



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

SVILUPPO DI BIOCENSORI ELETTROCHIMICI TRASPARENTI IN
PIATTAFORMA MICROFLUIDICA MEDIANTE DEPOSIZIONE
SELETTIVA

Relatore: Prof. Monica Giomo

Correlatore: Dott. Francesco Lamberti

Laureanda: Vanessa Sonda

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

A Cheru,
perché camminerai sempre al mio fianco.

Riassunto

In questo lavoro di Tesi viene realizzato un biosensore elettrochimico trasparente in piattaforma microfluidica mediante deposizione selettiva.

Questa applicazione viene realizzata su superfici conduttive trasparenti, si utilizza infatti l'ITO. Questo materiale rende la tecnologia accessibile anche a misure di tipo fotoelettrico oltre che elettrochimico.

La piattaforma microfluidica progettata dispone di quattro elettrodi lavoranti. Vengono progettati e realizzati gli elettrodi di riferimento ed i controelettrodi da utilizzare nel chip e si dispone un sistema di alloggiamento e connessione con lo strumento di misura che rende le misurazioni precise ed affidabili.

La superficie conduttiva viene resa chimicamente attiva in modo selettivo mediante la tecnica di electrografting. Questa modifica superficiale realizza l'attacco di molecole amminiche sull'elettrodo. A queste vengono poi legate specie biologiche specifiche che consentono l'ancoraggio finale dell'enzima GOx. Questo enzima permette la rilevazione di glucosio grazie alla creazione di segnale elettrico generata dalla riduzione del coenzima FAD.

Viene infine proposto l'FTO come materiale conduttivo per la realizzazione del biosensore.

In questo studio vengono utilizzate diverse strumentazioni per la realizzazione del biosensore e la loro verifica: fotolitografia e softlitografia, caratterizzazioni superficiali di tipo elettrochimico, caratterizzazioni superficiali XPS, analisi di immunofluorescenza, test con HABA, spettrometria di massa MALDI/TOF, spettroscopia UV-VIS.

Indice

Indice	1
Capitolo 1	5
1.1 Conoscenze preliminari.....	5
1.1.1 I biosensori elettrochimici	5
1.1.2 L'ITO come elettrodo.....	6
1.1.3 La tecnica di electrografting.....	7
1.1.4 La microfluidica	8
1.2 Stato dell'arte e obiettivi della tesi	9
1.3 Strumentazioni e tecniche utilizzate.....	11
1.3.1 Tecniche di microfabbricazione: fotolitografia e softlitografia	11
1.3.2 Tecniche di caratterizzazione elettrochimica	12
1.3.2.1 Principi elettrochimici	12
1.3.2.2 Voltammetria ciclica	18
1.3.2.3 Amperometria potenziostatica.....	21
1.3.2.4 Sistema di acquisizione dati	21
1.3.3 Tecnica di caratterizzazione XPS.....	22
1.3.4 Analisi di immunofluorescenza.....	23
1.3.5 Strumentazione utilizzata per l'ingegnerizzazione dell'enzima glucosio ossidasi	24
1.3.5.1 Spettrometria di massa MALDI TOF.....	24
1.3.5.2 Test mediante HABA/Avidina	25
1.3.5.3 Spettroscopia UV-VIS.....	25
Capitolo 2	27
2.1 Materiali utilizzati	27
2.2 Tecniche di microfabbricazione	29
2.2.1. Realizzazione della fotomaschera	29
2.2.2 Pretrattamento del supporto	29
2.2.3 Deposizione del polimero.....	30
2.2.4 Pre-riscaldamento ed esposizione	30

2.2.5 Post-riscaldamento e sviluppo.....	31
2.2.6 Etching selettivo.....	32
2.2.7 Rimozione del polimero.....	32
2.2.8 Soft-litografia.....	33
2.2.9 Accoppiamento mediante UV-ozono cleaner.....	34
2.3 Sistema di alloggiamento e connessione elettrica del chip.....	35
2.4 Determinazione del solvente e sistema di regolazione delle portate.....	36
2.5 Sviluppo del biosensore.....	38
2.6 Protocollo di ingegnerizzazione della GOx.....	40
2.6.1 Metodo di modifica enzimatica.....	40
2.6.2 Protocollo di verifica della modifica enzimatica.....	40
2.6.3 Protocollo di test di attività enzimatica.....	41
2.7 Protocollo di immunofluorescenza.....	43
Capitolo 3	45
3.1 Realizzazione del chip.....	45
3.2 Influenza della portata.....	48
3.3 Modifica dell'elettrodo mediante deposizione elettrochimica.....	50
3.3.1 Modifica superficiale mediante sali di diazonio.....	50
3.3.1.1 Ottimizzazione del grafting di diazonio.....	55
3.3.1.2 Studio della selettività della modifica.....	56
3.3.2 Modifica superficiale mediante cisteammina.....	60
3.3.2.1 Ottimizzazione del grafting di cisteammina.....	62
3.3.2.2 Studio della selettività della modifica.....	63
3.3.3 Confronto e scelta tra le due tipologie di grafting.....	64
3.4 Sviluppo del biosensore.....	64
3.4.1 Studio dell' attacco di biotina.....	65
3.4.1.1 Test di immunofluorescenza per la rilevazione di biotine superficiali.....	68
3.4.2 Studio dell'attacco di avidina.....	69
3.4.3 Studio dell'attacco di GOx.....	70
3.4.3.1 Ingegnerizzazione dell'enzima GOx.....	72
3.5 Applicazioni.....	80
3.5.1 Tecniche di amplificazione del segnale del biosensore.....	83

3.6 Sviluppi futuri	85
3.6.1 Studi preliminari sull'utilizzo dell'FTO come substrato conduttivo	85
3.6.2 Risultati ottenuti	86
Riferimenti bibliografici	95
Ringraziamenti.....	97

Introduzione

La volontà di sviluppare un biosensore elettrochimico in piattaforma microfluidica che realizzi misure in flusso nasce dall'esigenza di ottenere un sistema di controllo preciso e continuo della concentrazione di glucosio.

Il lavoro di questa Tesi infatti trova spazio in un progetto più ampio nel quale si vuole creare in microfluidica un sistema completo per lo studio del metabolismo di cellule murine. Lo scopo di questa ricerca è volto all'individuazione e all'ottimizzazione di modelli in vitro per la cura del diabete mellito di tipo II e per la sperimentazione e lo screening di farmaci.

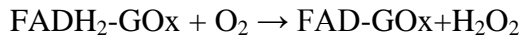
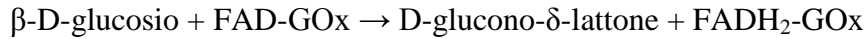
La scelta di sviluppare il sistema in microfluidica è legata ai vantaggi che la miniaturizzazione comporta, quali riduzione dei volumi dei campioni da analizzare, basso costo e tempi di risposta brevi (*Liu et al.*, 2010). Inoltre, si deve ricordare che ridurre la scala delle dimensioni medie del sistema di controllo permette di aumentare la sensibilità della misura. Integrare il sistema di controllo direttamente in sistemi microfluidici è auspicabile non solo perché semplifica la manipolazione del sistema, ma anche perché rende la misura più robusta e operatore-indipendente.

Ad oggi sono state messe a punto diverse metodologie per la rilevazione del glucosio in microfluidica (*Zhang and Chen*, 2003).

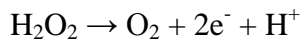
Sensori per il glucosio sono stati impiantati in tessuti viventi, ma il loro uso risulta tutt'ora limitato a causa della diminuzione del rendimento del sensore e dei fenomeni infiammatori che comporta l'innesto (*Frost and Meyerhoff*, 2006). Il monitoraggio non invasivo del glucosio appare al momento la soluzione più promettente (*Lamberti et al.*).

L'applicazione che si vuole approfondire in questo studio riguarda la realizzazione di un biosensore elettrochimico e quindi sfrutta le reazioni di ossidoriduzione indotte dall'interazione tra il glucosio e l'enzima scelto come elemento di riconoscimento.

Nei biosensori elettrochimici, di norma, la rilevazione del glucosio avviene in via indiretta mediante la misura della corrente elettrica che si genera in seguito alla scarica di acqua ossigenata sulla superficie dell'elettrodo. Si tratta di una reazione redox a due stadi. Il glucosio in soluzione viene ossidato a glucono-lattone per mezzo dell'enzima glucosio ossidasi (GOx); a sua volta, il coenzima della GOx, chiamato flavina-adenina-dinucleotide (FAD), subisce una riduzione.



La forma ridotta del FAD può in seguito ritornare alla forma ossidata mediante la reazione con l'ossigeno molecolare disciolto nella soluzione, liberando acqua ossigenata.



La realizzazione del biosensore oggetto di questa tesi prevede diversi gradi di innovatività rispetto allo stato dell'arte.

In primo luogo questi dispositivi vengono realizzati su superfici conduttive trasparenti - si utilizza infatti l'ITO - un semiconduttore ceramico che combina buone proprietà ottiche ed elettriche. Questo aspetto è assolutamente di rilievo poiché rende la tecnologia accessibile anche a misure di tipo ottico oltre che elettrochimico.

La funzionalizzazione della superficie viene realizzata mediante la tecnica di electrografting che realizza l'attacco di funzioni amminiche sull'elettrodo (*Corgier et al.*, 2009)

Questa modifica superficiale rende chimicamente attivo l'elettrodo permettendo di legare in modo covalente le specie biologiche che vanno a formare il biosensore. L'enzima finale GOx, che permette la rilevazione di glucosio, viene ingegnerizzato in modo tale da permetterne l'ancoraggio alla superficie

Caratterizzazioni elettrochimiche, chimiche e biologiche vengono utilizzate per valutare l'efficacia dei diversi stadi di fabbricazione del biosensore stesso e le sue prestazioni finali.

La piattaforma microfluidica elettrochimica viene progettata per permettere misurazioni multiple in linea . A tal fine dovrà disporre di più elettrodi lavoranti, di elettrodi di riferimento e di controllo.

Lo studio richiede la messa a punto di un protocollo che definisca le condizioni operative di ottimo della tecnica di electrografting e dei trattamenti di deposito delle specie biologiche in modo che il rendimento di questi processi non venga compromesso dalle dimensioni ridotte che la microfluidica impone.

La selettività delle funzionalizzazioni e dei depositi di materiale biologico operati risulterà essere condizione vincolante per il buon esito della ricerca.

Particolare attenzione verrà posta affinché le operazioni che permettono lo sviluppo del biosensore non compromettano le ottime proprietà ottiche che caratterizzano il materiale scelto per l'elettrodo.

La Tesi è strutturata come segue.

Nel Capitolo 1 vengono dapprima riassunte le conoscenze preliminari necessarie per lo sviluppo del biosensore; quindi vengono presentati lo stato dell'arte e gli obiettivi della Tesi; infine vengono esaminate le tecniche di indagine utilizzate.

Nel Capitolo 2 sono riportate le specifiche di tutti i materiali e delle apparecchiature utilizzate, nonché i protocolli seguiti nello svolgimento della attività sperimentale del lavoro di Tesi.

Nel Capitolo 3 sono presentati i risultati ottenuti ed i dati relativi a studi preliminari condotti per sviluppi futuri del biosensore. Nello specifico si analizza l'efficacia dell'electrografting quale tecnica per modificare la superficie dell'elettrodo, testando reagenti diversi. Quindi si presentano le procedure messe a punto per lo sviluppo del biosensore e la verifica del suo funzionamento. Infine si valuta la possibilità di realizzare il biosensore utilizzando come materiale conduttivo trasparente l'FTO.

La Tesi si conclude con la discussione dei risultati ottenuti e la presentazione delle prospettive di sviluppo individuate .

Capitolo 1

Strumenti per lo sviluppo di biosensori elettrochimici

In questo primo Capitolo si riportano le conoscenze preliminari necessarie allo sviluppo di biosensori elettrochimici in piattaforma microfluidica, gli obiettivi che si intendono raggiungere in questo lavoro di Tesi e la descrizione generale delle tecniche di indagine utilizzate.

1.1 Conoscenze preliminari

In questo paragrafo sono raccolti i principi fondamentali fisici, chimici e ingegneristici su cui è basato il lavoro di Tesi.

1.1.1 I biosensori elettrochimici

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

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

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

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

Infine, i biosensori elettrochimici si basano sulla rilevazione delle variazioni di proprietà di tipo elettrochimico e sono costituiti da un elemento biologico sensibile, quale ad esempio un recettore cellulare, un anticorpo o un enzima, immobilizzato sulla superficie di un elettrodo. La specie chimica che deve essere misurata, non elettroattiva, reagisce con l'elemento di riconoscimento del sensore, con conseguente produzione di una specie o un composto elettroattivo che diffonde verso la superficie elettrodica e, ossidandosi, genera un segnale elettrico rilevabile e relazionabile con la concentrazione iniziale del metabolita. I biosensori elettrochimici possono essere a loro volta suddivisi in tre differenti categorie: potenziometrici, conduttometrici e amperometrici. Nel primo caso, l'elettrodo sviluppa un potenziale variabile, a seconda dell'attività o della concentrazione dell'analita in esame. Nei biosensori conduttometrici viene misurata la corrente dovuta al movimento di ioni in soluzione in seguito all'applicazione di un potenziale alternato tra due elettrodi inerti. La via amperometrica costituisce il metodo di trasduzione più comune impiegato per lo sviluppo dei biosensori, a causa dell'elevata specificità e dell'ampio intervallo di linearità, e consiste nella misurazione della corrente elettrica generatasi all'elettrodo in seguito alla presenza di una specie elettroattiva che rappresenta il prodotto di reazione dell'analita con l'elemento biologicamente attivo del biosensore.

1.1.2 L'ITO come elettrodo

L'acronimo ITO indica l'ossido di indio e stagno, dall'inglese indium tin oxide.

Questo materiale è un solido costituito da ossidi di indio(III) (In_2O_3) e da ossidi di stagno (IV) (SnO_2). Esso è più correttamente indicato come ossido di indio drogato di stagno, poiché la percentuale di ossidi di indio e stagno è di 90% e 10% rispettivamente. Questo materiale è un ossido semiconduttivo. È trasparente alla luce e incolore se in forma di sottile pellicola, mentre se lo spessore è significativo presenta un colore variabile dal giallo pallido al verde in funzione della concentrazione di drogante. Ciò che rende questo materiale particolarmente interessante per le applicazioni è la combinazione di una buona conducibilità elettrica ed un'elevata trasparenza ottica.

