più immediato per considerare l'errore del sensore è definire la sua *fascia di incertezza* che rappresenta la massima deviazione dalla retta di riferimento. Per individuare la fascia di incertezza è necessario svolgere una taratura completa, che comprende due o più cicli di taratura, ciascuno ottenuto con una prova sull'intero range del sensore per valori crescenti e decrescenti.
La *sensibilità* è la pendenza locale della curva di calibrazione.
La *risoluzione*, in ingresso, è la minima soglia di incremento del misurando necessario a notare una variazione nell'output e, in uscita, è la minima variazione misurabile sull'output del sensore.
Il *limite di detection* è la più bassa misura che un sensore può effettuare con un'opportuna certezza.
L' *isteresi* è un fenomeno dovuto a forze dispersive a causa delle quali il comportamento del sensore per misure in cui il misurando cresce è diverso dai casi in cui decresce.
La *ripetibilità* è la capacità di riprodurre la stessa uscita quando è applicato lo stesso ingresso, consecutivamente, nelle stesse condizioni operative e nella stessa direzione.

Le **caratteristiche dinamiche** descrivono il comportamento del sensore in condizioni di variazioni rapide dell'ingresso specificando in particolare il suo tempo di risposta.
Analogamente a quanto è stato fatto per le caratteristiche statiche si discuteranno ora le principali caratteristiche dinamiche dei sensori.
La *risposta nel tempo* descrive il comportamento del dispositivo in risposta ad una variazione istantanea della grandezza di ingresso.
Si individuano il *tempo di risposta*, ovvero il tempo in cui l'uscita si avvicina al valore finale a meno di una percentuale sufficientemente piccola, il *tempo di salita*, ossia il tempo in cui l'uscita va dal 10% al 90% del valore finale e la *costante di tempo*, il tempo in cui l'uscita raggiunge il 63% del valore finale.
Per sistemi di ordine superiore al primo è necessario definire i tempi caratteristici degli eventuali fenomeni di sovraelongazione, sottoelongazione e smorzamento.
La *risposta in frequenza* descrive il comportamento del sistema nel dominio delle frequenze.
Si definisce il guadagno come rapporto fra l'ampiezza di uscita e di ingresso in funzione della frequenza e lo sfasamento come differenza di fase tra ingresso ed uscita nello spettro.
Altri valori da considerare sono la *larghezza di banda (passante)* con cui si indica l'intervallo di frequenza entro il quale, a parità di sollecitazione di ingresso, le variazioni relative dell'uscita si mantengono entro un limite predefinito, la *frequenza di taglio* con cui si indica la frequenza che delimita la banda passante, la *frequenza di picco* ovvero la frequenza per cui il guadagno è massimo e il suo valore detto *valore di picco*.

La rappresentazione matematica che consente di determinare l'uscita di un sistema dinamico dato il suo ingresso è detta *funzione di trasferimento* ed è definita come rapporto tra la trasformata di Laplace dell'uscita e quella dell'ingresso, considerando condizioni iniziali nulle.

5.4 Caratterizzazioni ambientali e di stabilità

La caratterizzazione ambientale testa il comportamento del sensore in condizioni non normali di operatività, definendo le variazioni dovute a sollecitazioni esterne.
Il primo problema a cui far fronte è che il segnale elettrico di uscita dipende non solo dalla grandezza di ingresso, ma anche da un certo numero di grandezze di influenza, i cui effetti sono di solito difficilmente quantificabili.
A tal proposito si definiscono *ingressi desiderati* gli ingressi che si vogliono prendere in considerazione nella misura, ingressi *indesiderati* quelli che si presentano solitamente nella stessa forma del misurando ma che non sono parte di esso e perciò sono da escludere dalla misura e *ingressi modificanti* quelli che introducono un errore non facilmente distinguibile nella misura.
Nella sezione dedicata alla caratterizzazione ambientale, sono solitamente riportati gli effetti di variabili esterne come la temperatura o della presenza di agenti chimici nel sito di utilizzo del sensore, l'affidabilità del prodotto, il tempo medio tra i guasti, il tempo medio al degrado e la vita media dell'oggetto poiché non si vuole che l'oggetto si degradi prima del necessario o non sia più affidabile.

Nel caso di sensori simili a quelli trattati la caratterizzazione ambientale acquisisce particolarmente importanza poiché il tempo, l'umidità, e la temperatura possiedono una forte influenza sulle performance dello strumento e sulla finestra temporale in cui è possibile utilizzarlo. La conoscenza di queste informazioni può aiutare a migliorare la progettazione del sensore e a identificare le eventuali problematiche ambientali associate alla sua produzione e allo smaltimento, senza contare che è fondamentale per garantire la sicurezza dell'ambiente e delle persone che lo utilizzano.

5.5 Studio ed impiego del segnale

È possibile condurre misure su diverse classi di segnali, ciascuna caratterizzata dalle peculiarità della grandezza fisica in questione, costruendo così sensori di temperatura, di forza, di concentrazione ionica e molti altri. Un segnale è sempre prodotto da un sistema o da un suo sottosistema e contiene informazioni sulla sua fonte. Si considerano segnali biologici i segnali che sono effetto dell'attività di un sistema biologico.
Si è soliti inoltre classificare questi fenomeni in elettrici o non elettrici sulla base della grandezza che li descrive.

Nella teoria dell'informazione il sensore è un mezzo imprescindibile per:

- *Monitoraggio*, visualizzazione dei dati;
- *Predizione*, stima di una legge che possa definire il comportamento immediato del sistema considerato;
- *Classificazione*, individuazione della classe a cui attribuire il segnale;
- *Generazione di allarmi*, al superamento delle soglie critiche;
- *Memorizzazione* e *analisi retrospettiva*, analisi a posteriori su periodi di tempo estesi;
- *Trasmissione*, trasferimento dei dati per renderli disponibili da remoto;
- *Controllo*, attraverso sistemi a retroazione.

ATTIVITÀ SPERIMENTALE

6.1 Sensori per Electro Chemical Cells Impedence Spettroscopy

Tra i settori di maggiore interesse nell'impiego di sensori bioriassorbibili vi è sicuramente quello delle neuroscienze. La possibilità di poter vigilare da remoto pazienti affetti da disturbi cronici o in riabilitazione post-operatoria è sempre più vicina alla realtà. Studi recenti infatti affermano che attraverso dispositivi miniaturizzabili, iniettabili o ingeribili, sarà possibile fornire diagnosi in real-time e determinare l'iter di cura più adatto e mirato.
La sperimentazione si sta concentrando sul monitoraggio di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Morbo di Parkinson e la Sclerosi Multipla dove il bisogno di conoscere la progressione della patologia, anche attraverso lo studio della salute delle cellule celebrali, è di interesse primario.

Nel 2021, un team di neurochirurghi della Washington School of Medicine in St. Louis, in collaborazione con gli ingegneri della University of Illinois, ha progettato un sensore wireless piccolo quanto la punta di una matita e riassorbibile dall'organismo, che permette di monitorare pressione, temperatura e altri parametri vitali direttamente all'interno del cranio. Questo è stato impiantato nel cervello di sei topi e ha registrato l'attività neuronale per tutta la durata della loro vita.
È stato provato che il sistema stampato su PLGA si integra con l'animale senza provocare danni a livello cellulare ed è riassorbito dall'organismo dopo un breve periodo di funzionamento rivelando l'evoluzione dell'attività dei singoli neuroni associata all'invecchiamento [21].

Un metodo discusso nella letteratura che consente di monitorare i processi relativi alle colture cellulari come l'adesione, la crescita, la motilità e la differenziazione e che, dati gli stupefacenti risultati nei test in vitro, sta prendendo piede negli ultimi anni è l'*ElectroChemical Cells Impedence Spettroscopy* (ECIS).
Questa metodologia può essere applicata ad una vasta gamma di cellule, anche non eccitabili, rappresentando quindi una soluzione potente rispetto ai sistemi di misurazione basati sul potenziale e più economica di applicazioni come il tracciamento dei nuclei e lo studio dell'attività metabolica [22].
Vengono proposte applicazioni che includono l'uso di sensori analoghi nella farmacologia, nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria tissutale. Dispositivi di questo tipo promettono feature in tempo reale ed alta sensibilità.
La ECIS è una tecnica NON invasiva basata sulla misura dell'impedenza atta al monitoraggio delle popolazioni cellulari. La sua prima comparsa risale agli anni 90, con la produzione di sensori che presentavano sia elettrodi nella configurazione interdigitata che monopolare. Ad oggi sono più frequenti quelli del primo tipo che si sono dimostrati i più adatti. Dal secolo scorso, si è lavorato per rendere queste applicazioni biocompatibili e flessibili così da poter condurre misure dinamiche sottoponendo le

cellule a cicli di carico e scarico. Tra i materiali oggi impiegati si ritrovano il carbone e il PEDOT: PSS come inchiostri conduttivi e vari tipi di substrato come PCL e Nitrocellulosa.

Il principio di funzionamento della ECIS si basa sulla misura dell'impedenza elettrica delle cellule che si definisce come la resistenza al passaggio di una corrente alternata attraverso un circuito elettrico modellato sulla struttura microscopica cellulare. La misura dipende dalle proprietà elettrochimiche dell'interfaccia tra l'elettrodo e la soluzione elettrolitica.
Quando una cellula viene sollecitata con una corrente sinusoidale, si genera una tensione variabile che viene utilizzata per calcolare l'impedenza elettrica e le sue variazioni nel tempo e in funzione della frequenza propria della corrente che viene utilizzata. In questo modo si è in grado di misurare la qualità della barriera cellulare e supervisionare la proliferazione cellulare e la motilità.
È interessante notare che la frequenza 4 kHz sembra essere la più sensibile per le linee cellulari più frequentemente utilizzate perché l'interferenza di cavi e fonti è minima. Va comunque sottolineato che le migliori condizioni di lavoro possono essere diverse a seconda della morfologia delle specifiche cellule [23].
Nel concreto si è soliti misurare l'impedenza sia prima della semina cellulare (su un medium come la poli-l-lisina) che dopo, in modo che, disponendo di un valore di riferimento, si possano correlare le variazioni delle proprietà elettriche con l'adesione, la crescita e il differenziamento cellulare.
Il risultato dell'impedenziometro viene poi espresso come modulo relativo di impedenza (RI) calcolato come:

$$\mathrm{RI} = [(|\mathrm{Z}|_{\text{con cellule}} - |\mathrm{Z}|_{\text{senza cellule}})/|\mathrm{Z}|_{\text{senza cellule}} * 100].$$

Per comprendere i risultati dei test è necessario introdurre i *modelli elettrici equivalenti* della cellula e del sistema di misura. Nella letteratura sono riportati diversi schemi cellulari equivalenti, di complessità crescente, sviluppati a partire da considerazioni microscopiche [24].
Negli studi che si vedranno in seguito, si è preso come circuito rappresentativo un parallelo RC: R_{cell} è dovuto alla struttura interna e fornisce informazioni utili sull'effettiva adesione delle cellule, sulla loro vicinanza e sulla presenza di giunzioni strette mentre C_{cell} o C_{dl} è dovuto alla presenza della doppia membrana fosfolipidica ed è un parametro sensibile al numero di cellule, o agli strati che queste formano, in grado di fornire un feedback sull'aumento del loro volume.