Viene ottenuto attraverso un drogaggio sostitutivo di atomi In^{+3} nel In_2O_3 , con atomi di stagno. Lo stagno forma così un legame interstiziale con l'ossigeno ed esiste quindi sia sotto forma di SnO che SnO_2 , presentando rispettivamente una valenza +2 e +4. Questo stato di valenza contribuisce a conferire conduttività all'ITO.

Nell'ossido di indio-stagno non solo lo stagno sostitutivo, ma anche la lacuna di ossigeno contribuisce all'alta conduttività e il materiale potrebbe essere rappresentato come

$\text{In}_{2-x}\text{Sn}_x\text{O}_{3-2x}$. Pellicole di ITO hanno un parametro di reticolo vicino all' In_2O_3 tra 10,12 e 10,31 Å.

L'alta trasmittanza ottica delle pellicole di ITO è la diretta conseguenza dell'essere un semiconduttore con un largo divario di banda, generalmente maggiore di 3,75 eV (*Kim and Gilmore, 1999*).

Sottili strati di ossido di indio-stagno sono comunemente depositati su varie superfici tramite evaporazione al raggio elettronico, deposizione fisica da vapore, rivestimento per immersione, rivestimento per rotazione od utilizzando varie tecniche di deposizioni a spruzzo.

A causa degli alti costi e della limitata disponibilità di indio, della fragilità e della mancanza di flessibilità degli strati di ossido di indio-stagno, degli elevati costi delle tecniche di deposizione che richiedono alte temperature e a volte alti livelli di vuoto, si è cercato di individuare materiali che potessero sostituirlo nelle diverse applicazioni.

Per rimanere nel campo degli ossidi metallici, l'ossido di zinco dopato con alluminio e l'ossido di stagno recante dopanti di tipo *n* come fluoro e antimonio rappresentano soluzioni alternative.

1.1.3 La tecnica di electrografting

L'electrografting rappresenta una delle tecniche più innovative per ottenere modifiche superficiali di solidi conduttivi o semiconduttivi (*Palacin et al., 2004*).

Questo processo avviene mediante una reazione elettrochimica che permette di legare degli strati organici a substrati conduttivi. Si parla di electrografting anche nel caso di reazioni nelle quali vi è un trasferimento di elettroni tra la superficie da modificare e il reagente o quando un reagente ossidante o riducente viene aggiunto al sistema per produrre delle specie reattive che attaccano la superficie. Questi metodi sono interessanti poiché permettono di realizzare un legame chimico covalente tra lo strato organico e la superficie. L'electrografting trova applicazione su diverse tipologie di substrato, tra cui il carbonio, i metalli e i loro ossidi, ma anche su materiali isolanti quali i polimeri. Dal 1980 sono state sviluppate diverse metodologie, ottenute sia mediante riduzione sia mediante ossidazione, e alcune di queste sono divenute applicazioni industriali (*Belangèr and Pilson, 2011*).

1.1.4 La microfluidica

Per microfluidica s'intende la scienza e l'ingegneria dei sistemi in cui il comportamento del fluido si differenzia dalla teoria convenzionale a causa della piccola scala del sistema. La scala usata è tale da permettere, mediante sistemi fluidici miniaturizzati, la perfusione di volumi di fluidi dell'ordine dei micro o dei nanolitri, usando microcanali di dimensioni che variano generalmente tra le decine e le centinaia di micrometri (*Whitesides, 2006*).

La realizzazione di dispositivi microfluidici avviene tramite particolari tecniche di microfabbricazione, come la fotolitografia e il "replica molding". La richiesta di sistemi con caratteristiche ottiche specifiche, biocompatibili o chimico compatibili, caratterizzati da ridotti costi di produzione ed una più veloce fase di prototipazione, ha favorito la sostituzione del silicio, inizialmente utilizzato come substrato dei chip, con materiali quali vetro, ossidi di metallo trasparenti e materiali elastomerici come il polidimetilsilossilano (PDMS).

Quest'ultimo materiale è un polimero che possiede alcune proprietà chimico-fisiche particolarmente adatte per gli utilizzi nelle applicazioni della microfluidica: è chiaro, è permeabile ai gas, ha un basso modulo elastico ed è biocompatibile (*Bartolo and Studer, 2008*). Per questi motivi è largamente utilizzato per la realizzazione di piattaforme microfluidiche.

A causa delle ridotte dimensioni caratteristiche, nei sistemi microfluidici il moto dei fluidi è caratterizzato da numeri di Reynolds sufficientemente piccoli, tali da rendere trascurabili gli effetti inerziali. Il regime di moto che ne consegue risulta laminare (*Squires and Quake, 2005*).

I vantaggi offerti dai sistemi microfluidici sono molteplici:

1. Ridotti consumi dei fluidi di processo, dato il piccolo volume interno del chip. Tale aspetto risulta particolarmente significativo sia per le positive ricadute che ha in campo ambientale che per la conseguente riduzione dei costi. Esso costituisce un vantaggio per i sistemi di analisi in quanto richiede volumi ridotti di fluido campione .
2. Analisi più accurate e velocità di controllo del chip in termini di mescolamento e temperatura.
3. Miglior controllo delle dinamiche del processo a causa di una più veloce risposta del sistema.
4. Compattezza del sistema, dovuto alla grande integrazione delle funzionalità e piccoli volumi.

5. Possibilità di condurre più processi in parallelo, che rende possibili analisi high-throughput.
6. Costi di fabbricazione ridotti, con la possibilità di produrre chip usa e getta a basso costo, ottenuti con produzione di massa.
7. Possibilità di realizzare piattaforme versatili e sicure per studi chimici, radioattivi o biologici vista la facile integrazione delle funzionalità e i ridotti volumi di fluido ed energie da immagazzinare.

1.2 Stato dell'arte e obiettivi della tesi

La volontà di sviluppare un biosensore elettrochimico in piattaforma microfluidica che realizzi misure in flusso nasce dall'esigenza di ottenere un sistema di controllo preciso e continuo della concentrazione di glucosio.

Il lavoro di questa Tesi infatti si inserisce in un progetto più ampio che ha come obiettivo quello di realizzare in microfluidica un sistema completo per lo studio del metabolismo di cellule murine. Lo scopo generale di questa ricerca è volto all'individuazione e all'ottimizzazione di terapie innovative per la cura del diabete mellito di tipo II e per la sperimentazione e lo screening di farmaci.

La scelta di sviluppare il sistema in microfluidica è legata ai vantaggi che la miniaturizzazione comporta, quali riduzione dei volumi dei campioni da analizzare, basso costo e tempi di risposta brevi (*Liu et al.*, 2010). Inoltre, ridurre la scala delle dimensioni medie del sistema di controllo permette di aumentare la sensibilità della misura.

Integrare il dispositivo di controllo direttamente nei sistemi microfluidici è auspicabile non solo perché semplifica la manipolazione degli stessi, ma anche perché rende la misura più robusta e operatore-indipendente.

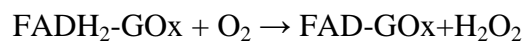
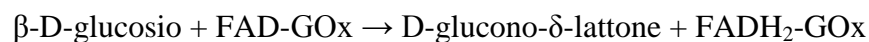
Esistono in commercio diversi sensori per la rilevazione del glucosio; alcuni sono stati impiantati in tessuti viventi, ma il loro uso risulta tutt'ora limitato a causa della diminuzione del rendimento del sensore nel tempo e dei fenomeni infiammatori che comporta l'innesto (*Frost and Meyerhoff*, 2006).

Il monitoraggio non invasivo del glucosio risulta essere la via più perseguibile in questo campo (*Lamberti et al.*, 2011).

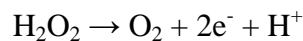
Attualmente sono disponibili diverse metodologie per la rilevazione del glucosio in sistemi microfluidici (*Zhang and Chen*, 2003): in questo studio si considera un processo che sfrutta le

reazioni di ossidoriduzione operate dal glucosio. Il biosensore che si intende realizzare è di tipo elettrochimico.

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



La forma ridotta del FAD può in seguito ritornare alla forma ossidata mediante la reazione con l'ossigeno molecolare disciolto nella soluzione, liberando acqua ossigenata.



Al momento la letteratura riporta dati relativi della realizzazione di biosensori di questo tipo su scala macroscopica (*Rawson and Yeung, 2012*).

La realizzazione del biosensore che si intende sviluppare richiede diverse operazioni.

In primo luogo la scelta del materiale elettrodico: in questo studio si è scelto di impiegare superfici conduttive trasparenti, per rendere la tecnologia accessibile anche a misure di tipo ottico oltre che elettrochimico. Allo scopo si utilizza ITO, un semiconduttore ceramico che combina buone proprietà ottiche ed elettriche.

La funzionalizzazione della superficie viene realizzata mediante la tecnica di electrografting che realizza l'attacco di molecole amminiche sull'elettrodo. (*Corgier et al., 2009*)

Questa modifica superficiale rende chimicamente attivo l'elettrodo permettendo di legare in modo covalente le specie biologiche che vanno a formare il biosensore. In particolare, l'enzima finale GOx, che permette la rilevazione di glucosio grazie alla creazione di segnale elettrico, viene ancorato alla superficie mediante specie intermedie, quali biotina e avidina.

L'obiettivo che si pone questo lavoro di Tesi è quello di trasferire questa tecnologia in un chip microfluidico che permetta misurazioni multiparametriche in linea.

La piattaforma microfluidica che si vuole progettare dovrà quindi essere in grado di alloggiare al suo interno più elettrodi lavoranti, oltre che elettrodi di riferimento e di controllo di modo da assicurare una rilevazione robusta e ripetibile del segnale elettrico.

Lo studio richiederà la definizione di un protocollo che vada a definire le condizioni operative di ottimo sia per lo stadio di electrografting che per i depositi delle specie biologiche, in modo che il rendimento di questi processi non venga diminuito dalle piccole scale che la microfluidica impone.

Particolare attenzione dovrà essere posta per garantire la selettività delle funzionalizzazioni e dei depositi di specie biologiche, in considerazione del ruolo determinante svolto da queste fasi nell'ottenimento del biosensore.

Non ultimo, le operazioni che permettono lo sviluppo del biosensore non dovranno compromettere le ottime proprietà ottiche di cui vanta l'elettrodo.

1.3 Strumentazioni e tecniche utilizzate

In questo paragrafo sono riportate le tecniche e le strumentazioni che sono state impiegate per la progettazione, la realizzazione e la verifica del sistema sviluppato in questa tesi.

1.3.1 Tecniche di microfabbricazione: fotolitografia e softlitografia

La realizzazione di un sistema microfluidico richiede l'impiego di alcune tecniche di microfabbricazione per ottenere strutture tridimensionali che presentino sulla superficie, o al loro interno, forme e geometrie ben definite, caratterizzate da un elevato livello di precisione.

Al fine di ottenere il chip microfluidico si è utilizzato il processo della litografia.

La fabbricazione delle piattaforme richiede la progettazione, la realizzazione e la replica di stampi opportunamente sagomati secondo una struttura predefinita. Questi possono essere realizzati impiegando tecniche diverse: in questo lavoro sono state usate due tecniche litografiche: la fotolitografia e la softlitografia.

Mediante la fotolitografia si è potuto realizzare il circuito elettrico del biosensore e il master per lo stampo in silicone.

La fotolitografia è una tecnica di fabbricazione che permette il trasferimento di una configurazione geometrica prestabilita, impressa su una fotomaschera, ad un polimero fotosensibile depositato su un substrato. Il trasferimento del disegno desiderato si attua mediante la deposizione, sulla superficie di supporto, di un film di photoresist, una resina

epossidica che reticola se irradiata da raggi UV. La presenza di una fotomaschera tra il polimero reticolante e la sorgente luminosa permette di comprendere ed escludere in maniera selettiva le porzioni di superficie che si intendono polimerizzare.

Successivamente le zone non polimerizzate vengono rimosse con opportuni solventi e secondo protocolli definiti dal produttore.

Con la tecnica della soft-litografia è stato poi realizzato lo strato in silicone che costituisce la porzione superiore del chip microfluidico. (Xia e Whitesides, 1998).

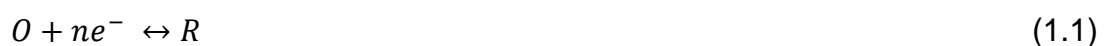
La softlitografia rappresenta una tecnica non fotolitografica basata sul replica molding per la realizzazione di micro- e nanostrutture. Questa costituisce un metodo conveniente, efficiente e economico per la microfabbricazione. La softlitografia prende il nome dai materiali elastomerici che solitamente si usano per lo stampo. In questo lavoro si utilizza l'elastomero PDMS, che risulta essere il più impiegato per questa tecnica.

1.3.2 Tecniche di caratterizzazione elettrochimica

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

1.3.2.1 Principi elettrochimici

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



dove O è la forma ossidata e R quella ridotta della coppia redox. La (1.1) avviene in una regione di potenziale che rende il trasferimento elettronico termodinamicamente o cineticamente favorevole. Quando ciò si verifica, le concentrazioni della forma ossidata c_o e della forma ridotta c_R della specie elettroattiva possono essere rispettivamente determinate mediante la legge di Nernst, che fornisce il potenziale elettrochimico E così espresso:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{O(0,t)}}{c_{R(0,t)}}, \quad (1.2)$$

nella quale E_0 è il potenziale standard della coppia redox, R la costante universale dei gas ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T (K) la temperatura, n il numero di elettroni che hanno preso parte alla reazione redox e infine F la costante di Faraday (96485 C mol^{-1}). Per valori di potenziale inferiori a E_0 è cineticamente favorita la reazione di riduzione della specie ossidata. La corrente che ne deriva, pari alla corrente associata alla semireazione di riduzione, è una misura diretta della velocità di reazione e varia a seconda dello stato di ossidazione delle specie elettroattive. Viene chiamata *corrente faradica*, poiché segue la legge di Faraday, secondo la quale la carica che passa in soluzione è proporzionale alla massa che si deposita sull'elettrodo. Il grafico che riporta il potenziale applicato, in ascissa, contro la corrente rilevata, in ordinata, si chiama voltammogramma ed è direttamente determinato, in forma e intensità, dai processi che intervengono nella reazione all'elettrodo. La corrente risultante è data dalla somma della corrente faradica e della *corrente capacitiva*; quest'ultima è una caratteristica intrinseca del sistema e indipendente dalla concentrazione di analita presente in soluzione. Esistono anche dei processi non faradici, che avvengono quando una data interfaccia elettrodo-soluzione esibisce una certa inerzia al trasferimento di carica, per un ben definito intervallo di potenziale: questo avviene quando le reazioni di ossidoriduzione sono termodinamicamente o cineticamente sfavorite. Si tratta di fenomeni di adsorbimento e disadsorbimento che interessano direttamente la superficie elettrodica, modificandola, e avvengono in seguito a variazioni del potenziale in cella o della concentrazione di analita in soluzione.

Il processo di scarica della specie ossidata avviene generalmente in 3 *step* principali:

- il trasporto di massa dell'analita dal bulk della soluzione all'interfaccia tra elettrodo e soluzione;
- il trasferimento elettronico in corrispondenza della superficie dell'elettrodo;
- il trasporto della specie ridotta prodotta nuovamente verso il bulk.

Si tratta di reazioni chimiche reversibili, poiché seguono le leggi termodinamiche.

La velocità globale della reazione, proporzionale alla corrente misurata nel sistema, è controllata dal più lento degli *step* che avvengono in soluzione o sulla superficie dell'elettrodo: il meccanismo controllante può essere quindi o il trasporto di massa o il

trasferimento di carica, a seconda della natura dell'analita e di fattori sperimentali quali il materiale dell'elettrodo, la natura della soluzione elettrolitica, il potenziale in cella, le modalità con cui avviene il trasporto di massa e la scala dei tempi caratteristici del sistema. Si deduce che lo step determinante dipende dalla finestra di potenziale impiegata nel corso dell'analisi.

Quando, ad esempio, il trasferimento della specie elettroattiva dal bulk all'interfaccia, o viceversa, risulta lo stadio più lento, si parla di corrente limitata dal trasporto di massa.

Di seguito vengono descritti i 3 fenomeni che interessano il trasporto di materia all'interno di un sistema elettrochimico.

Reazioni controllate dal trasporto di materia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Esperimento a potenziale costante

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

La relazione tra la corrente e il tempo può essere compresa analizzando i profili di concentrazione del sistema nel tempo. In seguito all'applicazione del nuovo potenziale, la specie ossidata viene ridotta sulla superficie dell'elettrodo: si genera pertanto un gradiente di concentrazione tra l'interfaccia elettrodo-soluzione e il bulk della soluzione.

La regione prossima alla superficie dell'elettrodo nella quale la concentrazione della specie O diminuisce prende il nome di strato di diffusione, definito da uno spessore d .

Il gradiente di concentrazione è inizialmente ripido a causa del valore piccolo di d , che però aumenta con il passare del tempo riducendo il gradiente.

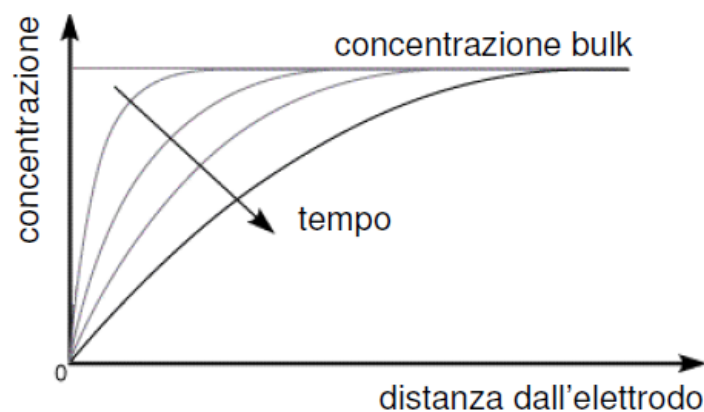


Figura 1.1 Profili di concentrazione a tempi diversi per un esperimento a incremento di potenziale.

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

$$\begin{cases} c_0(x, t = 0) = c_{0,b} & \forall x \\ c_0(x, t > 0) = 0 & x = 0 \\ c_0(x, t > 0) = c_{0,b} & x \rightarrow \infty \end{cases} \quad (1.8)$$

dove c_0 è la concentrazione di elettrolita nella forma ossidata, $c_{0,b}$ è la concentrazione nel *bulk* e x rappresenta la coordinata spaziale ortogonale alla superficie dell'elettrodo.

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

$$\left. \frac{\partial c}{\partial x} \right|_{x=0} = \frac{c_{0,b}}{\sqrt{\pi D_0 t}} \quad (1.9)$$

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

$$i = nFAD_0 \frac{c_{0,b}}{\sqrt{\pi D_0 t}} \quad (1.10)$$

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

Si può notare che il termine $(\pi D_0 t)^{1/2}$ corrisponde allo spessore δ dello strato di diffusione.

Esperimento a scansione di Potenziale

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

La variazione della concentrazione di O è data dal rapporto $(c_{0,b}-c_{0,s})/\delta$, dove $c_{0,b}$ e $c_{0,s}$ sono rispettivamente le concentrazioni nel *bulk* e alla superficie dell'elettrodo, entrambe in funzione del tempo. Il cambio di pendenza e la corrente risultante dipendono quindi sia dalla concentrazione che dallo spessore dello strato limite di diffusione.

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

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

Il valore limite della corrente i_l si ha quando la concentrazione di specie O alla superficie si annulla. In tali condizioni la variazione di concentrazione nello strato δ si riduce a $c_{0,b}$ e il valore di i_l è fornito dall'equazione di Cottrell generica nella forma:

$$i_l = nFAD_0 \frac{c_{0,b}}{\delta}, \quad (1.11)$$

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

Complessivamente, il grafico che riporta la corrente misurata al variare del potenziale è quello di un caratteristico voltammogramma e assume una forma sigmoideale, come riportato in Figura 1.2.

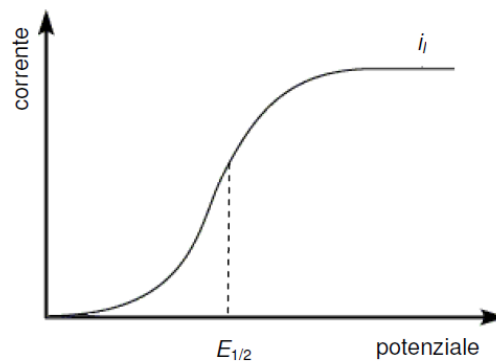


Figura 1.2 Voltammogramma che riporta la corrente al variare del potenziale applicato.

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

1.3.2.2 Voltammetria ciclica

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

La voltammetria ciclica è una metodica elettrochimica potenziodinamica che consiste nell'effettuare una scansione lineare di potenziale di un elettrodo lavorante stazionario in

soluzione non agitata, mediante l'applicazione di un potenziale a forma d'onda triangolare nel tempo, secondo una definita velocità di scansione. Si tratta di un caso particolare di voltammetria a scansione lineare (LSV), con la differenza che il potenziale, raggiunto un dato valore, viene invertito, eventualmente anche più volte nello stesso esperimento.

Durante la scansione del potenziale, applicato tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento, viene misurata la corrente tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo (detto anche elettrodo ausiliario, vedi §1.2.5) conseguente allo scambio di elettroni che si genera: il grafico che riporta la corrente rilevata contro il potenziale applicato è detto voltammogramma ciclico, o ciclo voltammogramma. Solitamente alla soluzione si addiziona un elettrolita di supporto, per assicurare una sufficiente conduttività della soluzione e garantire che il trasporto della specie studiata avvenga per diffusione.

L'analita impiegato deve essere una specie elettroattiva all'interno dell'intervallo di potenziale indagato sperimentalmente e deve manifestare un comportamento idealmente reversibile.

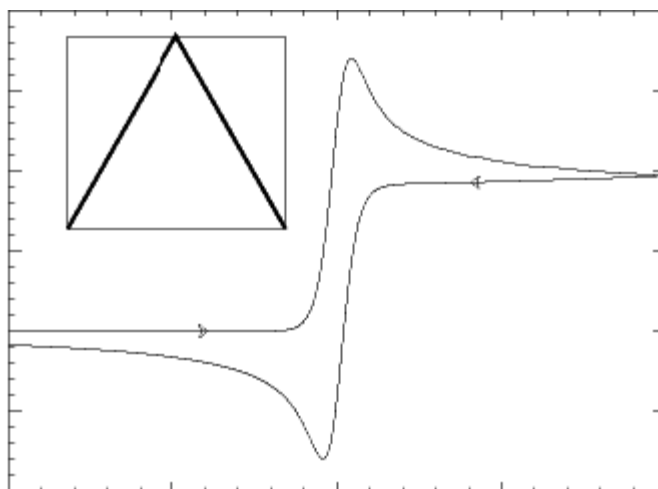


Figura 1.3 Voltammogramma che riporta la corrente al variare del potenziale applicato.

Nei processi che coinvolgono coppie redox reversibili, è possibile osservare la tipica risposta della corrente, riportata in Figura 1.3: assumendo che inizialmente sia presente in soluzione solo la specie O , si fa partire la scansione da un potenziale con verso negativo per la prima metà del ciclo, partendo da un valore al quale non avvengono reazioni di riduzione. Man mano che il potenziale applicato si avvicina a E^0 , caratteristico della coppia redox in esame, si può osservare l'instaurarsi di una corrente catodica crescente, che raggiunge un valore di picco, al quale corrisponde un valore massimo del gradiente di concentrazione. Dopo aver

attraversato la regione di potenziale nella quale avviene la riduzione, la direzione della scansione di potenziale si inverte, instaurando una corrente anodica crescente in valore assoluto, la quale anch'essa raggiunge un valore di picco associato all'ossidazione della specie R . I picchi caratteristici del voltammogramma sono causati dalla formazione dello strato di diffusione vicino alla superficie dell'elettrodo. La variazione continua della concentrazione superficiale induce un'espansione dello spessore dello strato di diffusione e la corrente di picco che ne risulta riflette la variazione del gradiente di concentrazione, in quanto corrisponde al raggiungimento di un controllo di tipo diffusivo. Oltrepassato il picco, si osserva una zona che esibisce un comportamento indipendente dal potenziale applicato, che segue un andamento proporzionale a $t^{-1/2}$. Se il processo è completamente reversibile, la corrente inversa ha la stessa forma della curva di riduzione.

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

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

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

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

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

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

L'intensità della corrente di picco i_p (μA) per una coppia reversibile, sempre riferita a condizioni standard, è invece data dall'equazione di Randles-Sevcik:

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

dove n è il numero di elettroni scambiati nella reazione redox, A (cm^2) è l'area attiva dell'elettrodo, D ($cm^2 s^{-1}$) è il coefficiente di diffusione bulk dell'analita in soluzione, ν ($V s^{-1}$)

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

Per processi semi-reversibili o irreversibili, voltammetrie cicliche effettuate all'aumentare della velocità di scansione mostrano uno stiramento delle curve di corrente, con un corrispondente abbassamento e allontanamento reciproco dei picchi di ossidazione e riduzione, a causa del trasferimento elettronico che diventa uno stadio cineticamente lento, non più trascurabile come lo era per i sistemi reversibili. È possibile quindi ottenere delle informazioni sulla perdita di reversibilità dell'elettrodo quando si è in presenza di un allontanamento o una riduzione dei picchi redox del voltammogramma, o anche di un suo cambio di forma.

1.3.2.3 Amperometria potenziostatica

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

1.3.2.4 Sistema di acquisizione dati

Tutte le misure elettrochimiche di questo lavoro di Tesi sono state effettuate per mezzo di un potenziostato-galvanostato (Autolab PGSTAT 128N Ecochemie, NL), Figura 1.4, interfacciato a un computer e gestito da apposito software (Nova 1.8) che permette anche la elaborazione dei dati.

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



Figura 1.4 *Potenziostato-galvanostato Autolab.*

1.3.3 *Tecnica di caratterizzazione XPS*

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) è una tecnica di spettroscopia quantitativa utilizzata per valutare la composizione della superficie dei materiali. Essa consente infatti di conoscere il tipo e la quantità degli elementi chimici che compongono la superficie di un materiale e di determinarne lo stato di legame. Le misure XPS si ottengono irradiando il campione con un fascio di raggi X e rilevando numero e l'energia degli elettroni che vengono espulsi dalla superficie del materiale, in condizioni di vuoto quasi assoluto (ultra-high vacuum, UHV). Si tratta di una tecnologia ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) poiché permette lo studio della chimica di superficie di un materiale, al suo stato inalterato oppure dopo aver subito dei trattamenti chimico-fisici.

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

$$E_b = E_{ph} - (E_k + \phi) \quad (1.17)$$

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

La tecnica permette di analizzare i primi strati atomici che compongono la superficie, con profondità dell'ordine di alcuni nm.

La Figura 1.5 rappresenta l'impianto per ottenere le misure di caratterizzazione XPS.

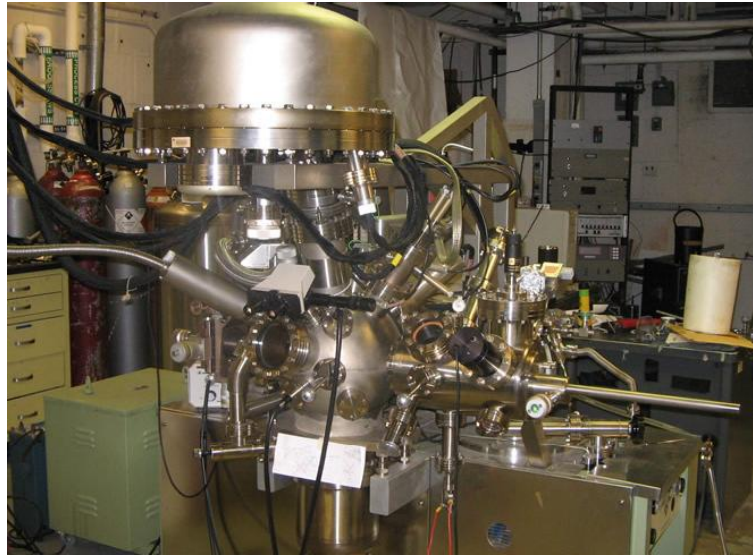


Figura 1.5 Impianto per analisi XPS.