Negli articoli che saranno riportati successivamente, è stata per prima cosa modellata la struttura equivalente dei sensori non seminati e a posteriori si è aggiunto il contributo elettrico cellulare posto in serie a R_{medio}, la resistenza dovuta alla soluzione in cui sono state riposte le cellule.

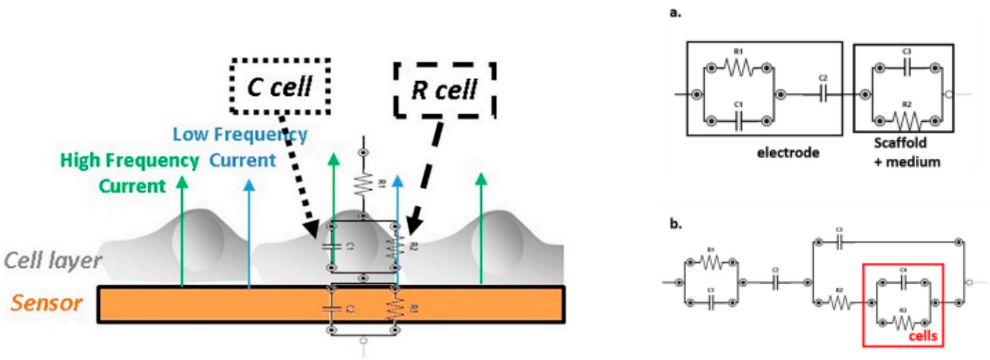


Figura 6.1 – Equivalente elettrico

La figura 6.1 mostra come la cellula e la strumentazione di indagine vengono schematizzate nelle misure di impedenza. (a) Schema di elettrodo e scaffold con medium privo di cellule, (b) medesima struttura dopo la semina cellulare [9].

I parametri del circuito equivalente sono solitamente determinati attraverso le alterazioni spettrali su modulo e fase dell'impedenza mediante l'uso si un apposito software.
Dagli studi in vitro, sembra che la capacità e la resistenza che si ricavano dai modelli di circuiti equivalenti siano fortemente legati al numero e al volume delle cellule attive durante il processo di proliferazione.

La figura 6.2 mostra un tipico studio dell'impedenza sulle diverse frequenze; sono rappresentati i valori di modulo e fase dell'impedenza sulle diverse frequenze. Si confrontano le misure per i sensori seminati e non seminati [9].
Nel dettaglio:

- L'aumento di R_{cell} è dovuto alla riduzione dei percorsi paracellulari disponibili per la corrente a bassa frequenza, quando l'impedenza della parete cellulare è massima. Questo fatto suggerisce un'effettiva adesione delle cellule.
- L'evoluzione di C_{cell} può essere invece correlata al numero di cellule e ai loro cambiamenti morfologici dovuti al processo di differenziazione.

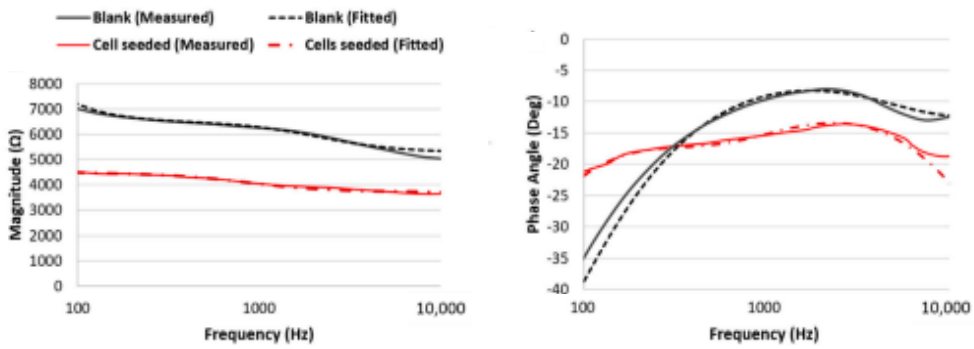


Figura 6.2 – Impedenza sulla frequenza

Attraverso la sperimentazione si giunge alla conclusione che RI è maggiore alla frequenza in cui le cellule bloccano il flusso di corrente in modo più efficace, cioè agendo come isolante.
Questa dev'essere preferita per le misure di impedenza perché porta a esiti maggiormente significativi.

L'analisi viene poi estesa sul tempo confrontando confrontano i valori di modulo e fase in diversi momenti.

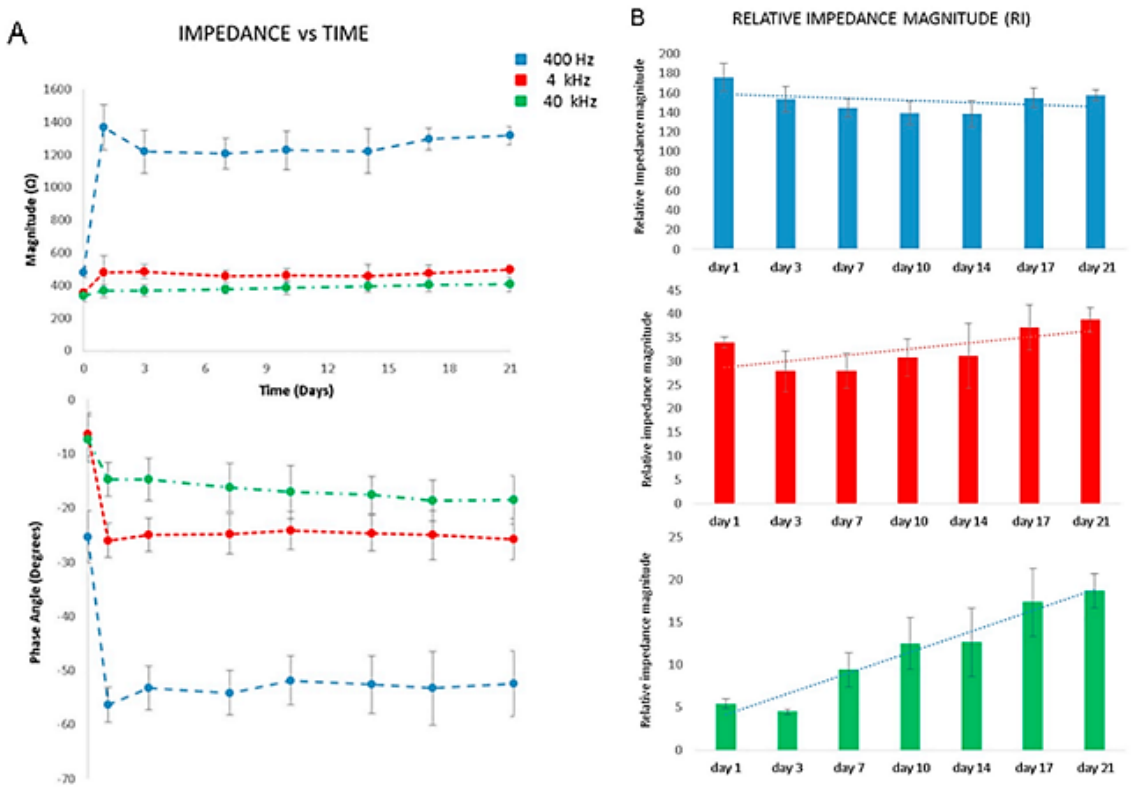


Figura 6.3 – Impedenza per le diverse frequenze durante la differenziazione

Nella figura 6.3, nei 21 giorni necessari alla differenziazione cellulare, è mostrato: lo studio dinamico dell'impedenza e le sue variazioni (A) e la variazione dell'impedenza relativa calcolata per ciascuna delle frequenze valutate (400 Hz – blu, 4 kHz – rosso e 40 kHz – verde) (B).

L'approccio appena descritto, associato alla riproduzione delle condizioni che mimino l'ambiente a cui sono sottoposte le cellule nei tessuti viventi, svolge un ruolo fondamentale nel migliorare l'efficacia dei test sui farmaci e sull'ingegneria tissutale [25]

Nella letteratura compaiono diversi report che hanno sfruttato questa tecnica per la ricerca, ne è un esempio lo studio condotto nel 2019 da un team di ricercatori dell'università di Brescia in cui si è indagato il possibile utilizzo di sensori di impedenza, in condizioni di misura sia statica che dinamica, per monitorare l'adesione cellulare durante la deformazione ciclica del substrato.

In particolare, sono stati utilizzati sensori citocompatibili e stretchabili, stampati con la tecnica a getto di inchiostro a base di carbonio su supporti in polietilene reticolato, per monitorare il processo di differenziazione dei miociti del miocardio in presenza di stimoli meccanici [23].

Per l'occasione, il substrato stretchabile, che si costituisce di fibre reticolate orientate casualmente a base di PCL con una sezione di circa 2μm, è stato ottenuto mediante elettrofilatura, un processo produttivo elettrodinamico che consente di ottenere filamenti di diametri di qualche micron. Grazie a questi accorgimenti è stato possibile produrre un materiale spesso solamente 50 μm. Gli elettrodi interdigitati, con dimensioni dell'ordine inferiore al centimetro, sono poi stati stampati su rettangoli pretagliati in PCL. I sensori sono stati completati con un inchiostro a base di nanoparticelle di carbonio permettendo una resistenza del foglio compresa tra gli 800 e i 2000 Ω/sq. La scelta dell'elettrofilatura è stata funzionale affinché la struttura reticolata del polimero mantenesse la sua morfologia fibrosa anche mentre veniva riscaldata al di sopra della sua temperatura di fusione (55°C) per completare la procedura di stampa.

Per le verifiche sperimentali, i sensori, dopo essere stati opportunamente lavati con una soluzione salina, intrisi degli additivi necessari al fissaggio delle cellule e sterilizzati, sono stati soggetti al controllo della citocompatibilità. I risultati ottenuti dalla spettroscopia di impedenza sono poi stati confrontati e confermati attraverso dei particolari microscopi in grado di individuare dei coloranti marcatori fluorescenti usati sulle cellule. Le misure sono state condotte una volta rimosso il medium, lavato il pozzetto e aggiunto un agente di riparazione cellulare.

I sensori sono stati sottoposti ad analisi preliminari in condizioni statiche, atte ad acquisire modulo e fase dell'impedenza in frequenze prestabilite, e in seguito si sono condotte le misure dinamiche caratterizzate da deformazioni percentuali crescenti.

In condizioni statiche, i risultati hanno confermato l'ipotesi di poter correlare l'adesione cellulare ad un cambio di impedenza. La variazione più significativa dell'impedenza (circa 2 kΩ) si è verificata per frequenza dell'ordine dei 10^3 Hz.

Per lo studio in condizioni dinamiche, ci si è avvalsi di un sistema per sollecitare meccanicamente i sensori comprensivo di un'interfaccia grafica per valutare il carico e di un *impedence analizer* per poter monitorare i cambiamenti di impedenza nel tempo per un set di specifiche frequenze.

Per l'acquisizione si è utilizzato un apposito software e l'analizzatore di impedenza è stato programmato per acquisire ad otto livelli di frequenza per ogni ciclo (nello specifico 400, 1000, 4000, 10 000, 40 000, 100 000, 400 000 e 1 000 000 Hz). Il ciclo si ripeteva ogni 250 ms per una durata di 2 s.

In diverse concentrazioni cellulari, si sono misurati diversi aumenti sul modulo dell'impedenza in maniera proporzionale al numero di cellule presenti nel sensore sull'ordine del kΩ. È stato possibile in questo modo verificare un aumento significativo della magnitudo dell'impedenza e un cambiamento verso un comportamento simile a quello capacitivo della fase, sia in condizioni statiche che dinamiche, provocato dell'adesione delle cellule. Dai dati sperimentali è risultato che è possibile utilizzare la soluzione precedentemente descritta per ottenere informazioni sull'adesione cellulare e sulla concentrazione delle cellule registrando un incremento dell'impedenza di circa 80 mΩ (cell/cm^2).

In un lavoro simile, attraverso la spettroscopia di impedenza è stato anche possibile analizzare in modo non distruttivo la crescita, l'adesione e la differenziazione in vitro di cellule derivate da un adenocarcinoma del colon-retto umano una neoplasia maligna dell'intestino crasso [9].
La linea cellulare Caco-2 è stata proposta come modello per studiare il meccanismo di assorbimento a livello intestinale ed è obbiettivo comune standardizzare tecniche come questa in alternativa ad altre più complesse e costose in vitro.
Tramite l'innovativa tecnica dell'Aerosol Jet Printing, sono stati prodotti sensori dotati di elettrodi interdigitati tondi in carbonio dalla traccia conduttiva larga 50 µm poggiati su di un substrato di poliammide dal diametro di 14 mm e lo spessore di 20 µm.
I materiali sono stati scelti per ottenere dei dispositivi citocompatibili e resistenti ai processi di sterilizzazione e il design è valido per effettuare misure su ampiezze dell'ordine di misura della singola cellula (10 µm). I dispositivi così ottenuti erano flessibili e in grado di combinare l'efficacia in termini di costi e di tempi, con possibilità massima di personalizzazione sulla forma geometrica e sulla performance elettrica garantendo alta risoluzione e alta ripetibilità, caratteristiche fondamentali per un dispositivo di acquisizione di dati biologici.

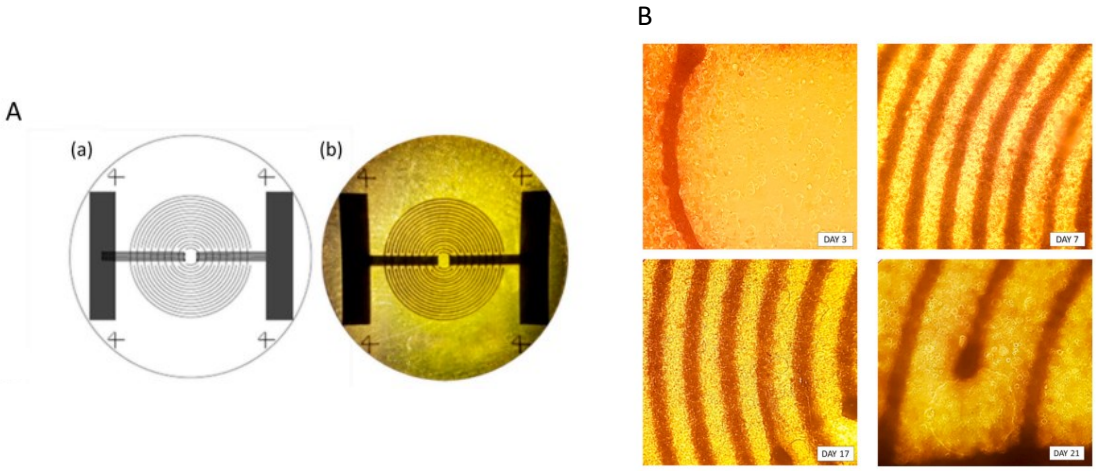


Figura 6.4 – Geometria del sensore stampato

La figura 6.4 riporta la geometria del sensore stampato ottimizzata con AutoCAD 2017 (Aa) e l'immagine del sensore acquisita al microscopio (ingrandimento 1×) (Ab). Sono in seguito raffigurate delle immagini rappresentative della valutazione delle cellule Caco-2 a 3 – 7 – 17 – 21 giorni dalla semina, durante il protocollo di differenziazione di 21 giorni. L'immagine del giorno 21 risulta sfocata per visualizzare meglio le cupole [9].
Sollecitando le cellule con correnti di una gamma di frequenze comprese tra 400 Hz e 50 kHz si è potuto studiare il loro comportamento durante tutto il processo di differenziazione di 21 giorni.
In un primo momento, dopo la semina cellulare, un significativo aumento del modulo dell'impedenza (1 kΩ alla frequenza 400 Hz) e una diminuzione dell'angolo di fase (-30°) hanno suggerito una buona

adesione delle cellule ai sensori che hanno agito come uno strato isolante e hanno costretto la corrente a bassa frequenza a fluire intorno ai corpi cellulari attraverso vie paracellulari.
Nei giorni seguenti si verificano invece cali nell'impedenza ad alta frequenza poiché la corrente inizia a passare attraverso la popolazione cellulare che proliferando si sta espandendo.
Tra il giorno 15 e il giorno 21, si ha un aumento della RI che conclude con un plateau suggerendo la formazione efficace di uno strato di cellule confluenti e aderenti a confermare il termine della differenziazione cellulare.

Nei lavori precedentemente citati, tutte le misure sono state effettuate a diversi intervalli temporali prima e dopo la semina cellulare per azzerare eventuali bias, valutare le differenze fra le cellule sane e fissate e ottimizzare l'impostazione delle misure. Inoltre, è stato importante testare i campioni con diversi sensori per valutare la ripetibilità.

Al giorno d'oggi è anche possibile produrre dispositivi 3D, migliorando così gli scaffold per la medicina rigenerativa sviluppando metodi non invasivi per il monitoraggio ininterrotto della proliferazione cellulare [26]. Ne sono un esempio i sensori utilizzati per studiare la crescita di cellule stromali mesenchimali umane (hMSC) in impalcature di idrogeli ibridi gelatina-chitosano [27]. Le hMSC sono state segnalate come promotori della riparazione del tessuto grazie a diverse caratteristiche chiave, come la loro capacità di migrare verso i tessuti danneggiati, la loro azione immuno-modulatoria e il loro effetto trofico [28].
L'uso degli idrogeli è intelligente poiché sono in grado di imitare la matrice extracellulare nativa (ECM). In particolare, la gelatina e il chitosano sono stati ampiamente utilizzati per le applicazioni di ingegneria tissutale, poiché sono biocompatibili, biodegradabili, non antigenici, non tossici e presentano attività antimicrobica.
Per ottenere sistemi 3D è necessario affrontare nuove sfide tecniche.
Dato che il materiale di supporto agisce come isolante tra i microelettrodi e il campione, alterando in maniera significativa l'impedenza misurata, si deve fare in modo di rendere il supporto conduttivo o di monitorare le proprietà dielettriche delle cellule e del supporto introducendo elementi conduttivi esterni a contatto con il supporto stesso. Anche se la prima opzione sarebbe più conveniente, ulteriori ricerche sono ancora necessarie per ottenere soluzioni in grado di offrire lo stesso effetto positivo che i supporti non conduttivi possono fornire allo sviluppo delle cellule.

La figura 6.5 ritrae il setup per il monitoraggio basato sull'impedenza delle cellule stromali mesenchimali umane (hMSC) seminate in un'impalcatura ibrida di idrogel tridimensionale.
Impalcatura ibrida di idrogel e sensori stampati ad aerosol-jet (AJP) (a), cap per le misurazioni sterili (b), configurazione finale per le misurazioni (c) [27].

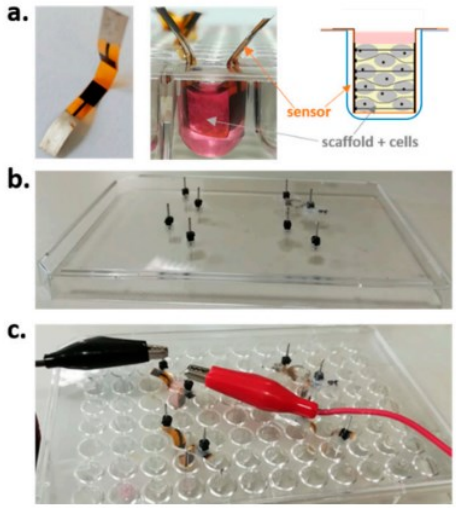


Figura 6.5 – Setup per lo studio dell'impedenza

I risultati, riassunti nella figura 6.6 [27], hanno mostrato un aumento del modulo e una diminuzione della fase (massime variazioni assolute di 2.5 kΩ e 9°) e un aumento esponenziale delle componenti di resistenza e capacità del modello a causa della proliferazione cellulare (massime variazioni assolute di 1,5 kΩ e 200 nF). In particolare, per quanto riguarda la capacità, un aumento del 0,01% nella progressione della proliferazione cellulare ha comportato un cambiamento positivo di 6,5 nF. Per quanto riguarda la resistenza, un aumento del 0,01% nella progressione della proliferazione cellulare ha comportato un cambiamento positivo di 51,6 Ω.

Concentrazioni più elevate (500.000 e 1.000.000 cellule/scaffold), nonostante mostrassero una crescita rapida durante la prima settimana, sembravano raggiungere la saturazione dopo 14 giorni.

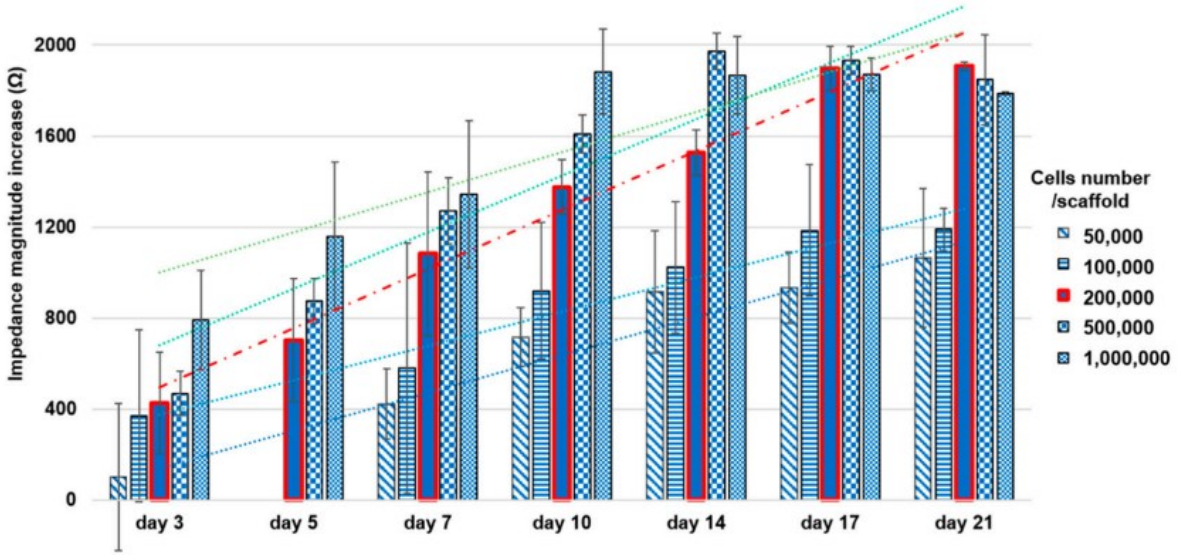


Figura 6.6 – Risultati dello studio

Quelli appena elencati costituiscono degli esempi di materiali che hanno ottenuto un esito positivo in quanto citocompatibili e non soggetti a deformazioni indesiderate.