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

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

1.3.4 Analisi di immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica usata per la rilevazione di target specifici in campioni biologici. Questa metodica sfrutta la specificità degli anticorpi verso i loro antigeni per coniugare coloranti fluorescenti o enzimi a biomolecole target su cellule e tessuti, e valutare così l'espressione del target o la sua distribuzione. L'immunofluorescenza può essere diretta,

quando usa un solo anticorpo coniugato al fluoroforo, oppure indiretta, quando fa uso di un anticorpo primario specifico per l'antigene e un anticorpo secondario che riconosce l'host, ossia l'animale in cui è stato generato il primario. La tecnica indiretta permette l'amplificazione del segnale e l'utilizzo di un solo anticorpo secondario per più anticorpi primari, che siano stati prodotti in host della stessa specie (*Muzi and Bologna, 1999*).

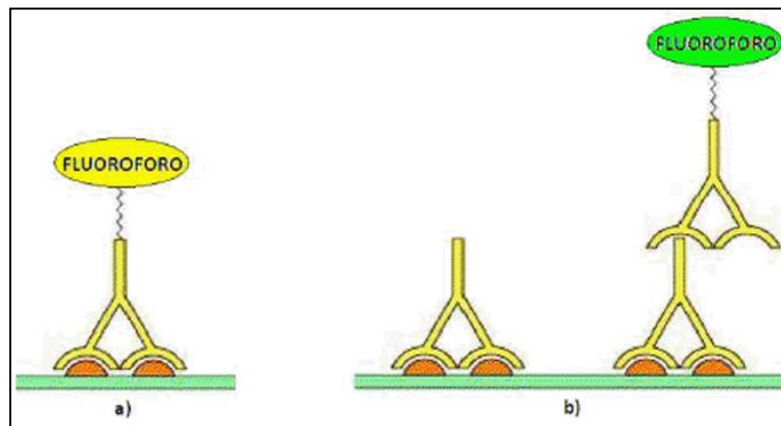


Figura 1.6 a) Schema di immunofluorescenza diretta, con AC primario coniugato al fluoroforo. b) Schema di immunofluorescenza indiretta, con AC primario che riconosce l'antigene e AC secondario coniugato al fluoroforo che riconosce l'AC primario.

1.3.5 Strumentazione utilizzata per l'ingegnerizzazione dell'enzima glucosio ossidasi

Le tecniche utilizzate per verificare l'effettiva presenza di biotina legata all'enzima glucosio ossidasi sono due:

- Spettrometria di massa MALDI/TOF;
- Test con HABA/Avidina;
- Spettroscopia UV-VIS.

La prima tecnica si utilizza per determinare l'aumentato peso molecolare dell'enzima modificato, così da ricavare la quantità di biotina presente.

1.3.5.1 Spettrometria di massa MALDI TOF

La spettrometria MALDI risulta adatta a realizzare questo studio poiché è indicata per analisi di composti termolabili e ad alto peso molecolare. Essa è quindi utilizzabile per alcune classi di molecole di origine biologica, tra cui appunto le proteine, particolarmente fragili e soggette a distruzione troppo rapida con le tecniche di ionizzazione convenzionali.

La tecnica consiste nell'assorbire il campione su di una matrice, che può essere realizzata in vari materiali organici, solitamente glicerolo o acido picolinico, e, una volta portata in soluzione la matrice, nel bombardarla con un fascio laser ad azoto.

La matrice consente lo smorzamento degli effetti del fascio laser assicurando un'adeguata protezione all'analita che viene ionizzato e vaporizzato tramite l'energia in eccesso ceduta secondariamente dalla matrice stessa. Vengono così ottenuti ioni quasimolecolari generalmente a singola carica, come quelli creati dall'acquisizione o dalla perdita di un protone. In questo caso la tecnica MALDI viene abbinata a spettrometri dotati di analizzatore a tempo di volo (Time of flight, TOF).

1.3.5.2 Test mediante HABA/Avidina

Un'altra tecnica è quella di caratterizzare i prodotti tramite il metodo HABA/avidina, con cui è possibile calcolare il numero medio di biotine legate all'enzima attraverso misure di spettrometria UV-VIS con spettrometro Perkin Elmer Lambda 2.

Per HABA si intende un colorante organico che permette la valutazione delle biotine legate a una proteina. Il nome tecnico è Acido 2-(4'-idrossibenzeneazo) benzoico Sigma-Aldrich). Il colorante legato all'avidina produce un complesso giallo-arancione che assorbe a 500nm. La biotina libera va a sostituirsi al colorante HABA causando una diminuzione dell'assorbanza. In questo modo si ricava, attraverso una retta di taratura standard, la quantità di biotine libere presenti in soluzione. Il valore di biotine legate si otterrà quindi valutando la diminuzione di assorbanza del campione.

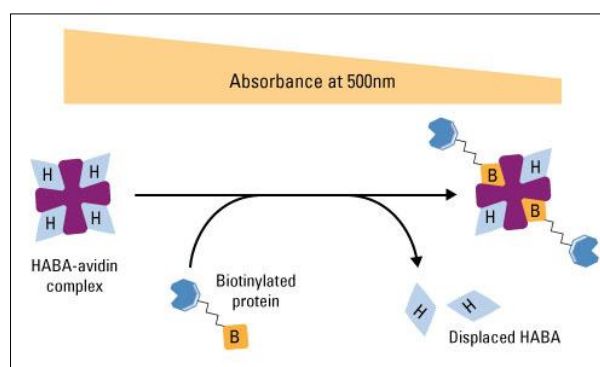


Figura 1.7 Schematizzazione del principio chimico-fisico su cui si basa il test HABA.

1.3.5.3 Spettroscopia UV-VIS

Per effettuare il test HABA e ricavare i dati di attività enzimatica ottenuti dall'analisi dell'assorbanza dei campioni, si ricorre all'utilizzo della spettroscopia UV-VIS.

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata nel campo della chimica analitica.

Essa si basa sull'assorbimento selettivo, da parte di molecole, delle radiazioni con lunghezza d'onda compresa fra 10 nm e 780 nm.

Questa tecnica si basa sul fatto che quando un fotone ultravioletto o visibile viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato elettronico fondamentale ad uno stato elettronico eccitato.

La legge che descrive i fenomeni di assorbimento è la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (1.18)$$

dove A è l'assorbanza, b il cammino ottico, c è la concentrazione molare della soluzione e ε è un coefficiente che dipende dalla concentrazione e dalla lunghezza d'onda, detto coefficiente di estinzione molare.

In un tipico spettro ultravioletto/visibile viene riportata in ascissa la lunghezza d'onda e in ordinata la percentuale di assorbanza. Se un materiale non è completamente trasparente si verificheranno degli assorbimenti e quindi delle transizioni tra livelli energetici elettronici. In questo secondo caso lo spettro registrato sarà caratterizzato da una serie di picchi di altezza variabile per ciascuna transizione, in relazione all'intensità dell'assorbimento stesso.

Sfruttando questa tecnica spettroscopica è possibile compiere analisi sia quantitative che qualitative, inoltre è possibile effettuare studi cinetici (determinazioni biochimiche di enzimi o applicazioni più generiche di cinetica chimica) e titolazioni.

Capitolo 2

Materiali e metodi

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

In primo luogo verrà riportato l'elenco dei materiali utilizzati in ordine alfabetico.

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

Seguirà la descrizione del protocollo che è stato impiegato per la realizzazione del biosensore nel chip microfluidico.

Si porrà infine l'attenzione sulle metodologie utilizzate per l'ingegnerizzazione dell'enzima GOx e sui test effettuati per verificare l'entità della modifica apportata e la relativa attività enzimatica.

2.1 Materiali utilizzati

Di seguito viene riportato l'elenco dei materiali, delle apparecchiature e dei programmi di calcolo utilizzati nelle diverse fasi del lavoro di Tesi.

- Acetonitrile, NC-CH₃ (Sigma Aldrich, IT);
- Acido 2-(4'-idrossibenzeneazo) benzoico (HABA) (Sigma-Aldrich, US);
- Acido cloridrico HCl 37% (Sigma Aldrich, IT);
- Acqua MilliQ (18.3 MΩ·cm);
- Adesivo epossidico, (Bostik, IT);
- Anticorpo anti-biotina prodotto in capra (Sigma-Aldrich, IT);
- Anticorpo secondario prodotto in capra (Sigma-Aldrich, IT);
- AutoCAD 2D 2010 (Autodesk, US);
- Avidina from egg white, (Sigma Aldrich, IT);
- Bilancia di precisione, (Sartorius, IT);
- Biopunch da 1,5 mm (HealthLink, US);
- Biotina N-hydroxysuccinimide ester (*biot-NHS*) (Sigma-Aldrich, IT);

- BSA FITC, (Sigma-Aldrich, IT);
- Centrifuga Sigma 1-14;
- Cisteammina, HS-(CH₂)₂-NH₂ (Sigma-Aldrich, IT);
- Cristallizzatore;
- D+ Glucosio anidro, C₆H₁₂O₆, (Labochimica, IT);
- Dimetilsulfossido (CH₃)₂SO, DMSO, (Sigma-Aldrich, IT);
- Filo di Argento, d=0.25mm, (Lamet s.p.a., IT);
- Filo di Platino/Iridio Pt90/Ir10, , (Advent, ENG);
- Filtri per siringa (Sartorius, IT);
- Forno ventilato (Heraeus Instruments, tipo UT 6120);
- GOx da Aspergillus Niger, (Sigma Aldrich, IT);
- Isopropanolo (Carlo Erba);
- ITO (formula In₂O₃·(SnO₂)_x, 70÷100 Ωsq⁻¹, 150÷300Å su vetro, Sigma Aldrich, IT);
- Lampada ultravioletta (30 UV Light Source, OAI, USA);
- Liofilizzatore Hetosicc (HETO Lab. Equipment, DEN);
- Membrane per dialisi MWCO = 14000Da (Delchimica Scientific Glassware - linea visking 14000, IT);
- Metossimetacrilato (1-metossi-2-propanolo-acetato, Sigma Aldrich, US);
- Micro-90 concentrated cleaning solution, (Sigma-Aldrich, US);
- Microscopio ottico (Leica Microsystems, IT);
- nastro adesivo (3M-Scotch, IT);
- Nastro conduttivo a base d'argento e particelle di nichel (3M, IT);
- Nitrito di sodio NaNO₂ (Sigma-Aldrich, IT);
- Nova 1.8 (MetroOhm, IT);
- OriginPro (OriginLab, US);
- *p*-fenilendiammina, NH₂-C₆H₄-NH₂ (Sigma Aldrich, IT);
- Phosphate Buffered Saline (PBS), (Gibco Life Technologies, US);
- Photoresist SU-8 2005 (MicroChem Corp., US);
- Photoresist SU-8 2100 (MicroChem Corp., US);
- Piastra riscaldante con agitator magnetic ARE (VelpScientifica, IT);
- Piastra riscaldante, (Torrey Pires Scientific, US);
- Plasma UV-ozono, (Bioforces Nanosciences);
- Poldimetilsilossano (PDMS), (Sylgard 184, Dow Corning, US);

- Pompa a siringa (11 ELITE I/W Dual, HARVARD Apparatus, US);
- Remover (Remover PG, MicroChem®, GE);
- Siringhe in PS (Beckton & Dickinson Co., US);
- Spettrofotometro UV/vis (Perkin Elmer Lambda 2, US);
- Spettrometro di massa TOF/TOF 5800System Laser Opti-Beam™ on axis Nd:YAG (AB SCIEX, US);
- Spin coater (WS-650-23);
- Test di attività enzimatica K-GLOX 03/11 (Megazyme, IRL);
- Trizma base, (Sigma-Aldrich, IT);
- Tubi in PTFE, ID=0.56mm ,(Cole Parmer, IT);
- Vetrini di FTO su borosilicato, (Sigma-Aldrich, US);
- Vetrino in borosilicato;
- α -metilferrocenemetanolo, α -MeFcMeOH (Sigma-Aldrich, IT);

2.2 Tecniche di microfabbricazione

Per realizzare il chip microfluidico sono stati utilizzati due differenti supporti:

- ITO depositato su vetrino;
- vetrino in borosilicato.

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

2.2.1. Realizzazione della fotomaschera

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

2.2.2 Pretrattamento del supporto

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

Per entrambi i supporti, si attua un primo lavaggio in cleaning solution al 2% in acqua milli-Q, in seguito uno in acqua milli-Q per rimuovere le tracce del primo lavaggio, infine si asciuga la superficie mediante azoto in pressione.

Nel caso del vetrino in borosilicato la procedura si conclude ponendolo in forno a 115 °C per 1÷3'.

2.2.3 Deposizione del polimero

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

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

Nella seguente Tabella 2.1 sono riportate le variabili manipolate utilizzate per ottenere gli spessori di *resist* impiegati in questo lavoro.

Tabella 2.1 Parametri di spin coating impiegati per ottenere film polimerici di diverso spessore e con diversi tipi di photoresist.

Tipo di photoresist	Spessore [μm]	Velocità di spin [rpm]
SU-8 2005	5	3000
SU-8 2100	100	3000

I photoresists impiegati sono 2: l'SU-8 2005 e l'SU-8 2100 per il supporto in ITO e in borosilicato rispettivamente.

Entrambi i photoresists sono resine epossidiche fotosensibili negative: si differenziano per il fatto che garantiscono uno spessore di polimero finale diverso, rispettivamente pari a 5 e 100 μm .

2.2.4 Pre-riscaldamento ed esposizione

Al fine di allentare le tensioni superficiali ed interne, si pone il supporto su una piastra riscaldante. Così facendo si favorisce l'evaporazione di eventuali residui di solvente. La temperatura della piastra e il tempo di riscaldamento vengono fissati in relazione allo spessore dello strato di

photoresist. In Tabella 2.2 sono riportati i valori usati nel presente lavoro, secondo quanto precisato nei datasheet del fornitore.

Tabella 2.2 Tempi di cottura in funzione dello spessore del film polimerico.

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

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

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

La Tabella 2.3 riporta le energie di esposizione per i due spessori considerati.

Tabella 2.3 Energia di esposizione in funzione dello spessore del film polimerico.