Sensori come i precedenti non sono bioriassorbibili ma costituiscono una solida base di partenza per sviluppare dei nuovi oggetti con potenzialità nel campo del monitoraggio in vivo continuo e sicuro.
Sono testimoniati anche ulteriori campi di applicazione della ECIS tra cui l'indagine delle terapie antitumorali, il monitoraggio della guarigione delle ferite, la valutazione della citotossicità, la caratterizzazione del tessuto ischemico, la misura del comportamento reologico del sangue e altri ancora [29], [30].

6.2 Caratterizzazione di sensori per EICS biodegradabili

Con lo scopo di muovere i primi passi verso sensori per ECIS bioriassorbibili, sono state progettate due tipologie di sensori interdigitati, una di tipo standard in argento e l'altra usando un mezzo conduttore bioriassorbibile, il PEDOT: PSS.

6.2.1 Materiali e metodi

I sensori del primo tipo sono stati stampati usando una stampante *Inkjet Dimatix*, di casa *FujiFilm*, che ha depositato una soluzione di nanoparticelle di argento in un solvente organico (*I40DM-106* prodotto da *Silver PVNanocell*) su di un substrato di polimide selezionato, il *Kapton*, che offre massima flessibilità in applicazioni in vitro o in vivo (figura 6.7 - a). La stampante sfrutta la tecnologia piezoelettrica a getto di inchiostro in cui un attuatore di tipo piezoelettrico, che può far variare lo spazio tra le sue armature mediante un controllo in tensione, modifica rapidamente la sezione della camera di pompaggio.
Il composto conduttivo è caratterizzato da elevata conducibilità e ottima adesione su substrati flessibili.

Quelli della seconda tipologia sono stati disegnati, usando un pennello molto fine, per far aderire il PEDOT: PSS (Polimetil(3,4-etilendiossitiofene)-poli(stirensolfonato)), prodotto da *Aldrich*, su *IJ-220*, un substrato per l'elettronica stampata a base di PET prodotto da *Novele* ed ideato per applicazioni in cui sono richiesti basso costo, basse temperature e trasparenza (figura 6.7 - b). La pellicola è stata scelta poiché favorisce deposizione uniforme e forti adesioni.

Dopo aver esposto i processi di misura a cui sono stati sottoposti i dispositivi, verranno confrontati i risultati ottenuti per oggetti standard, analoghi a quelli portati ad esempio nel paragrafo (6.1), con quelli ricavati per i nuovi sensori parzialmente bioriassorbibili.

a

b

Figura 6.7 – Sensori studiati: a. Sensore in argento, b. Sensore in PEDOT: PSS

Per le misure sono stati usati tre sensori in argento che presentavano la parte sensibile di forma rettangolare con lati di misura variabile tra 0.5 cm e 1.5 cm. Tutti i sensori presentavano tracce conduttive e spazzi tra i segmenti interdigitati di 0.1 cm. Sono stati esaminati diversi campioni per dimostrare come un cambiamento nella geometria comporti variazioni sui risultati.
I due sensori disegnati con inchiostro di PEDOT: PSS presentavano entrambi un elemento sensibile di area 3.5 x 2.8 cm e i segmenti interdigitati e gli spazi tra questi di 0.3 cm. Uno dei due sensori (S2_PEDOT:PSS) è stato utilizzato subito dopo aver completato un processo di curing a temperatura ambiente mentre l'altro (SC_PEDOT:PSS) è stato utilizzato a seguito di un processo di curing mediante riscaldamento su una piastra metallica a 70 °C per 40 minuti.

Le prime misure sono state effettuate cospargendo l'elemento sensibile del sensore con circa 500 ml, per i sensori in argento, e il triplo, per quelli in PEDOT: PSS, di una soluzione ottenuta diluendo una singola capsula di PBS (NaCl: 137 mM, KCl: 2.7 mM, Na2HPO4: 10 mM, KH2PO4: 1.8 mM) in 100 ml di acqua milli-Q. Si è proseguito risciacquando i sensori e asciugandoli con l'aria compressa prima di ricoprirli con un coating di gelatina al 10% (w/v). Il preparato in polvere è stato disciolto in un apposito becher, disposto sulla parte interdigitata ancora liquido con l'ausilio di una pipetta e poi fatto addensare in frigorifero per 25-30 minuti.
La sostanza gelatinosa è stata scelta per mimare la il contributo dei tessuti biologici in quanto biocompatibile, modellabile, trasparente e strutturalmente simile all'ECM, risultando così, una volta funzionalizzata, ottima come letto di adesione per le cellule stesse, oggetto di future indagini.
Al fine di tenere le soluzioni confinate sull'elemento sensibile si è fissato il sensore su un supporto flessibile e si è utilizzato un nastro adesivo molto spesso per contornarlo.

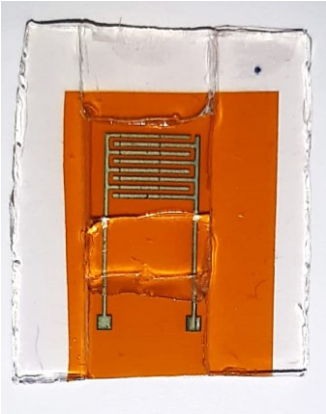


Figura 6.10 – Uso del nastro adesivo

Per quanto riguarda il setting di misura, le analisi di impedenza elettrochimica sono state effettuate attraverso lo strumento *SI 1260 impedence/gain-phase analyzer (solarton)* utilizzando la configurazione a due elettrodi e usando un segnale sinusoidale a valor medio nullo con ampiezza di picco 10 mV. Il sistema era controllato tramite il supporto del software MATLAB mediante cui si sono potuti imporre i seguenti valori: range di frequenza tra 1 e 100 KHz, da 10 a 20 punti di acquisizione per decade di frequenza, da 0.7 a 1.5 s come tempo di integrazione e delay variabile tra 3 e 5 secondi.
Per ogni condizione sono state effettuate tre misure, consentendo di valutare la ripetibilità, e la stessa condizione è stata poi ripresentata su più sensori.
Vengono descritti i parametri di misura, dati in input attraverso MATLAB. Per la prima misura: 10 points, P int time 1.5, P delay time= 0.1, P wait time = 5; per la seconda misura: 10 points, P int time 0.7, P delay time= 0.1, P wait time = 3; per la terza misura; 20 points, P int time 1, P delay time= 0.5, P wait time = 4.

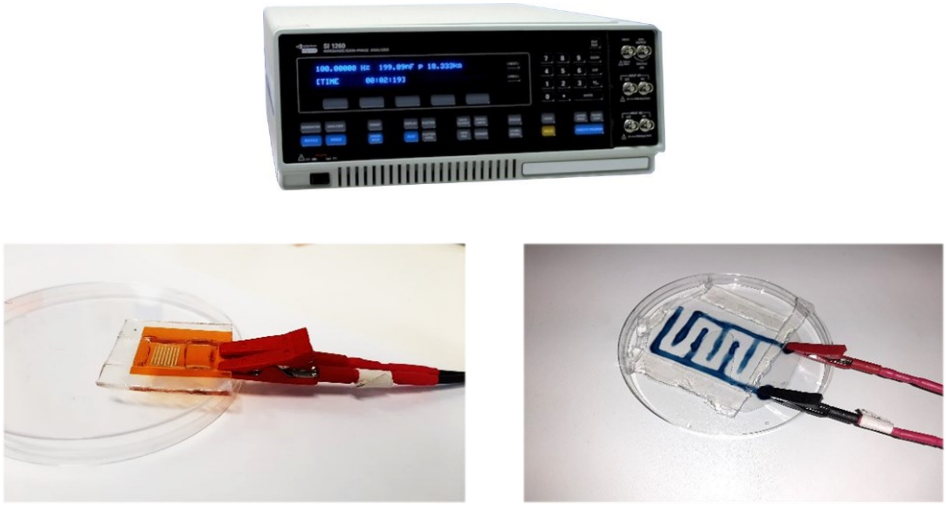


Figura 6.8 – Strumenti e setting di misura

Dopo aver esportato i dati su un foglio di calcolo excel, è stato scritto uno script MATLAB per la loro visualizzazione sotto forma di diagramma di Bode ed è stato usato il software EISSA1 per operare il loro fit su dei circuiti elettrici equivalenti prestabiliti (EEC) che potessero individuare un modello di circuito corrispondente al sistema elettrochimico riuscendo a fornire uno spettro simulato d'impedenza che riproducesse fedelmente i dati sperimentali.
Il grafico di Bode è uno strumento fondamentale nello studio EICS poiché fornisce una rappresentazione visiva delle proprietà dell'impedenza del sistema elettrochimico in funzione della frequenza, consentendo di ottenere informazioni quantitative e qualitative sul comportamento del sistema elettrochimico analizzato riguardo non solo alla ripetibilità delle misure e alla stabilità dei sensori ma anche sull'analisi delle componenti reattive, sull'identificazione dei processi di trasporto, sulla valutazione dell'effetto degli elementi circuitali, sulla caratterizzazione dell'interfaccia elettrodo/elettrolita e sul monitoraggio delle variazioni del sistema nel tempo.

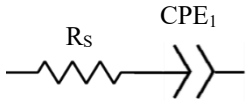
Al fine di modellare gli ostacoli alla conduzione, come la resistenza al trasporto di carica in soluzione, la diffusione all'elettrodo della specie che deve reagire, la reattanza capacitiva del doppio strato all'interfase tra elettrodo e soluzione e la sovratensione per il trasferimento elettronico tra molecola ed elettrodo, gli EEC considerati, oltre ai classici bipoli ti tipo passivo, come resistori ($Z_R(j\omega) = R$) e condensatori ($Z_C(j\omega) = -j\frac{1}{\omega C}$), potevano integrare anche parti meno comuni tra cui:

Elemento a fase costante (CPE)
Grazie alla funzione di trasferimento più flessibile, è in grado di rappresentare al meglio diverse interfacce elettrochimiche e capacità non ideali come il comportamento capacitivo dei doppi strati biologici ($Z_{CPE}(j\omega) = \frac{1}{(J\omega)^{\alpha} \cdot Q}$). Il parametro α, impedenza di fase, si presenta come un numero reale appartenente all'intervallo da 0 ad 1 e descrive l'andamento del CPE nella risposta in frequenza determinando lo sfasamento; ad $\alpha = 0$ si associa il comportamento del condensatore ideale, ad $\alpha = 1$ quello tipico dei resistori e ad $\alpha = -1$ quello dell'induttore. Il parametro Q è detto resistenza di scambio ed è una costante in $F\ cm^{-2}\ (jw)\ \varphi^{-1}$.

Elemento di Warburg (Z_W)
Risulta utile alla descrizione dei processi diffusivi ovvero dove il trasferimento di massa delle specie chimiche attraverso l'interfaccia elettrodo/elettrolita diventa limitante poiché le specie chimiche coinvolte nel processo elettrochimico devono diffondere attraverso uno strato di prodotti di reazione o attraverso uno strato di elettrolita poco conduttivo. La sua impedenza è descritta da $Z_W(j\omega) = \frac{A_W}{(J\omega)^{0.5}}$.
A_W è un parametro specifico dell'elemento e si misura in $\sqrt{\Omega * s / rad}$.

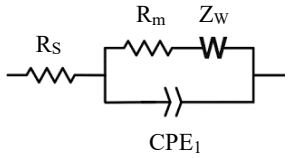
Ciò ha consentito di dare luogo ai due EEC utilizzati:

(1) Serie tra resistore ed CPE:



$$Z = Z_R + Z_{CPE} = R_S + \frac{1}{(J\omega)^{\alpha} \cdot Q}$$

(2) Cella di Randle:



$$Z = R_s + \frac{R_m + \frac{A_W}{(jw)^{0.5}}}{1 + Q \cdot (jw)^{a} \cdot \left(R_2 + \frac{A_W}{(jw)^{0.5}}\right)}$$

La presenza di R_S è rappresentativa dell'impedenza dovuta alla soluzione salina e dei contatti, CPE_1 modella l'interfaccia con l'elettrodo e il doppio strato fosfolipidico mentre l'elemento di Warburg è indicativo del il trasporto di massa e della diffusione all'interfaccia elettrodo/elettrolita.

Le tipologie di comportamento, o componenti reattive, che si possono individuare sono tre: diffusiva, induttiva e capacitiva. Conoscendo le funzioni di trasferimento dell'impedenza di tutti i componenti è possibile individuare i singoli contributi nel diagramma di Bode.

Il comportamento *diffusivo* si presenta con una regione del modulo a pendenza negativa ed un plateau corrispondente al valore di 45° nella fase. È tipico del processo di trasporto di specie chimiche, come la diffusione di ioni o molecole attraverso un elettrolita e, come precedentemente affermato, è descrivibile mediante l'elemento di Warburg.

Il comportamento *induttivo* è associato alla presenza di un induttore nel circuito. Nel grafico del modulo è possibile individuare una regione con pendenza positiva. A basse frequenze, l'impedenza è relativamente bassa, mentre ad alte frequenze, l'impedenza aumenta.

Il comportamento *capacitivo* si manifesta come una regione con modulo di impedenza con pendenza negativa ovvero alta per frequenze basse e inferiore per le alte.

La fase dell'impedenza sarà negativa (-90 gradi) a basse frequenze e si avvicinerà a zero gradi a alte frequenze. Questo perché a basse frequenze il condensatore si comporta come un circuito aperto e il segnale è sfasato di 90 gradi rispetto alla tensione applicata. Man mano che la frequenza aumenta, il condensatore reagisce come un condotto per la corrente, diminuendo il ritardo di fase fino a raggiungere zero gradi.

Ai comportamenti appena descritti si aggiunge quello *resistivo* che, in quanto non dipendente dalla frequenza, si presenta come una sezione a pendenza zero nel modulo e fase sempre nulla.

Per ogni modellizzazione sono stati riportati i parametri caratteristici di tutti i componenti dei circuiti fra cui R ([Ω]), resistenza caratteristica del resistore, α ([-]), impedenza di fase, Q ([F cm^{-2} (jw) φ^{-1}]), resistenza di scambio, e A_W ([$\sqrt{\Omega * s / rad}$]), parametro specifico dell'elemento.

6.2.2 Risultati

Sensori in argento

I risultati ottenuti hanno innanzitutto permesso di confermare una buona stabilità dei sensori sia con PBS che con un coating di gelatina, a simulare la presenza cellulare, individuando altresì delle differenze tra le due condizioni.

Nella figura 6.9, i grafici riportano, per un singolo sensore, tre misure ripetute eseguite con solo PBS (a sinistra) e tre misure ripetute sullo stesso sensore ricoperto con uno strato di gelatina (a destra).
Si evidenzia che la massima RSD calcolata tenendo conto delle tre misure è del 12.8% per il modulo e del 25.9% per la fase, con solo PBS, e 5.7% per il modulo e 6.6% per la fase, dopo il coating.
L'aggiunta di gelatina può essere correlata con un aumento del modulo dell'impedenza, e con un cambiamento della forma della fase, caratterizzato da un picco attorno ai 20 Hz, compatibile con il contributo capacitivo dello stesso strato superficiale aggiunto.

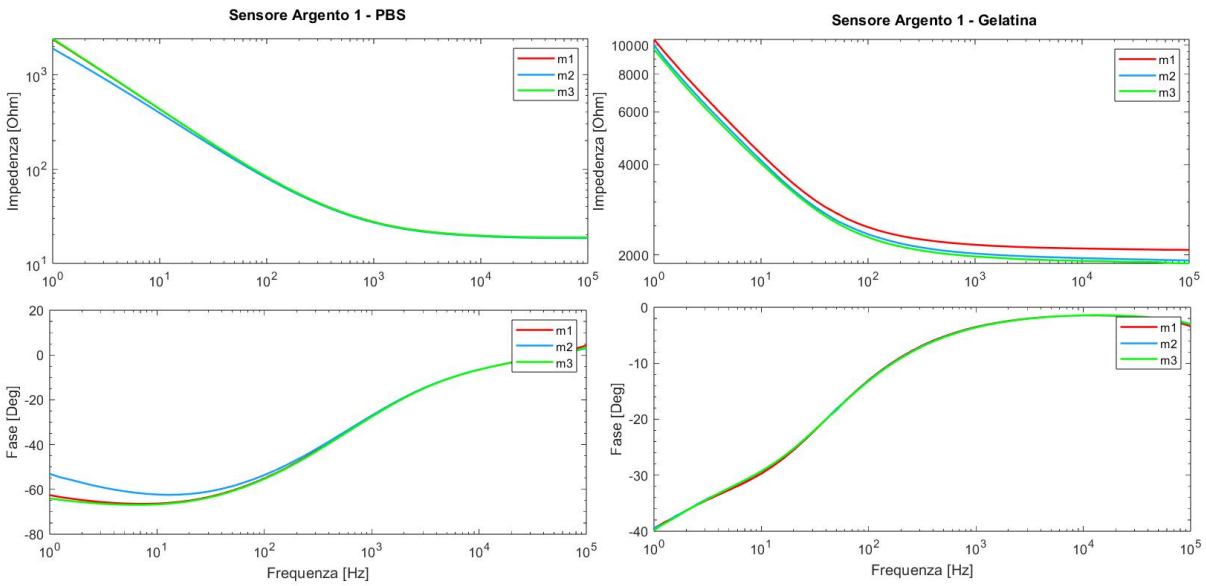


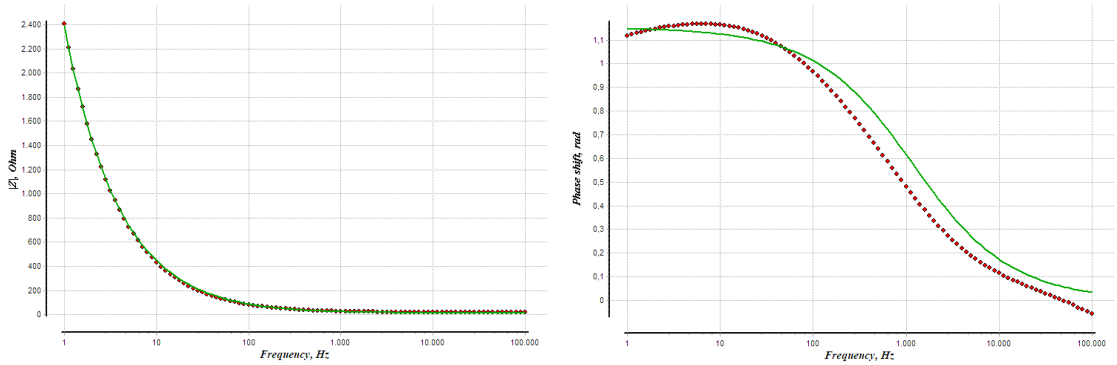
Figura 6.9 – Analisi della sensibilità di S1_Argento

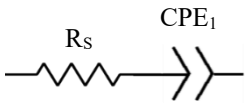
Nella figura 6.10 si riportano gli andamenti dello spettro di impedenza della seconda misura sul sensore S1_Argento sovrapposti al fit operato tramite il software *EISSA1*. Si presti attenzione al fatto che lo sfasamento è espresso in radianti.

Per la modellizzazione si è usato il circuito EEC1 costituito di una serie tra una resistenza (R_S) e un elemento a fase costante (CPE_1) caratterizzato dai valori indicati in tabella.

Si nota che la traccia conduttiva metallica presenta un comportamento ottimale, molto vicino a quello atteso in assenza di fenomeni indesiderati come la diffusione permettendo così la schematizzazione in un circuito di complessità minima.

La resistenza R_S agisce infatti restituendo un offset sul valore del modulo dando luogo ad un asintoto orizzontale ($y = R_S$) per le frequenze che tendono a infinito senza influenzare la fase che presenta il comportamento caratteristico dei fenomeni capacitivi, descritto nel paragrafo precedente.



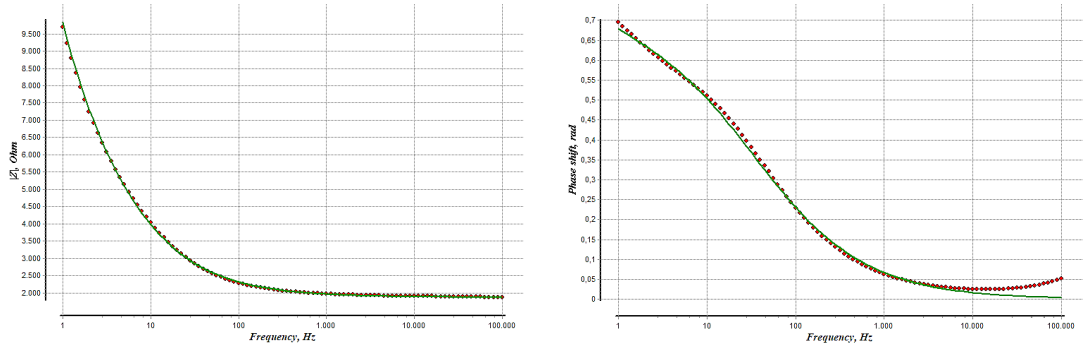


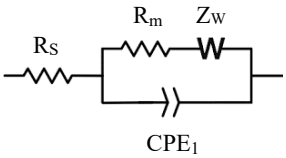
Param.	R_S	Q_1	α_1
Valore	18.71	1.03 E-4	0.75
Errore %	1.18	1.21	0.19

Figura 6.10 – Fitting e circuiti equivalenti a S1_Argento, misure in PBS

Per le misure con gelatina, si riportano nel grafico 6.11 i risultati del fit su EEC2, più complesso del precedente, per integrare il contributo del coating.