Spessore [μm]	Energia di esposizione [mJ cm^{-2}]
5	105
100	240

Si è osservato che il posizionamento di un vetrino sulla fotomaschera, oltre ad assicurare un miglior contatto tra la stessa e il supporto, comporta un parziale assorbimento della radiazione UV: ne deriva una sottoesposizione del 20% rispetto al tempo consigliato e questo, in base alle evidenze sperimentali, comporta una maggiore resistenza meccanica del photoresist.

2.2.5 Post-riscaldamento e sviluppo

Per favorire il cross-linking selettivo delle parti di polimero che sono state esposte alla radiazione, si effettua un riscaldamento post-esposizione (post-exposure bake, PEB). Similmente a quanto detto, il tempo e la temperatura dipendono dalle caratteristiche dello strato polimerico, come mostrato nella Tabella 2.4.

Tabella 2.4 Tempi di cottura post-esposizione e tempi di sviluppo in funzione dello spessore del film polimerico.

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

Lo sviluppo del resist si effettua mediante immersione completa del supporto in metossimetacrilato, che solubilizza la parte di polimero esclusa dall'esposizione alla luce UV. Come riportato sempre in Tabella 1.4, lo stato di sviluppo viene arrestato dopo un tempo prestabilito, mediante immersione in isopropanolo. A questo punto il supporto viene esposto all'aria perché possa asciugarsi. Nel caso del vetrino ricoperto di ITO lo si lascia riposare overnight prima di effettuare l'echting di modo che il resist esposto si fissi bene alla superficie.

2.2.6 Etching selettivo

Qualora si voglia disegnare la superficie del supporto, come nel caso dell'ITO, si può utilizzare il resist come maschera per proteggere la superficie sottostante. Una volta ottenuto il supporto di ITO con sopra il pattern polimerico, è necessario rimuovere le porzioni di ITO scoperte, in modo da realizzare il circuito finale desiderato. Si effettua quindi una rimozione chimica sistematica e selettiva (etching) dell'ITO non protetto dal polimero, mediante immersione per un'ora del supporto in una soluzione 0.5 M di HCl 37%, mantenuta ad una temperatura di circa 100 $^{\circ}\text{C}$ e movimentata attraverso un'ancoretta magnetica mediante l'utilizzo della piastra riscaldante con agitatore magnetico.

2.2.7 Rimozione del polimero

Una volta lavato con acqua milli-Q e lasciato asciugare, il vetrino così trattato viene immerso per 15' in un remover mantenuto a 60 $^{\circ}\text{C}$ in sonicatore: si tratta di una sostanza in grado di rimuovere il polimero reticolato presente sulla superficie del vetrino. Dopo questo passaggio finale e un successivo lavaggio con acqua, ne risulta un supporto vetroso che presenta il circuito elettrico in ITO desiderato per realizzare il biosensore. La Figura 2.1 rappresenta le varie fasi della fotolitografia.

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

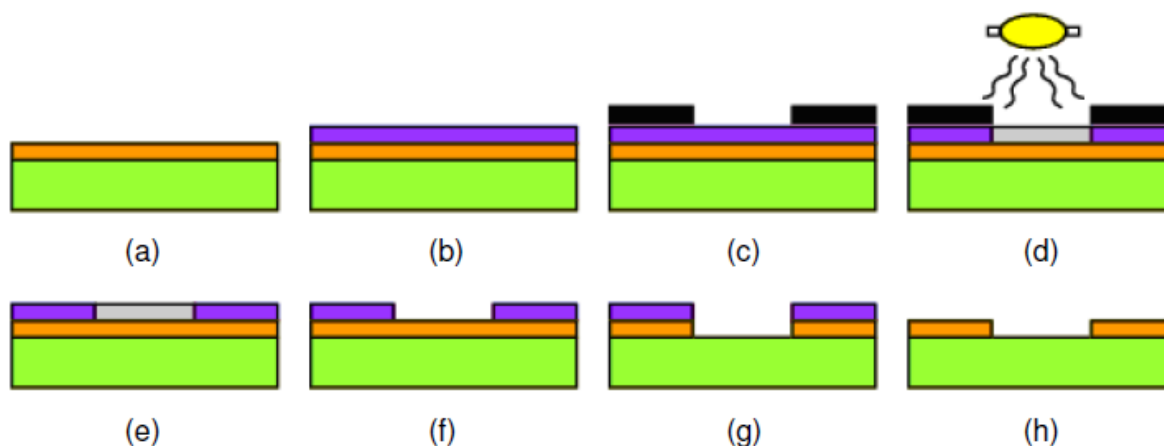


Figura 2.1 Principali fasi della fotolitografia: a) supporto iniziale; b) spin coating del materiale fotoresistente sul supporto; c) applicazione della fotomaschera; d) esposizione a radiazioni UV attraverso la fotomaschera; e) rimozione della fotomaschera; f) sviluppo del photoresist; g) etching della parte non protetta di substrato; h) rimozione del photoresist.

2.2.8 Soft-litografia

Una volta ottenuto il master di photoresist sul vetrino in borosilicato, si può realizzare lo strato di silicone che, accoppiato al vetrino con il circuito in ITO integrato, costituirà il chip microfluidico completo.

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

Il silicone utilizzato è il polidimetilsilossano (PDMS), una resina termoindurente che si ottiene miscelando, in rapporto ponderale 10:1, una matrice prepolimerica con un agente reticolante che permette l'indurimento della resina. Mediante un'adeguata agitazione meccanica, si ottiene una miscela omogenea viscosa che viene posta in un cristallizzatore. Dopo l'applicazione del vuoto (1 mmHg, 5') per rimuovere l'eventuale aria presente nel solvente, si riporta il silicone a pressione atmosferica e lo si versa sulla superficie vetrosa su cui è presente uno stampo di photoresist.

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

La polimerizzazione del silicone, una volta addizionato il componente indurente, avviene già a temperatura ambiente senza la formazione di sottoprodotti e si completa in un arco di tempo di 24 ore (tempo di passivazione di 4 ore, entro il quale si deve procedere alla polimerizzazione), tuttavia è possibile velocizzare il processo ponendo lo stampo in forno ventilato a 75°C per 2 ore.

Le fasi della soft-litografia sono illustrate in Figura 2.2.

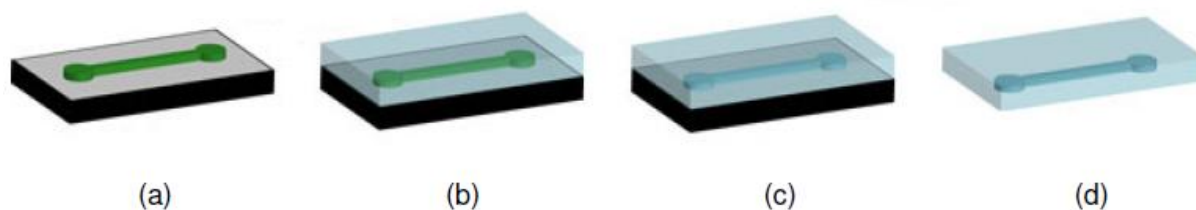


Figura 2.2 Principali fasi della soft-litografia: a) master di photoresist su silicio; b) versamento del PDMS e degasaggio; c) polimerizzazione in forno ventilato; d) estrazione del silicone dallo stampo.

Come riportato in Tabella 2.5, il silicone polimerizzato che si ottiene gode di ottime proprietà dielettriche, è flessibile se mantenuto in un intervallo di temperature comprese tra -50°C e $+200^{\circ}\text{C}$, è permeabile a piccole molecole gassose come l'ossigeno ed impermeabile all'acqua, inoltre è caratterizzato da una buona trasparenza, anche per spessori di 1 cm.

Tabella 2.5 Proprietà del PDMS. Sono segnate con (*) le proprietà che si riferiscono al PDMS dopo reticolazione.

Parametro	Valore	Unità di misura
Viscosità della base a 23°C	5500	mPa s
Viscosità della miscela a 23°C	4000	mPa s
Resistenza di passivazione a 23°C	2	ore
Resistenza alla trazione (*)	7.1	MPa
Allungamento a rottura (*)	140	%
Resistenza alla lacerazione (*)	2.6	kN m^{-1}
Gravità specifica a 23°C (*)	1.05	-
Coefficiente di conduttività termica (*)	0.17	$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$
Rigidità dielettrica (*)	21	kV mm^{-1}
Permittività (*)	2.75	-
Fattore di dissipazione (*)	0.001	-
Permeabilità a O_2 (*)	$2.84 \cdot 10^{-13}$	$\text{mol mm}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$

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

2.2.9 Accoppiamento mediante UV-ozono cleaner

L'adesione tra lo strato di PDMS così ottenuto e il supporto di ITO viene effettuata mediante un trattamento a "plasma freddo" in UV-ozono cleaner. Si tratta di una tecnica che sfrutta il principio del Dielectric Barrier Discharge (DBD), in base al quale si fa avvenire una serie di scariche elettriche tra due elettrodi separati da un materiale dielettrico, in questo caso aria atmosferica.

L'ossigeno molecolare O_2 , in seguito alla ionizzazione dell'aria, viene scisso in radicali ossigeno $O\bullet$ che si ricombinano per dare ozono O_3 : il trattamento con ozono facilita la formazione di gruppi -OH sulla superficie.

Anche in questo caso la pulizia delle superfici da trattare è importante. Prima di sottoporre le due porzioni del chip all'accoppiamento si prevede un'attenta pulizia delle stesse.

Il vetrino viene sottoposto a sonicazione per 20' in cleaning solution concentrata al 2%, mentre la pulizia del PDMS avviene utilizzando il nastro adesivo (3M-Scotch).

Per ottenere l'accoppiamento del chip si pone il vetrino con il circuito elettrico nell'UV-ozono cleaner per un'ora, si aggiunge poi il silicone, a cui è sufficiente un trattamento di solo mezz'ora.

L'adesione tra i due materiali è irreversibile a causa della formazione di legami covalenti e avviene in seguito a semplice contatto delle due superfici. Il chip così ottenuto viene posto su piastra riscaldante a 100 °C per 30', sotto un peso che assicuri una adesione efficace e omogenea.

2.3 Sistema di alloggiamento e connessione elettrica del chip

La piattaforma microfluidica così ottenuta viene posizionata in un sistema di alloggiamento appositamente predisposto. Questo viene realizzato mediante una scatola elettrica nella quale è presente un sostegno per il chip che ne prevede il bloccaggio e la connessione elettrica allo strumento Autolab.

Il chip microfluidico è stato collegato al potenziostato mediante un sistema di contatti e giunzioni elettriche. L'informazione elettrica che nasce sugli elettrodi in ITO arriva al potenziostato attraverso dello scotch conduttivo che, applicato sulle porzioni di elettrodo lasciate scoperte dal PDMS, trasferisce il segnale alla superficie opposta del vetrino. Il chip quindi, essendo fissato mediante un sistema a pressione su dei contatti elettrici appositamente predisposti, comunica elettricamente il segnale di ogni elettrodo allo strumento di misura. Per ottenere una cella elettrochimica efficiente risulta fondamentale l'implementazione corretta degli elettrodi di misura nel sistema.

L'elettrodo di riferimento (R), che controlla il potenziale dell'elettrodo di lavoro, e un elettrodo ausiliario, chiamato anche contro elettrodo (C), che sostiene e misura la corrente, sono stati realizzati mediante fili rispettivamente di argento e di una lega di platino e iridio.

Questi sono stati creati congiungendo attraverso saldatura a stagno e adesivo epossidico i fili dei metalli a un bulbo di stagno che a sua volta è stato connesso ad un cavo elettrico dotato di spinotto, che rende possibile il collegamento elettrico con Autolab.

Per rendere possibile l'utilizzo degli elettrodi di misura all'interno del chip si è provveduto a rivestire i fili di argento e di platino/iridio con tubicini in Teflon, che permettono l'innesto degli

elettrodi nel chip attraverso degli appositi fori ricavati sul silicone mediante un punch con diametro pari a 1.5 mm. Gli elettrodi a filo rivestiti con le guaine in Teflon prima del loro utilizzo nella piattaforma microfluidica vengono sottoposti ad un trattamento specifico per rimuovere l'aria contenuta nell'intercapedine tra i due materiali e permettere la successiva bagnatura dell'elettrodo da parte del fluido di processo. A tal fine si pongono i due elettrodi in un Becher riempito d'acqua all'interno di un cristallizzatore; si pratica il vuoto per 5' e infine si apre la valvola per consentire alla pressione di risalire. Questa operazione permette la fuoriuscita del gas dai tubicini in Teflon che verranno poi riempiti dall'acqua nel momento in cui la pressione torna a livelli atmosferici.

Come già accennato la struttura dispone di quattro elettrodi lavoranti; risulta quindi necessario trovare un modo semplice e ordinato che permetta di collegare lo strumento di misura all'elettrodo sul quale si vuole lavorare. Per realizzare ciò si predispone un sistema di alloggiamento dei contatti che renda chiara la connessione tra le uscite del potenziostato e quelle degli elettrodi in ITO.

Il chip e i due elettrodi di misura formano quindi una cella elettrochimica. Essa necessita dunque di venire alloggiata all'interno di una gabbia di Faraday che permetta di schermare le radiazioni elettromagnetiche provenienti dall'ambiente circostante che possono disturbare le misure.

Ciò si realizza mediante una apposita lamina di metallo che percorre le superfici interne della base e dei lati della scatola elettrica nella quale alloggia il chip. Le varie porzioni di lamina, tra loro connesse, confluiscono poi in una zona collegata alla messa a terra dello strumento mediante un cavo elettrico. La parte superiore dell'alloggiamento viene invece isolata ponendo sulla superficie interna una rete di materiale conduttivo con maglia sufficientemente fine da consentire una buona schermatura, senza al contempo ostacolare eccessivamente la visione del chip sottostante. Anche questo materiale viene poi collegato con la messa a terra dell'alloggiamento.

Per la realizzazione delle misure si utilizza come elettrolita una soluzione tampone a base di Trizma preparata in modo tale da avere un pH pari a 7,4. Inoltre si è utilizzato come tracciante redox il l' α -metilferrocenemetanolo (α -MeFcMeOH) con concentrazione 500 μ M in Trizma.

2.4 Determinazione del solvente e sistema di regolazione delle portate

Una volta messa a punto la struttura completa del chip, si passa alla scelta del solvente da utilizzare sia per solvatare i diversi reagenti ed il tracciante da immettere nel chip, sia da utilizzare come liquido di lavaggio.