L'andamento generale è molto simile a quello della figura 6.10, con predominanza dei fenomeni di tipo capacitivo e resistivo testimoniati da valori simili di Q_1 e di gran lunga superiori per le resistenze R_S e R_M che fanno sì che il modulo dell'impedenza sia maggiore già dalle basse frequenze e si stabilizzi intorno ai 2000 Ω alle alte. Questa differenza in termini di valori di resistenze è in accordo con la presenza dello strato isolante di gelatina. In aggiunta, il miglior fitting ottenuto introducendo l'elemento di Warburg, caratterizzato da un coefficiente elevato che dimostra la presenza di fenomeni diffusivi dovuti proprio allo strato di gelatina.





Param.	R_S	R_m	Aw	Q_1	α_1
Valore	1871.80	10920	28528	2.58 E-5	0.63
Errore %	0.60	6.70	5.60	1.17	0.47

Figura 6.11 – Fitting e circuiti equivalenti a S1_Argento, misure in Gelatina

Nella figura 6.12 sono riportati nello stesso grafico gli andamenti riguardanti la terza misura di ogni campione ed è quindi sottolineato come una diversa geometria possa influenzare lo stesso spettro di impedenza.

In particolare i tre sensori in argento differivano per le superfici degli elementi sensibili che erano rispettivamente di 1x1.5 cm, 1x1 cm e 0.5x1 cm per S1_Argento, S2_Argento e S3_Argento.

È possibile osservare che, per quasi tutti i grafici, si presenta una non linearità in corrispondenza dei 100Hz e vi sono tutte le ipotesi necessarie ad affermare che si tratta di un errore sistematico causato dallo stesso strumento di misura.

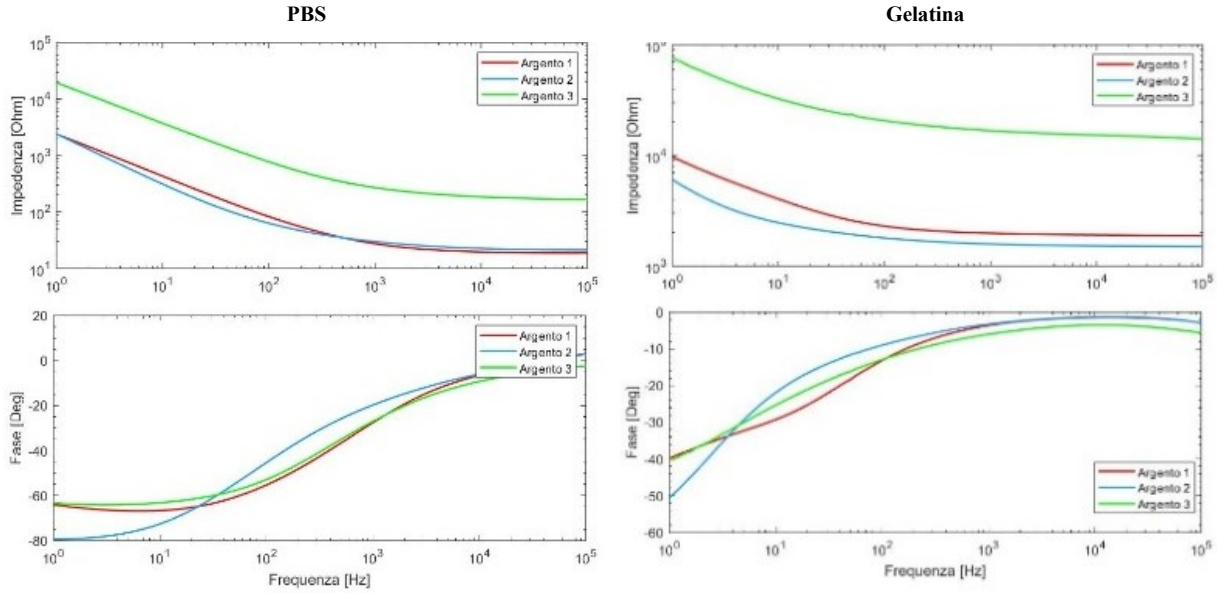


Figura 6.12 – Confronto tra tre diverse geometrie di sensori interdigitati in argento

Sensori in PEDOT: PSS

Le misure di impedenza eseguite sui sensori in PEDOT: PSS (figura 6.13) hanno confermato la possibilità di utilizzare i sensori, ottenuti con il polimero degradabile, in ambiente acquoso per il monitoraggio di diverse condizioni di coating superficiale.

Per quanto riguarda il sensore sinterizzato a temperatura ambiente, dal punto di vista della stabilità, eseguendo successive misure si è potuta calcolare una RSD massima del 5.8% per il modulo e del 9.8% per la fase, nelle misure con PBS, e del 8.9% per il modulo e del 19.4% per la fase, nelle misure con gelatina.

Tali valori risultano simili a quelli ricavati per i sensori in argento, indicando che è possibile ottenere una buona ripetibilità anche utilizzando il PEDOT: PSS.

Il confronto tra la condizione senza e con coating mostra una differenza nel modulo, in termini di ampiezza, che risulta nel secondo caso molto più elevata (due ordini di grandezza) pur presentando lo stesso andamento. Per quanto riguarda la fase, invece, oltre a mostrare un'inversione della concavità, il grafico presenta una profonda valle attorno ai 100 Hz e in genere una differenza assoluta fra il valore massimo e minimo molto più marcata (circa 6° con PBS contro i quasi 37° con gelatina).

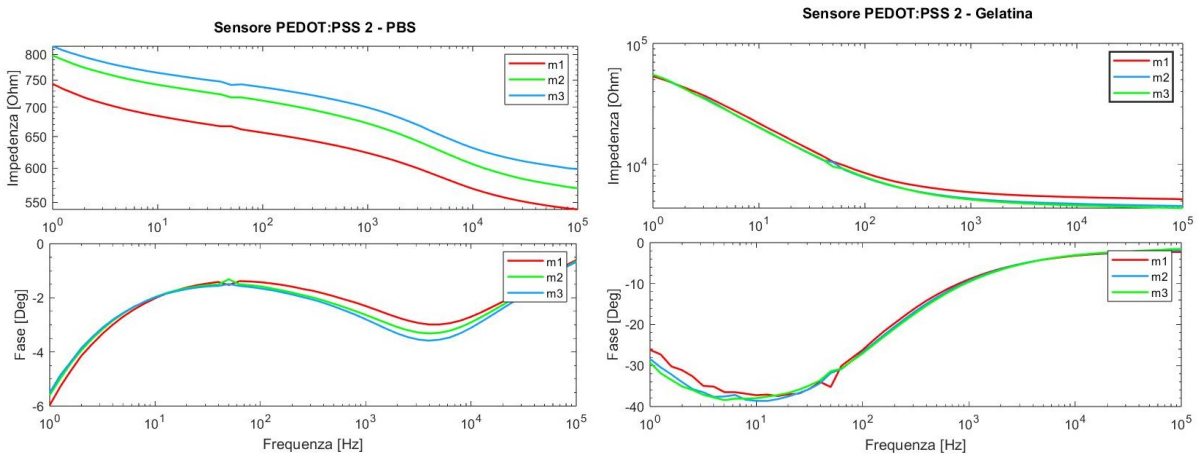


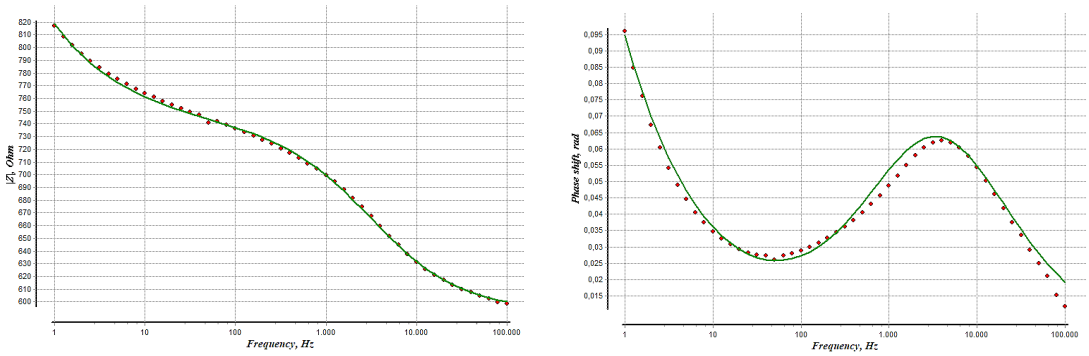
Figura 6.13 - Analisi della sensibilità di S2_PEDOT:PSS

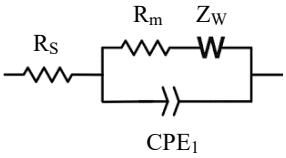
I dati dell'analisi sul sensore S2_PEDOT:PSS in PBS sono riassunti nella figura 6.14.

Il modeling migliore, diversamente da quanto ottenuto con i sensori in argento è stato ottenuto mediante il circuito EEC2 e non EEC1; ciò dimostra come l'uso del PEDOT: PSS presenti delle differenze dovute alla natura intrinseca del polimero il quale con può essere modellato come un conduttore ma pituttosto come un semiconduttore.

I valori dei parametri evidenziano un calo della componente resistiva, comunque presente, una bassa componente diffusiva e la permanenza di quella capacitiva.

Dal grafico della fase è possibile individuare un chiaro picco attorno ai 10 kHz, tipicamente presente nell'utilizzo della cella di Randle, utilizzata per modellare il comportamento del sensore in PEDOT:PSS con soluzione di elettrolita PBS. Tale comportamento è legato all'interazione tra gli elettroliti presenti all'interno del PBS e gli strati più superficiali dell'inchiostro semiconduttore, fenomeno non presente nel caso dei sensori in argento.





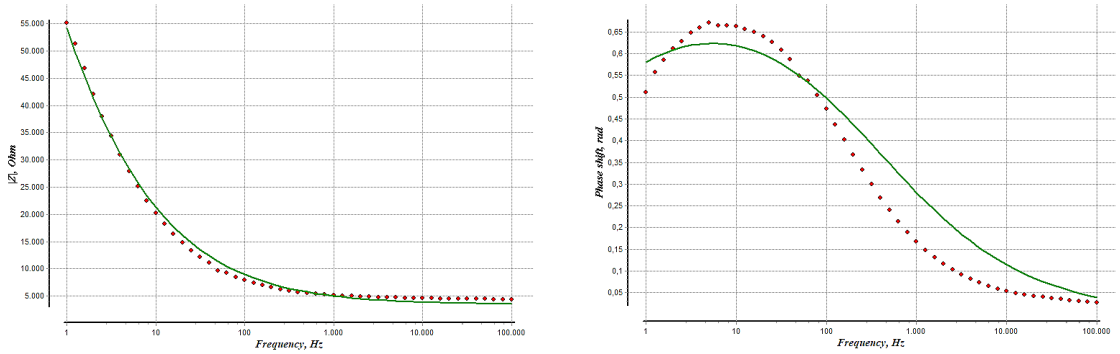
Param.	R_S	R_m	Aw	Q_1	α_1
Valore	591.68	148.50	192.43	1.1 E-05	0.65
Errore %	0.16	0.89	2.58	2.57	4.21

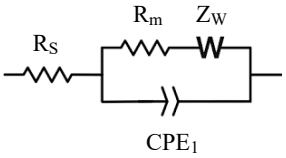
Figura 6.14 - Circuiti equivalenti a S2_PEDOT:PSS, misure in PBS

Allo stesso modo dei sensori in argento con coating di gelatina si schematizza il sensore S2_PEDOT:PSS con il coating di gelatina nell'EEC2.