Le colture cellulari che verranno controllate con il biosensore utilizzano come solvente una soluzione fosfato salino, detto PBS, che è una soluzione tampone comunemente usata nei laboratori di biologia e biochimica. Questa soluzione contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio

fosfato. Nelle colture cellulari si utilizza una soluzione tampone per mantenere costante il pH. La scelta di questa soluzione trova giustificazione nel fatto che è isotonica e non tossica per le cellule. In considerazione della futura applicazione del biosensore, preliminarmente si verifica la possibilità di utilizzare lo stesso solvente. È noto, infatti, che nel momento in cui vengono applicati agli elettrodi potenziali negativi il sodio presente in grandi quantità nella soluzione tampone intercala irreversibilmente nel semiconduttore ITO. Per verificare questo fenomeno si attuano delle prove sottoponendo il chip alle normali scansioni di voltaggio richieste per le misurazioni dopo aver inserito nel canale microfluidico la soluzione di PBS. Gli effetti del fenomeno di intercalazione sono mostrati in figura 2.3.

Questo fenomeno comporta una degradazione importante dell'elettrodo poichè va a ridurre drasticamente la sua conducibilità. Le prestazioni dell'elettrodo non risultano diminuite solo dal punto elettrico, ma anche in termini di proprietà ottiche. Infatti l'intercalazione del metallo nel semiconduttore comporta una perdita di trasparenza tale da dover considerare l'elettrodo completamente opaco.



Figura 2.3 Base del chip microfluidico dopo esser stato disaccoppiato dal silicone: nel tondo si mostra il pattern di ITO che è stato a contatto con una soluzione di PBS e a cui sono stati applicati potenziali negativi. L'effetto di intercalazione è visibile anche ad occhio nudo.

I risultati ottenuti hanno indotto ad utilizzare un solvente diverso.

Il solvente da impiegare però deve rispettare caratteristiche stringenti: dev'essere innanzitutto compatibile con le colture cellulari, non interagire con le reazioni metaboliche e, ovviamente, non contenere sodio. La scelta ricade su una soluzione tampone a base di un composto organico, noto come tris (idrossimetil) amminometano, che prende il nome di Trizma (Sigma-Aldrich). Questa soluzione tampone risulta adatta poiché la molecola principale è di tipo organico ed, essendo di dimensioni molto maggiori rispetto ad uno ione metallico, non dà origine al fenomeno di intercalazione. Per ottenere il valore desiderato per il pH della soluzione si aggiunge HCl 0.1M,

dopo aver solvatato il sale in acqua Milli-Q. Per gli usi del biosensore si sceglie di avere un tampone a pH 7.4.

La movimentazione dei fluidi all'interno del chip microfluidico viene effettuata per mezzo di una pompa a siringa (11 ELITE I/W Dual, HARVARD Apparatus, US) in grado di garantire un controllo altamente accurato delle portate, di ordini di grandezza anche micronici. Lo strumento si compone di un sostegno per mezzo del quale è possibile inserire il modello e la capacità delle siringhe montate e i valori di portata desiderati. La pompa può funzionare in modalità infusione o aspirazione. Inoltre è possibile per l'utente programmare il funzionamento, definendo tempi di attesa o cicli di operazioni.

La pompa a siringa è collegata al sistema appositamente costruito per l'alloggiamento del chip microfluidico.

Tutto il circuito microfluidico trasporto per la movimentazione dei fluidi è stato realizzato mediante tubi in PTFE (Cole Parmer®, IT) del diametro interno di 0.56 mm ed esterno di 1.1 mm, opportunamente raccordati alla pompa ed al chip.

2.5 Sviluppo del biosensore

Per realizzare l'electrografting sono stati utilizzati come reagenti i Sali di diazonio e la cisteamina; le condizioni di reazione testate differiscono per concentrazioni dei reagenti, solventi, valori di pH e modalità di electrografting.

La deposizione elettrochimica dei Sali di diazonio è stata fatta avvenire facendo reagire nel chip microfluidico una soluzione composta da:

- 5 mM di *p*-fenilendiammina;
- 5 mM di nitrito di sodio;
- Solvente: 0.1 M di HCl in acqua Milli-Q.

Per fare avvenire la reazione si è effettuata una voltammetria ciclica da 0.5V a -0.4V con velocità di scansione di 0.1V/s.

Subito dopo la reazione si procede ad un lavaggio con acqua Milli-Q per 3 minuti per 100 μ L/min.

Nella deposizione elettrochimica della cisteamina sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- 5 mM di cisteamina;
- Solvente: acetonitrile.

Preliminarmente si è provveduto a deossigenare l'ambiente e la soluzione: nella soluzione è stato insufflato azoto per 15', mentre l'alloggiamento del chip è stato messo in pressione di azoto per 30'.

In queste condizioni si è attivata la reazione con una voltammetria ciclica tra 0 e 1V, con una velocità di scansione di 0.15V/s.

Si è quindi provveduto ai depositi di materiale biologico presentando seguendo per tutti la stessa metodologia:

- viene immessa nel canale microfluidico la soluzione in cui è disciolta la proteina;
- si lascia trascorrere il tempo di deposito predefinito;
- viene effettuato un lavaggio di 3 minuti ad una portata di 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ utilizzando il solvente in cui era solubilizzata la molecola.

Le molecole depositate sono:

- Biotina succinimide;
- Avidina;
- GO_x, biotilinata.

Si riportano in tabella 2.6 le concentrazioni utilizzate e il tempo di deposito per ogni proteina impiegata.

Tabella 2.6 Concentrazioni e durata del deposito di ogni molecola coinvolta nello sviluppo del biosensore.

Molecola	Concentrazione	Durata del deposito, [min]
Biotina	20 μM	30
Avidina	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20
GO _x	1 mg/mL	60

Per quanto riguarda la calibrazione del biosensore utilizzato si utilizzano delle soluzioni di Trizma a diverse concentrazioni di glucosio.

Per ottenere delle soluzioni con una buona precisione di concentrazione si preferisce pesare mediante una bilancia di precisione il glucosio anidro per ogni aliquota e diluirlo nel corretto volume di solvente.

Le soluzioni così ottenute vengono poi rese sterili attraverso la filtrazione mediante appositi filtri con una porosità tale da permettere la separazione meccanica della soluzione da batteri o microrganismi con diametro superiore ai 0.2 μm . Questa operazione viene condotta per evitare la diminuzione di glucosio dovuta a proliferazione batterica.

I valori ottenuti dalle varie misurazioni in glucosio vengono poi elaborati mediante il programma Nova. Dal fitting dei valori ottenuti si ricavano quindi i parametri del modello di Michaelis-Menten, mediante l'utilizzo dello strumento di Fitting del programma di calcolo OriginPro.

2.6 Protocollo di ingegnerizzazione della GOx

In questo paragrafo si riportano i protocolli relativi alla modifica di GOx mediante biotina e le tecniche di analisi utilizzate per la verifica.

2.6.1 Metodo di modifica enzimatica

Per la realizzare la modifica dell'enzima GOx si utilizzano due diverse condizioni di reazione: nella prima modifica il rapporto stechiometrico tra GOx e biotina è 15:1, mentre nel secondo caso si è usato un rapporto 19:1.

Per quanto riguarda la prima modifica si sono stati utilizzati 30 mg di GOx, equivalenti a 0.418 μmol , precedentemente purificati tramite dialisi, sono stati disciolti in 500 μL di tampone borato 0.1M a pH = 8.2.

Alla soluzione sono stati aggiunti 324 μL di una soluzione di biotina-NHS 20 mM in DMSO che corrispondenti a 6.48 μmol di soluto.

La sintesi è stata condotta con un rapporto molare biotina:enzima di 15:1. La miscela è stata lasciata a reagire al buio e sotto agitazione per circa 8 ore.

Successivamente la miscela di reazione è stata dializzata contro acqua deionizzata, in membrana con cut-off a 14000 g/mol e quindi liofilizzata.

Relativamente alla seconda modifica sono stati impiegati 6.5 mg di GOx nativa, pari a 90.5 nmol, disciolti in 500 μL di tampone borato 0.1M a pH 8.0 e posti sotto agitazione in una vial. Per quanto riguarda la biotina ne sono stati disciolti 1.2 mg, pari a 3.5 μmol , in 100 μL di DMSO.

Tale soluzione è stata quindi aggiunta all'enzima in più aliquote. Sono state effettuate 5 aggiunte da 10 μL ad intervalli di circa 5 minuti ciascuna, per una quantità effettiva di biotina di 1.75 μmol . Il rapporto molare biotina:enzima per la reazione risulta 19:1. La reazione è stata lasciata proseguire overnight.

La miscela è stata posta in dialisi contro acqua deionizzata, in membrana con cut-off a 14000 g/mol per 24 ore e quindi liofilizzata per ulteriori 24 ore.

2.6.2 Protocollo di verifica della modifica enzimatica

Per verificare poi l'avvenuta modifica dell'enzima si ricorre a due tecniche già presentate nel Capitolo 1:

la spettrometria di massa MALDI TOF e il test con HABA/Avidina.

Per quanto riguarda quest'ultimo lo strumento utilizzato per la misura di assorbanza è uno spettrofotometro UV-VIS.

Le letture di assorbanza sono state effettuate a 500 nm, con cuvette in quarzo da 1 cm.

Lo strumento è stato azzerato con acqua milliQ.

La soluzione HABA è stata ottenuta solubilizzando 24.2 mg di HABA in 9.9 mL di acqua milliQ a cui sono stati aggiunti 100 μ L di NaOH 1N.

Per la soluzione HABA/avidina 10 mg di avidina sono stati disciolti in 600 μ L della precedente soluzione e si è portato a volume di 20 mL con una soluzione di PBS a pH 7.2

Successivamente in una cuvetta sono stati introdotti 900 μ L della soluzione HABA/avidina e è stata misurata l'assorbanza a 500 nm ($A_{H/A}$). Per determinazioni ottimali, questo valore deve essere compreso tra 0.9-1.3 unità.

Sono stati aggiunti quindi aggiunti 100 μ L di una soluzione del campione preparata sciogliendo 0,344 mg di enzima modificato in 1 mL di tampone PBS.

La soluzione è stata leggermente agitata e si è misurata l'assorbanza a 500 nm ($A_{H/A/B}$). La misura è stata ripetuta finché non si è raggiunta la stabilità del valore alla seconda cifra decimale.

Per determinare la quantità di biotina presente sono stati eseguiti semplici calcoli: la concentrazione molare di biotina si ottiene con la formula

$$c_B = (A_{H/A} - A_{H/A/B}) / \epsilon b \quad (2.1)$$

dove c_B è la concentrazione di biotina, $A_{H/A}$ è l'assorbanza rilevata sulla soluzione di HABA senza campione, $A_{H/A/B}$ è la assorbanza misurata con il campione disciolto in soluzione, ϵ il coefficiente di estinzione molare e b il cammino ottico.

Per calcolare il rapporto molare tra biotina e GOx si deve considerare che il campione su cui viene fatta la misura è stato diluito dieci volte per cui il rapporto molare tra le due molecole diventa

$$MR = (c_B * 10) / c_0 \quad (2.2)$$

dove MR è il rapporto molare e c_0 la concentrazione molare dell'enzima. In alternativa è possibile utilizzare la procedura di calcolo on-line disponibile sul sito internet del produttore dei reagenti.

2.6.3 Protocollo di test di attività enzimatica

Per il test di attività enzimatica si è utilizzato il kit Megazyme K-GLOX 03/11, seguendo il protocollo fornito dal produttore. L'analisi ha richiesto la preparazione di 3 soluzioni e di un buffer.

Per la preparazione della soluzione 1 si è solubilizzato il contenuto della bottiglia 1 (tampone fosfato a pH 7.0 addizionato di acido p-idrossibenzoico e sodio azide) in 150 mL di acqua milliQ.

In questa soluzione è stato poi disciolto il contenuto della bottiglia 2 (perossidasi aggiunta a colorante e stabilizzanti). Si è portato il pH a 7.0 con HCl 0.1 M e si porta a volume di 200 mL con acqua milliQ.

Per quanto riguarda la soluzione 2 si scioglie 4.5 g di D-glucosio standard contenuto nella bottiglia 3 in 40 mL di acqua milliQ.

Infine la soluzione 3 viene preparata solubilizzando il contenuto della bottiglia 5 (tampone fosfato a pH 7.0) in 40 mL di acqua milliQ e circa 20 mL di questa soluzione sono stati utilizzati per sciogliere il contenuto della bottiglia 4 (glucose oxidase standard). Al liquido è stato poi aggiunto il rimanente tampone fosfato e portato a volume di 50 mL con acqua milliQ.

La soluzione tampone, denominata buffer A, è preparata sciogliendo 0.86 g di fosfato di sodio diidrato $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g di BSA, 0.01 g di nitrato di sodio NaNO_3 .

Dopo aver preparato le varie soluzioni secondo il protocollo fornito dal produttore si procede con la preparazione del campione su cui effettuare il test enzimatico.

In 2 mL di buffer A si prepara una soluzione di enzima modificato ad una concentrazione di circa 0.5 mg/mL. Quindi si prelevano 2 μL e si diluiscono nuovamente a 2 mL con buffer A, attuando quindi una diluizione di 1:1000.

Tale rapporto di diluizione deve essere adattato sia secondo la concentrazione della soluzione iniziale, sia secondo il valore di attività atteso per l'enzima in esame. Infatti, la diluizione in rapporto 1:100 indicata dal produttore è tarata sugli standard forniti nel kit, la cui attività è nell'ordine delle centinaia di unità per grammo.

All'aumentare dell'ordine di grandezza per l'attività attesa si procede con diluizioni maggiori.

Per definizione, ogni unità di attività corrisponde alla quantità di enzima capace di ossidare 1.0 $\mu\text{mol}/\text{min}$ di β -D-glucosio a D-gluconolattone e H_2O_2 a pH = 5.1 e alla temperatura di 35°C.

Si procede quindi alla misura effettuata ponendo il campione in cuvette di quarzo di 1cm. Innanzitutto si azzerava lo strumento con acqua milliQ.

Per effettuare la misura si utilizzano due cuvette, una per la soluzione di confronto e una per il campione. In entrambe le cuvette si introducono 2 mL di soluzione 1 e 500 μL di soluzione 2. Dopo aver agitato le cuvette e atteso 5 minuti si è letta l'assorbanza delle due soluzioni a 510 nm, questo valore corrisponde all'assorbanza A_1 .

Successivamente, ad una cuvetta si aggiungono 500 μL di campione e alla cuvetta di riferimento altrettanti di acqua milliQ.

Infine, dopo un tempo di attesa di 20 minuti esatti, si è letta l'assorbanza A_2 .

I calcoli necessari per stimare l'attività enzimatica prevedono i seguenti passaggi: prima di tutto si esegue la sottrazione tra il segnale finale di assorbanza e quello iniziale sia per il campione che per il riferimento.

$$A_{bl/cmp} = (A_2 - A_1)_{bl/cmp} \quad (2.3)$$

dove $A_{bl/cmp}$ è la differenza di assorbanza del campione o del riferimento misurata prima (A_1) e dopo (A_2) aver aggiunto alle cuvetta GOx e equivalente acqua milli-Q per il riferimento.

Alla differenza di assorbanza del campione si sottrae quella del bianco.

$$\Delta A = A_{cmp} - A_{bl} \quad (2.4)$$

È a quest'ultima che si riferiscono i calcoli di attività enzimatica riferita al campione di 500 μ L. L'espressione (2.5) permette di determinare l'attività enzimatica in mU riferita a questo volume:

$$(15.4 \cdot \Delta A) + (44.7 \cdot \Delta A) + 0.03 \quad (2.5)$$

Volendo poi calcolare l'attività rispetto alla massa di campione si utilizza la (2.6) che restituisce l'attività con dimensioni [U/g]:

$$[U/g] = \frac{(mU/0.5 \text{ mL} \cdot 2 \cdot D)}{c} \quad (2.6)$$

dove con D si intende il fattore di diluizione, mentre c rappresenta la concentrazione iniziale del campione espressa in [g/L].

2.7 Protocollo di immunofluorescenza

La preparazione del chip per quest'analisi prevede i seguenti passaggi. Per prima cosa si inizia con un lavaggio del canale microfluidico con PBS 1X, in modo da togliere le sostanze presenti nel chip; dopodiché si immette una soluzione di BSA al 3% disciolta in PBS 1X. Questo passaggio ha lo scopo di saturare gli eventuali siti attivi con la proteina BSA, in questo modo gli anticorpi che verranno immessi andranno ad attaccarsi in modo specifico al relativo antigene al relativo antigene, evitando che gli anticorpi rimangano all'interno del canale in modo aspecifico.

Dopo che il canale è rimasto immerso in soluzione di BSA per 20 minuti, si effettuano tre lavaggi con il PBS 1X per rimuovere la BSA in eccesso. A questo punto si introduce una soluzione di anticorpo anti-biotina, detto anticorpo primario, in concentrazione 40 µg/mL in soluzione di NaCl e lo si lascia nel chip per 1 ora. Si continua attuando un'altra serie di lavaggi e dopo questi si immette l'anticorpo secondario che dev'essere prodotto nello stesso organismo in cui è stato ottenuto l'anticorpo primario, in modo che vi sia riconoscimento tra i due e che quindi possano legarsi in modo specifico. Nel nostro caso si utilizzano anticorpi prodotti in capra. L'uso dell'AC secondario ha la funzione di legare l'anticorpo primario e di marcarlo: su di esso infatti è legato un gruppo fluoroforo che ne permette l'individuazione sotto microscopio ottico dopo che al campione è stata fornita la corretta energia per dare fluorescenza.

Nel momento in cui si introduce l'anticorpo secondario il chip deve rimanere al buio per 45', per permettere all'anticorpo di legarsi al primario senza ricevere luce dall'ambiente.

Si esegue quindi l'ultimo lavaggio in PBS 1X e lo si ripete per tre volte per eliminare le molecole presenti in modo aspecifico. A questo punto si studia la risposta del test sotto microscopio ottico.

Per avere un controllo negativo si sono studiati alle stesse condizioni due diversi campioni: in uno era stato praticato il grafting e il deposito di biotina, mentre il controllo negativo è stato sottoposto al protocollo di immunofluorescenza senza aver subito alcuna modifica o deposito.

Sono state effettuate diverse misurazioni al microscopio variando il gain, per il quale sono stati usati valori di 2 e 3, lo zoom, che ha ingrandito l'oggetto da 5x a 20x e l'esposizione, che è variata da 600 a 1000 ms. L'intensità di irraggiamento è stata mantenuta al valore massimo, pari a 5.

Le foto in fluorescenza sono state ottenute in rosso con filtro N21, mentre il posizionamento dell'oggetto è stato effettuato in grigio, con filtro TH-PLC.

Capitolo 3

Risultati

In questo Capitolo verranno esposti i risultati ottenuti nel lavoro di Tesi: verranno dapprima mostrati i risultati relativi alla realizzazione della piattaforma microfluidica e quelli dell'intero sistema messo a punto; verrà quindi analizzata la modifica irreversibile dell'elettrodo in ITO effettuata; infine si prenderà in esame un'applicazione del dispositivo messo a punto verificando con diverse tecniche la validità delle assunzioni fatte.

3.1 Realizzazione del chip

Lo scopo di questa Tesi è quello di realizzare un biosensore per la rilevazione del glucosio in una piattaforma microfluidica. Un analogo sistema di rilevazione era già stato messo a punto in studi precedenti ma su base macroscopica. Il primo passo quindi è la realizzazione di un chip che possa contenere il biosensore.

La costruzione del biosensore microfluidico prevede le seguenti fasi:

1. Corrosione dell'ITO e fabbricazione dello stampo in PDMS per la creazione del canale microfluidico;
2. Costruzione dell'elettrodo di riferimento e del contro elettrodo;
3. Messa a punto del sistema di alloggiamento e connessione con il sistema di misura.

1 Corrosione dell'ITO e fabbricazione dello stampo in PDMS per la creazione del canale microfluidico.

Come descritto nel §2.2, per prima cosa è necessario ottenere il circuito di ITO su supporto di vetro borosilicato. Ciò è stato ottenuto mediante utilizzo di fotomaschere e successivi protocolli di corrosione selettiva e microfabbricazione seguendo i protocolli di sviluppo e rimozione delle maschere fotolitografiche. In figura 3.1a è riportata la fotomaschera che permette di realizzare un circuito elettrico con quattro differenti elettrodi. Il vetrino ha forma quadrata. La scelta di progettare un circuito con quattro elettrodi deriva dalla possibilità di avere quattro elettrodi lavoranti all'interno dello stesso chip microfluidico. Tale configurazione permette, in questa fase di studio, di effettuare misure ripetute e controlli, mentre per applicazioni future permetterà di condurre misurazioni multiparametriche in linea.

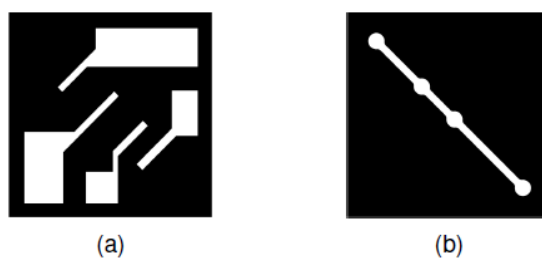


Figura 3.1 Fotomaschere per la realizzazione del chip microfluidico: a) fotomaschera per il circuito di ITO su vetro; b) fotomaschera per lo strato superiore in PDMS del chip. Le immagini sono in dimensione reale.

2. Costruzione dell'elettrodo di riferimento e del contro elettrodo.

A partire da un filo di argento e un filo di una lega 90/10 di platino e iridio si costruiscono l'elettrodo di riferimento e il contro elettrodo che vengono, quindi, alloggiati nel chip. Il collegamento al potenziostato è realizzato attraverso opportune connessioni elettriche.

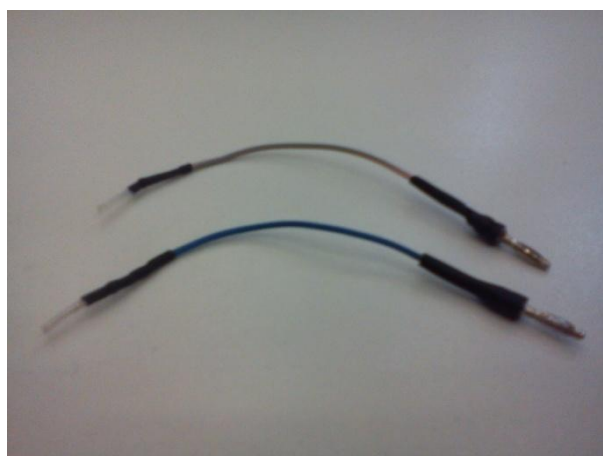


Figura 3.2 Elettrodo di riferimento e contro elettrodo realizzati appositamente per il loro utilizzo nella piattaforma microfluidica. Risulta ben visibile lo spinotto che consente la comunicazione del segnale con l'elettrodo di misura; l'altra estremità degli elettrodi è costituita dal filo metallico all'interno di un tubicino di teflon.

L'utilizzo del tubo in teflon contenente l'estremità dell'elettrodo assicura la tenuta anche quando i fluidi all'interno della piattaforma microfluidica sono in movimento.

Ogni elettrodo viene calibrato, prima dell'uso, in una cella elettrochimica esterna e mantenuto sempre in soluzione acquosa quando non adoperato, per garantire riproducibilità nei risultati. Il filo di Ag deve essere considerato uno pseudo-riferimento per la cella elettrochimica microfluidica in quanto il potenziale dell'elettrodo non è noto e costante come nel caso dei riferimenti standard.

La figura 3.3 mostra il collocamento degli elettrodi esterni all'interno della piattaforma microfluidica.

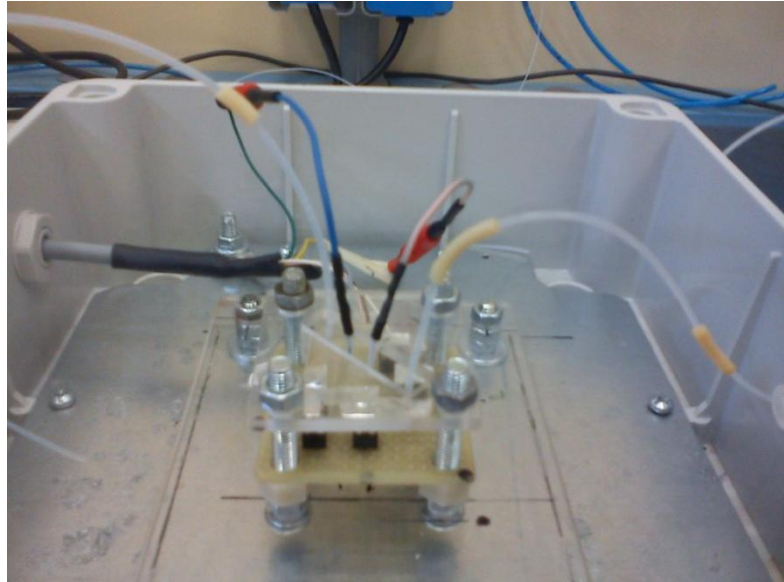


Figura 3.3 Collocamento degli elettrodi di misura nella piattaforma microfluidica e sistema di connessioni che permette la movimentazione dei fluidi all'interno dal canale microfluidico.

3. Messa a punto del sistema di alloggiamento e connessione con il sistema di misura.

In Figura 3.4 è riportato il sistema comprendente la piattaforma microfluidica, il suo alloggiamento, le connessioni elettriche e lo strumento di misura nei vari dettagli.



Figura 3.4 (Da destra a sinistra) Sistema di alloggiamento della piattaforma microfluidica, pompa a siringa per l'inserimento dei liquidi, sistema di connessione con lo strumento e apparecchiatura con la quale si realizzano le misurazioni.

Per evitare interferenze elettromagnetiche da campi esterni che potrebbero inficiare le misure di corrente, l'intero sistema viene alloggiato in un contenitore in policarbonato rivestito al suo interno con nastri conduttori, disposti in modo da realizzare una gabbia di Faraday. La scatola è dotata di un sistema di tenuta che permette di lavorare in atmosfera controllata.

3.2 Influenza della portata

La funzionalizzazione degli elettrodi costituenti il biosensore è tipo covalente.

Risulta pertanto importante assicurare una corretta pulizia della superficie dell'elettrodo e del canale microfluidico in modo da rimuovere le molecole che non hanno reagito e che sono quindi rimaste adsorbite sul fondo del canale. È fondamentale perciò uno studio preliminare sulle portate da utilizzare per assicurare un'efficace fase di lavaggio.

Benchè in microfluidica il flusso sia di tipo laminare e la velocità alle pareti dei canali sia molto bassa, si è visto che l'utilizzo di elevate portate comporta valori di velocità in prossimità della superficie dell'ordine dei cm/s che provocano un'alterazione della struttura chimica realizzata sulla superficie stessa. Nello specifico, già lavorando con una portata di 100 μ L/min, si ha una velocità di 1.6 cm/s, in grado di compromettere la struttura del biosensore.

Si effettua, quindi, uno studio per determinare quale sia la minima portata che permetta di rimuovere solo le sostanze adsorbite sulla superficie del canale. Il sistema di regolazione delle portate è realizzato con una pompa a siringa. Le siringhe impiegate sono in polistirene da 3 mL. La pompa a siringa è collegata al chip microfluidico mediante tubi in PTFE.

L'analisi sull'influenza delle portate di lavaggio nel chip microfluidico è realizzata mediante utilizzo della microscopia ottica a fluorescenza. Allo scopo si introduce nel canale una soluzione fluorescente e si lascia che questa si depositi sulla superficie del canale; alimentando poi il canale con una soluzione di lavaggio a portate diverse, è possibile avere traccia della presenza della specie fluorescente nel chip tramite microscopia a fluorescenza: l'intensità del segnale è proporzionale alla concentrazione di specie fluorescente nel canale. In figura 3.5 vengono riportate due immagini ottenute con il microscopio ottico: la prima mostra il canale riempito con la soluzione fluorescente mentre la seconda mostra l'effetto di un lavaggio a 25 μ L/min per un minuto.