Il valore elevato del coefficiente di Warburg conferma la presenza di fenomeni diffusivi sia all'interno dello strato di gelatina, che all'interno degli strati superficiali dell'inchiostro in PEDOT:PSS come già evidenziato nel fitting di fig. 6.14. La principale differenza è legata alla frequenza alla quale tali fenomeni si verificano; un esempio il picco che, rispetto alla condizione con PBS (individuabile a 10 kHz) si è spostato attorno ai 100 Hz. Ciò dimostra l'aumento di tali fenomeni anche a frequenze più basse, dovuto verosimilmente al sommarsi del contributo diffusivo nell'elettrodo a quello nella gelatina.

I valori dei parametri riassunti nella tabella evidenziano un crollo della componente resistiva, probabilmente legato a una diminuzione del PBS utilizzato, mentre rimangono alti i valori associati ai comportamenti capacitivi e diffusivi che si fanno conferma della presenza dello strato isolante di gelatina permeabile al PBS.





Param.	R_S	R_m	Aw	Q_1	α_1
Valore	1.13 E-12	3465.8	1.15 E5	4.55 E-6	8.94
Errore %	###	12.34	2.64	11.49	###

Figura 6.15 - Circuiti equivalenti a S2_PEDOT:PSS, misure in Gelatina

Per quanto riguarda il sensore sinterizzato a 70 °C, si noti che il comportamento del sensore SC_PEDOT:PSS nella misura m3 è fortemente diverso da quello osservato nelle precedenti e ciò può essere verosimilmente attribuito alla fuoriuscita della soluzione tampone dalla zona sensibile che ha causato un calo sul volume rispetto alle condizioni iniziali.
Attraverso questo esempio è ben visibile un limite di queste misure che sono soggette alla precisione con cui il nastro contenitivo è stato applicato e al tempo necessario alla misura in quanto questo man a mano che il tempo scorre perde aderenza al substrato.

Dal punto di vista della stabilità, eseguendo successive misure si è potuta calcolare per il sensore 1 una RSD massima del 1.2 % per il modulo e del 4.5 % per la fase, nelle misure con PBS, e del 4.3 % per il modulo e del 10.5 % per la fase, nelle misure con gelatina e PBS.
I dati riportati non hanno tenuto conto della terza misura con SC_PEDOT:PSS con PBS che risultava anomala.
Tali valori risultano di gran lunga inferiori sia rispetto a quelli ricavati per i sensori in argento che per quelli visti nel caso di curing del sensore a temperatura ambiente. Tale risultato rende evidente come, portando il sensore alle alte temperature prima del suo utilizzo, questa accortezza possa migliorare la ripetibilità e quindi la sensibilità per le future applicazioni.
Si osserva che il modulo dell'impedenza misurata nelle prime due analisi con SC_PEDOT:PSS è per tutto lo spettro inferiore a quello ricavato per S2_PEDOT:PSS con massima differenza assoluta di circa 500 Ω per le frequenze nulle. Non si notano sostanziali differenze nella fase ad esclusione della perdita di pochi gradi tra le 10^3 e le 10^4 Hz che non è presente per il sensore SC_PEDOT:PSS.
Il confronto tra la condizione senza e con coating mostra che tutta l'ampiezza del modulo che era stata persa dopo il curing a 70° C nelle misure con PBS, viene recuperata nelle misure con gelatina e, a parità

di frequenze, nel sensore SC_PEDOT:PSS se ne ha una decrescita più lenta rispetto a quella riscontrata per S2_PEDOT:PSS.

Il comportamento della fase ricorda quello visto per i sensori in argento con in aggiunta un crollo della stessa dopo le 10^4 Hz.

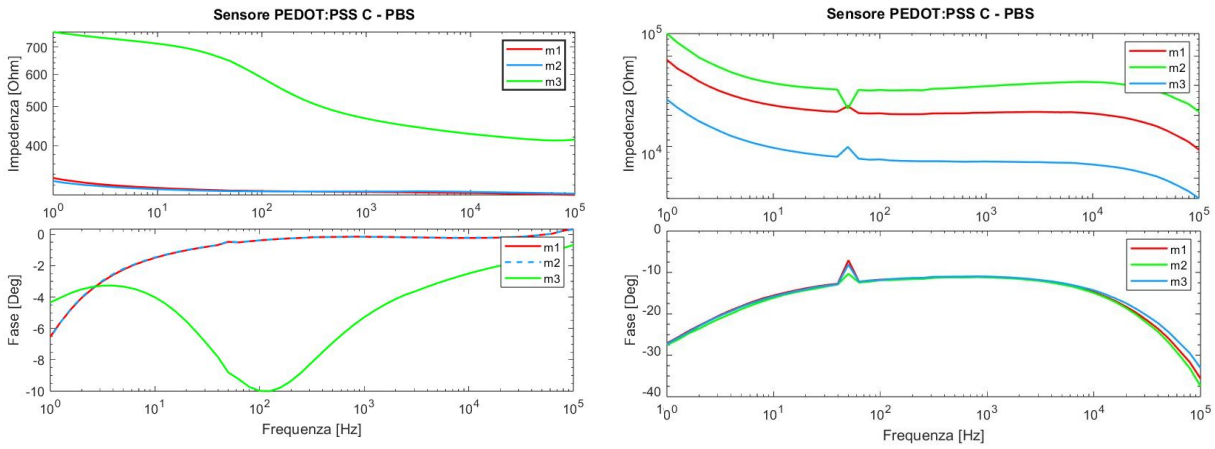
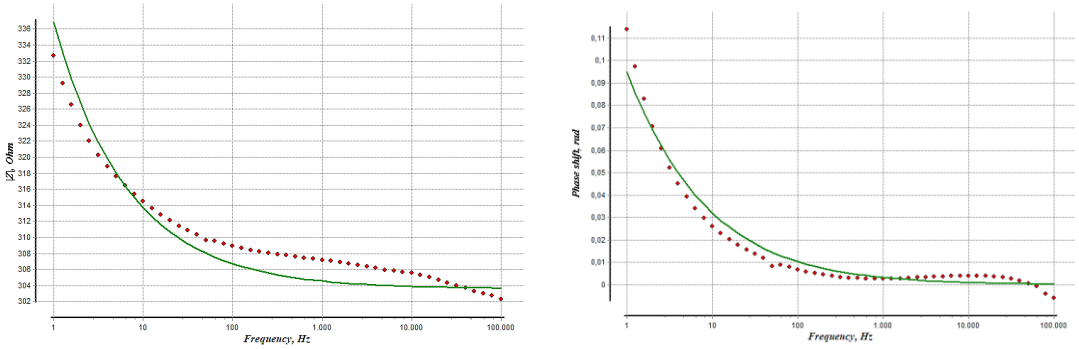
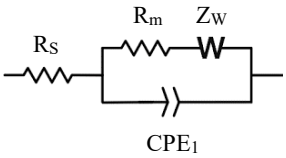


Figura 6.16 - Analisi della sensibilità di SC_PEDOT:PSS

Il modeling migliore ottenuto (figura 6.17) è stato nuovamente ottenuto per EEC2 e ha evidenziato una forte influenza della componente resistiva dovuta a R_S, testimoniata da piccole variazioni sia nel modulo che nella fase, diffusione pressoché assente e permanenza del comportamento capacitivo poco visibile sotto le 8000Hz.

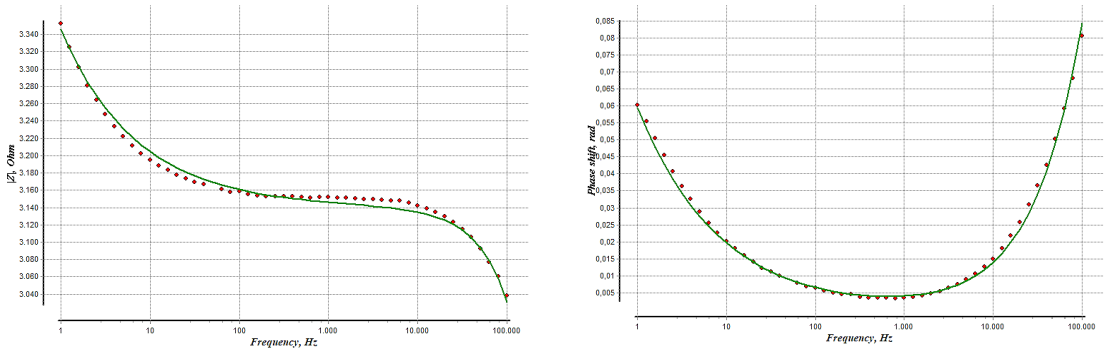


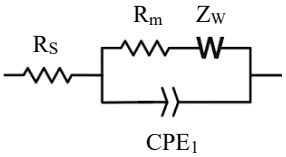


Param.	R_S	R_m	Aw	Q_1	α_1
Valore	303.57	0.002	80.77	8.95 E-5	0.63
Errore %	0.73	###	4.20	695.76	42.96

Figura 6.17 - Circuiti equivalenti a SC_PEDOT:PSS, misure in PBS

Nella figura 6.18 si riassumono i risultati del fit dei dati ricavati per il sensore SC_PEDOT:PSS con gelatina. Per quanto riguarda il modulo, sono valide le osservazioni proposte per la figura 6.15 con la differenza di una minor escursione nell'ampiezza confermata anche da un contributo capacitivo nella pratica assente.





Param.	R_S	R_m	Aw	Q_1	α_1
Valore	1.60 E-13	3141.9	497.52	5.82	0.81
Errore %	###	0.09	3.32	4.21	0.39

Figura 6.18 - Circuiti equivalenti a SC_PEDOT:PSS, misure in Gelatina

Volendo eseguire un confronto tra le due modalità di curing dell'inchiostro, a temperatura ambiente (sensore S2_PEDOT:PSS, fig. 6.13) e a 70 °C (sensore SC_PEDOT:PSS fig. 6.16), è possibile evidenziare delle differenze significative.

In particolare, i valori di modulo e fase confermano che il curing a più elevate temperature sia essenziale per migliorare la conducibilità dell'inchiostro, grazie all'evaporazione del solvente e quindi alla formazione di percorsi stabili tra le molecole del materiale. Tale differenza corrisponde all'ottenere nel sensore SC, rispetto al sensore S2, una diminuzione di quasi 500 Ω in termini di modulo. I valori di fase invece rimangono in ogni caso vicini allo zero, pressochè indipendenti dalla frequenza, in maniera caratteristica di un comportamento tendente a quello resistivo.

Per quanto riguarda la capacità di discriminare tra la condizione di assenza di coating capacitivo e la presenza di tale coating, risulta notevole che il sensore SC_PEDOT:PSS ha prestazioni migliori dato che l'ampiezza del modulo dell'impedenza viene mantenuta sufficientemente alta anche per frequenze più elevate, dove era già calata per il sensore S2_PEDOT:PSS.

CONCLUSIONI

In questa tesi si è affrontato il tema dell'elettronica biodegradabile e bioriassorbibile attestando come tale campo di studio si riveli estremamente promettente.
L'elettronica transitoria biocompatibile è presentata come una possibile soluzione al problema dell'inquinamento, causa del riscaldamento globale e fattore di rischio per lo sviluppo di molteplici patologie, ma anche come un'opportunità di ottenere nuovi strumenti tra cui sensori flessibili e di piccole dimensioni. Questi hanno i vantaggi di poter operare in maniera sicura ed integrata, a stretto contatto con i tessuti biologici, minimizzando le reazioni di rigetto, dissolversi in modo controllato e garantire altissime potenzialità per nuove applicazioni di diagnosi, monitoraggio e trattamento, a basso costo.

Dopo aver descritto l'elettronica dei sensori e le varie tipologie esistenti, si è posta l'attenzione sui materiali biodegradabili di interesse per la loro realizzazione, distinguendo tra conduttivi e dielettrici ed evidenziando come i polimeri di origine sintetica siano la scelta più perseguita in quanto permettono altissimi livelli di personalizzazione e ottime prestazioni.
Per il loro ottenimento sono da preferire le tecniche di stampa, come IJP e AJP, che permettono la produzione di molteplici campioni identici, di dimensioni contenute, in poco tempo e a basso costo.

Nel testo sono stati presentati inoltre i principali parametri per la caratterizzazione morfologica, elettrica, statica, dinamica, ambientale e di stabilità. Sono state in seguito esaminate alcune delle possibili applicazioni per i nuovi sensori tra cui l'integrazione nei sistemi IoT, il monitoraggio dei pazienti, la diagnostica medica, la terapia clinica ed altri ambiti che esulano da quello biomedico come l'ambientale e l'alimentare.

Tra tutte le applicazioni è stata evidenziata la prospettiva di adoperare sensori bioriassorbibili nelle neuroscienze per lo studio delle popolazioni cellulari. Dispositivi simili infatti possono essere impiegati per monitorare, in modo minimamente invasivo, l'attività cellulare nel sistema nervoso, favorendo nuovi sviluppi nella ricerca e nella comprensione dei meccanismi neurologici.

Durante l'attività di laboratorio si sono ottenuti dati concreti e confrontabili sulle prestazioni dei sensori interdigitati bioriassorbibili rispetto a quelli ordinari in diverse condizioni: PBS e gelatina.
Questo approccio sperimentale ha contribuito a valutare in modo accurato la performance dei sensori bioriassorbibili in contesti biologici simulati.
Si è confermata l'ipotesi di poter utilizzare i nuovi device per studi di impedenza elettrochimica ottenendo risultati sufficientemente simili a quelli ottenuti tramite dispositivi ordinari.

Le prove sperimentali hanno dimostrato come lo studio degli stessi materiali utilizzati sia decisivo, infatti, come nel caso del PEDOT: PSS, non sempre riescono a riprodurre le caratteristiche di quelli di tipo standard in quanto non sono propriamente conduttori .
Risulta sicuramente utile, per gli inchiostri polimerici a base acquosa, un processo di curing ad alte temperature che, agevolando l'evaporazione dell'acqua, permette di avere un'adesione più solida al substrato, migliori prestazioni in termini di ripetibilità e una maggiore sensibilità alla presenza cellulare individuabile grazie al sostenimento di un alto modulo di impedenza alle frequenze più elevate.

Lavori futuri affronteranno ulteriori problematiche da considerare per i test in vivo riguardo soprattutto alla permanenza nei tessuti biologici. Sarà necessario indagare strategie alternative per elaborare i dati acquisiti che comprendano nuovi algoritmi fra cui l'apprendimento automatico.

In conclusione, questa tesi ha fornito una panoramica completa sui sensori per misure biomediche bioriassorbibili, esaminando la produzione, i materiali, gli usi e la caratterizzazione di tali dispositivi.
Il confronto con i sensori non bioriassorbibili e l'applicazione pratica hanno contribuito a dimostrare l'importanza e l'applicabilità dei sensori bioriassorbibili per EICS nelle neuroscienze in particolare a proposito dello studio delle popolazioni cellulari. Questa ricerca vuole fornire una base di conoscenza a proposito dei dispositivi biomedici bioriassorbibili utile allo sviluppo di futuri strumenti di monitoraggio e diagnostica più avanzati e sostenibili.

BIBLIOGRAFIA

[1] Forti V., Baldé C.P., Kuehr R., e Bel G, «The Global E-waste Monitor 2020: Quantities, flows and the circular economy potential», Bonn/Geneva/Rotterdam, 2020.

[2] B.-Y. Yang *et al.*, «Ambient air pollution and diabetes: A systematic review and meta-analysis», *Environ Res*, vol. 180, pag. 108817, gen. 2020, doi: 10.1016/j.envres.2019.108817.

[3] M.-I. Kasdagli, K. Katsouyanni, K. Dimakopoulou, e E. Samoli, «Air pollution and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis up to 2018», *Int J Hyg Environ Health*, vol. 222, n. 3, pagg. 402–409, apr. 2019, doi: 10.1016/j.ijheh.2018.12.006.

[4] C. Barragán-Martínez, C. A. Speck-Hernández, G. Montoya-Ortiz, R. D. Mantilla, J.-M. Anaya, e A. Rojas-Villarraga, «Organic Solvents as Risk Factor for Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis», *PLoS One*, vol. 7, n. 12, pag. e51506, dic. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0051506.

[5] K. Katsouyanni *et al.*, «Air pollution and health: a European and North American approach (APHENA).», *Res Rep Health Eff Inst*, n. 142, pagg. 5–90, ott. 2009.

[6] «Articolo 9 della Costituzione Italiana».

[7] «Articolo 41 della Costituzione Italiana».

[8] Carlo Di Bello e Andrea Bagno, *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Seconda edizione. Bologna: Pàtron Editore, 2016.

[9] M. Marziano *et al.*, «Monitoring Caco-2 to enterocyte-like cells differentiation by means of electric impedance analysis on printed sensors», *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1863, n. 5, pagg. 893–902, mag. 2019, doi: 10.1016/j.bbagen.2019.02.008.

[10] M. Stephen, A. Nawaz, S. Y. Lee, P. Sonar, e W. L. Leong, «Biodegradable Materials for Transient Organic Transistors», *Advanced Functional Materials*, vol. 33, n. 6. John Wiley and Sons Inc, 2 febbraio 2023. doi: 10.1002/adfm.202208521.

[11] Bettinger CJ e Bao Z., «Organic thin-film transistors fabricated on resorbable biomaterial substrates.», *PubMed*, 2010.

[12] «Fully Bioabsorbable Capacitor as an Energy Storage Unit for Implantable Medical Electronics Enhanced Reader».

[13] Q. Zheng *et al.*, «Biodegradable triboelectric nanogenerator as a life-time designed implantable power source», *Sci Adv*, vol. 2, n. 3, mar. 2016, doi: 10.1126/sciadv.1501478.

[14] G. A. Salvatore *et al.*, «Biodegradable and Highly Deformable Temperature Sensors for the Internet of Things», *Adv Funct Mater*, vol. 27, n. 35, set. 2017, doi: 10.1002/adfm.201702390.

[15] N. Nath, S. Chakroborty, D. P. Vishwakarma, G. Goga, A. S. Yadav, e R. Mohan, «Recent advances in sustainable nature-based functional materials for biomedical sensor technologies», *Environmental Science and Pollution Research*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2023. doi: 10.1007/s11356-023-26135-w.

[16] S. C. de Assis *et al.*, «Review of Bacterial Nanocellulose-Based Electrochemical Biosensors: Functionalization, Challenges, and Future Perspectives», *Biosensors*, vol. 13, n. 1. MDPI, 1 gennaio 2023. doi: 10.3390/bios13010142.

[17] J. Sun *et al.*, «Multifunctional wearable humidity and pressure sensors based on

biocompatible graphene/bacterial cellulose bioaerogel for wireless monitoring and early warning of sleep apnea syndrome», *Nano Energy*, vol. 108, apr. 2023, doi: 10.1016/j.nanoen.2023.108215.

[18] F. C. Vicentini *et al.*, «Starch-Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review», *Biomedical Materials & Devices*, set. 2022, doi: 10.1007/s44174-022-00012-5.

[19] Haibing Hu, Haiying Wen, Hui Zhang, Jianxiong Zhu, Lei Liu, e Peng Hua, «Recent advances in biodegradable electronics- from fundament to the next-generation multi-functional, medical and environmental device _ Elsevier Enhanced Reader», *Sustainable Materials and Technologies*, 2023.

[20] A. Fiorati, A. Bellingeri, C. Punta, I. Corsi, e I. Venditti, «Silver Nanoparticles for Water Pollution Monitoring and Treatments: Ecosafety Challenge and Cellulose-Based Hybrids Solution», *Polymers (Basel)*, vol. 12, n. 8, pag. 1635, lug. 2020, doi: 10.3390/polym12081635.

[21] Siyuan Zhao *et al.*, «Tracking neural activity from the same cell during entire adult life of mice», *Nat Neurosci*, 2023.

[22] T. C. Chilcott, M. Chan, L. Gaedt, T. Nantawisarakul, A. G. Fane, e H. G. L. Coster, «Electrical impedance spectroscopy characterisation of conducting membranes: I. Theory», *J Memb Sci*, vol. 195, n. 2, pagg. 153–167, 2002.

[23] S. Tonello *et al.*, «Ink-jet printed stretchable sensors for cell monitoring under mechanical stimuli: A feasibility study», *J Mech Med Biol*, vol. 19, n. 6, set. 2019, doi: 10.1142/S0219519419500490.

[24] E. Urdapilleta, M. Bellotti, e F. J. Bonetto, «Impedance analysis of cultured cells: A mean-field electrical response model for electric cell-substrate impedance sensing technique», *Phys Rev E*, vol. 74, n. 4, pag. 41908, ott. 2006, doi: 10.1103/PhysRevE.74.041908.

[25] N. Chaicharoenaudomrung, P. Kunhorm, e P. Noisa, «Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling», *World J Stem Cells*, vol. 11, n. 12, pagg. 1065–1083, dic. 2019, doi: 10.4252/wjsc.v11.i12.1065.

[26] A. H. Kyle, C. T. O. Chan, e A. I. Minchinton, «Characterization of three-dimensional tissue cultures using electrical impedance spectroscopy», *Biophys J*, vol. 76, n. 5, pagg. 2640–2648, 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77416-3.

[27] S. Tonello *et al.*, «Impedance-based monitoring of mesenchymal stromal cell three-dimensional proliferation using aerosol jet printed sensors: A tissue engineering application», *Materials*, vol. 13, n. 10, mag. 2020, doi: 10.3390/ma13102231.

[28] M. Dominici *et al.*, «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement», *Cytotherapy*, vol. 8, n. 4, pagg. 315–317, 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.

[29] O. Casas *et al.*, «In vivo and in situ ischemic tissue characterization using electrical impedance spectroscopy», in *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York Academy of Sciences, 1999, pagg. 51–58. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09448.x.

[30] W. Gu e Y. Zhao, «Cellular electrical impedance spectroscopy: an emerging technology of microscale biosensors», *Expert Rev Med Devices*, vol. 7, n. 6, pagg. 767–779, nov. 2010, doi: 10.1586/erd.10.47.

Mangerai le more
solo se cerchi nei rovi

Grazie a chi mi è sempre stato vicino ☆