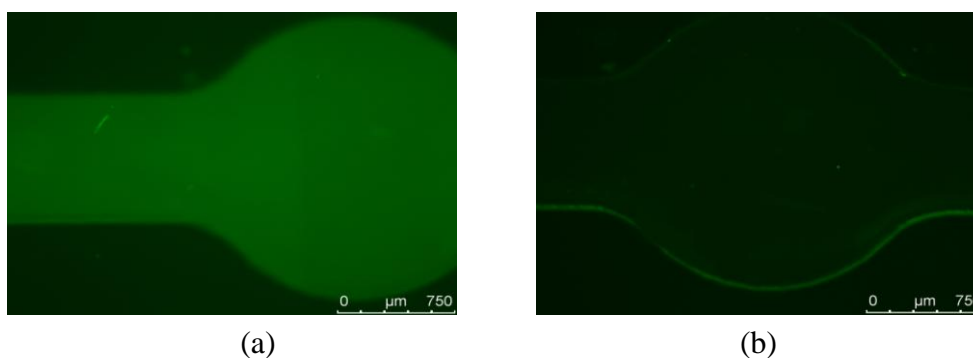


Figura 3.5 Immagini ottenute in fluorescenza al microscopio ottico: (a) mostra il canale riempito da BSA fitc; (b) mostra la fluorescenza emessa dal canale dopo un lavaggio in Milli-Q di un minuto ad una portata di 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

I dati riportati nel grafico 3.6 sono normalizzati rispetto al valore di intensità di fluorescenza a portata di lavaggio nulla. Tutti i lavaggi hanno avuto una durata di un minuto.

Le immagini raccolte sono state analizzate utilizzando il programma ImageJ[®] che permette di ricavare l'intensità di fluorescenza attraverso l'analisi dei pixel costituenti l'immagine.

In figura 3.6 sono riportati i risultati ottenuti dopo lavaggi a portate diverse.

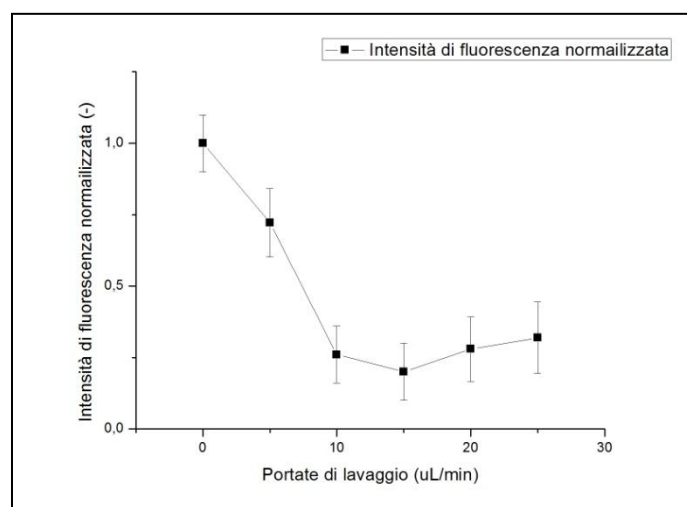


Figura 3.6 Grafico che riporta l'andamento dell'intensità di fluorescenza rilevata al microscopio ottico al variare della portata di lavaggio. I valori riportati vanno intesi come normalizzati ognuno al rispettivo campione iniziale.

Come si evince dal grafico per portate basse non si ha un calo sensibile della fluorescenza all'interno del canale. Aumentando la portata (sopra il valore limite di 10 $\mu\text{L}/\text{min}$), l'intensità diminuisce in maniera drastica fino a raggiungere un plateau: i valori di intensità si assestano attorno al 25%.

Sulla base dei risultati ottenuti, si sceglie di utilizzare una portata di 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ per una durata di tre minuti in modo da assicurare la rimozione dal chip delle specie adsorbite.

3.3 Modifica dell'elettrodo mediante deposizione elettrochimica

Dopo aver realizzato un chip microfluidico elettrochimico, l'attenzione è rivolta alla definizione e messa a punto di una metodologia che permetta di rendere chimicamente attiva la superficie. L'ITO infatti, essendo un materiale ceramico, ha una superficie chimicamente poco attivabile. Risulta quindi necessario individuare una strategia specifica per indurre una reazione su questo materiale: tra le possibili si è scelto di utilizzare l'electrografting.

Lo scopo è quello di trovare un agente accoppiante che possa stabilire un legame forte con la superficie dell'ITO e al contempo permettere il successivo attacco dell'enzima in modo da costituire il biosensore. I principi teorici relativi a questa metodologia sono descritti al Capitolo 1.

In questo lavoro sono stati individuati due tipi di molecole adatte allo scopo: i sali di diazonio e la cisteammina.

Sono stati scelti questi materiali poiché entrambi mettono a disposizione ammine alle quali può legarsi la biotina attraverso la formazione di un legame ammidico. L'intento è quindi quello di modificare irreversibilmente il semiconduttore andando a creare su di esso un self-assembled monolayer di ammine.

3.3.1 Modifica superficiale mediante sali di diazonio

In questo paragrafo si riporta lo studio effettuato sulla reazione di grafting mediante sali di diazonio.

L'electrografting di specie chimiche a base di sali di diazonio compare in letteratura (Lyskawa e Bélanger, 2006) in riferimento alla modifica superficiale di un elettrodo in oro, in condizioni statiche. Per questo caso si sceglie di mantener operare in condizioni equivalenti benché il substrato da modificare sia diverso e si operi in un sistema microfluidico. Il potenziale all'elettrodo per fare avvenire la reazione può essere applicato in due modi diversi:

- eseguendo una voltammetria ciclica che comprenda il potenziale di riduzione dei sali di diazonio;
- attraverso una potenziostatica amperometrica al potenziale di riduzione delle molecole.

La chimica che sta alla base di questa tipologia di electrografting è riportata in figura 3.7.

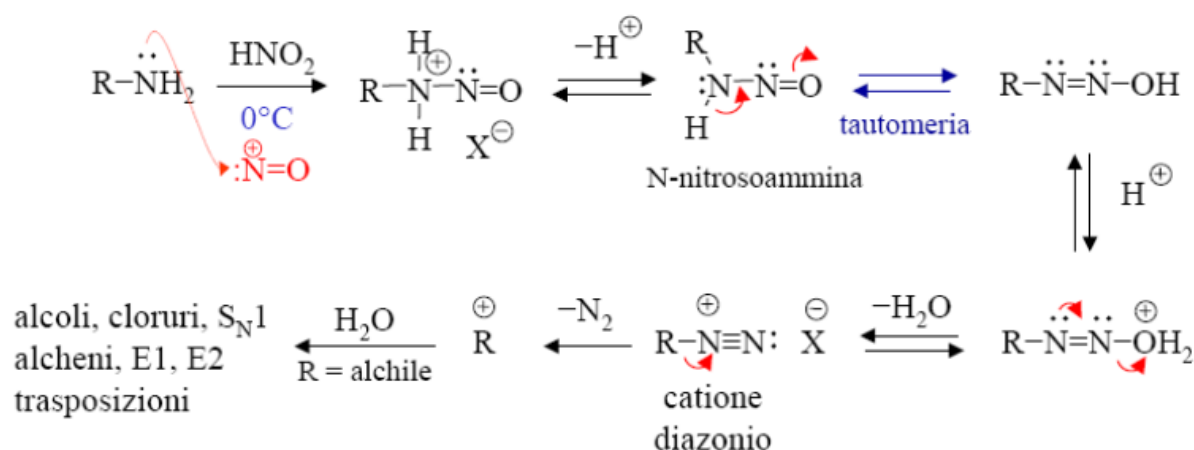


Figura 3.7 Electrografting: chimica dei Sali di diazonio.

Da questa immagine si ricava quando sia importante che la reazione avvenga in ambiente acido. Gli ioni H^+ infatti sposta l'equilibrio della reazione verso i prodotti.

L'utilizzo di soluzioni acquose a pH molto acidi risulta fondamentale per la buona riuscita della reazione di electrografting, anche se un non accurato controllo delle portate di lavaggio può causare la corrosione del semiconduttore ITO.

La deposizione elettrochimica è stata fatta avvenire all'interno della piattaforma microfluidica con le stesse modalità descritte in letteratura.

Per fare avvenire la reazione di electrografting sulla superficie di ITO si necessita di energia sotto forma di potenziale elettrico. Il potenziale necessario al processo può essere applicato all'elettrodo attraverso una voltammetria ciclica.

L'intervallo di potenziali applicato all'elettrodo e la velocità di scansione con cui lo si percorre ricalcano il protocollo riportato nell'articolo. La modifica superficiale che si vuole ottenere sull'elettrodo in questo processo è mostrata in figura 3.8.

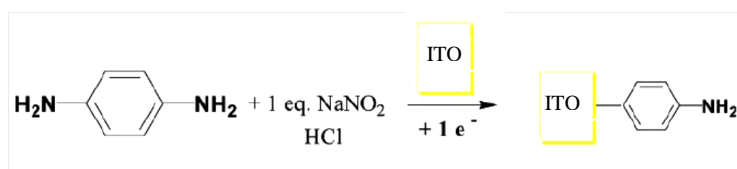


Figura 3.8 Reazione di deposizione di Sali di diazonio su ITO.

La risposta che l'elettrodo dà durante il processo di electrografting è riportata in figura 3.9.

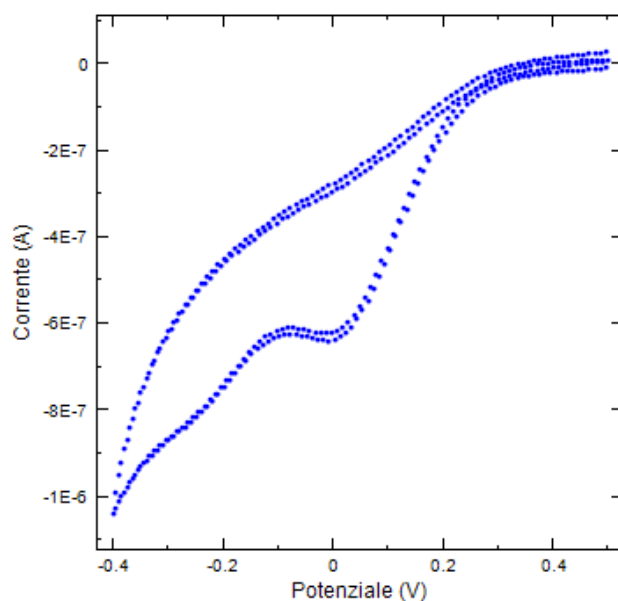


Figura 3.9 Voltammetria ciclica di ITO in una soluzione acquosa di *p*-fenilendiammina, nitrito di sodio e acido cloridrico. A 0 V si vede il picco di riduzione del sale di diazonio.

Questa variazione di corrente è riconducibile alla reazione di riduzione del sale sulla superficie di ITO.

L'effetto che questo processo ha sul substrato di ITO è stato caratterizzato con diverse tecniche: attraverso misure di voltammetria ciclica, misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica e analisi di caratterizzazione superficiale XPS.

Le analisi di tipo elettrochimico vengono effettuate servendosi del tracciante ferrocene. Con queste misure si riesce a valutare con quale inerzia elettrica l'elettrodo studiato risponde al variare del potenziale; in senso più lato si può dedurre una modifica superficiale dal diverso modo con cui il ferrocene diffonde dal bulk della soluzione alla superficie dell'elettrodo modificato.

La figura 3.10 riporta le CV per un campione prima e dopo il trattamento di grafting.

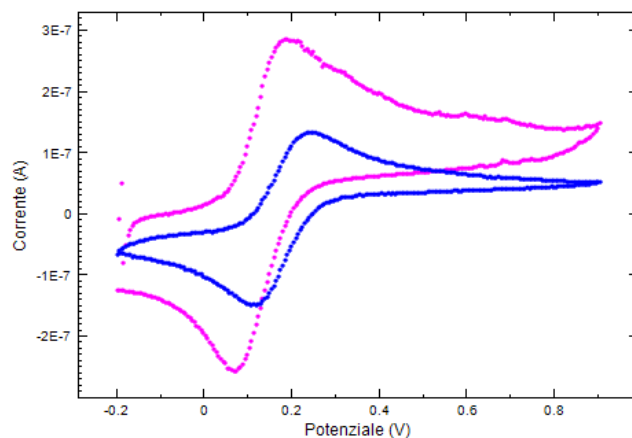


Figura 3.10 Confronto tra misure di voltammetrie cicliche effettuate prima e dopo la tecnica di electrografting: in blu è riportato il segnale prima della reazione, in rosa la risposta dopo la modifica superficiale.

Confrontando i voltammogrammi si vede la posizione dei picchi di ossidoriduzione del ferrocene non varia nei due casi mentre la corrente relativa ai picchi aumenta sensibilmente dopo il processo. Ad elevati potenziali inoltre si riconosce una spalla di corrente a 0.8 V attribuibile all'ossidazione irreversibile dell'ammina.

Per verificare che la spalla rilevata sia effettivamente dovuta alla presenza di ammine si confronta una voltammetria ciclica in soluzione di trizma effettuata prima e dopo il trattamento di electrografting.

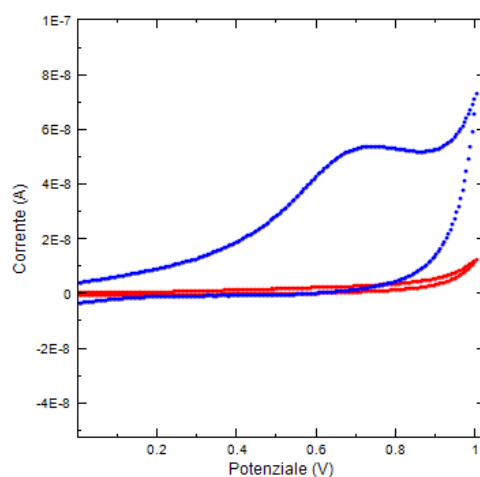


Figura 3.11 Particolare di un confronto tra voltammetrie cicliche effettuate prima (curva rossa) e dopo il grafting (curva blu).

Dall'analisi di figura 3.11 si conferma che la spalla ottenuta a 0.8 V dalla voltammetria ciclica effettuata in ferrocene è dovuta alla presenza di ammine sull'elettrodo.

Oltre alle CV vengono effettuate, alle stesse condizioni, delle spettroscopie di impedenza elettrochimica, dette EIS, per verificare l'eventuale variazione della resistenza globale dell'elettrodo, l'impedenza appunto, a seguito del processo di electrografting. In figura 3.12 sono riportati i due diagrammi di Nyquist ottenuti prima e dopo la modifica.

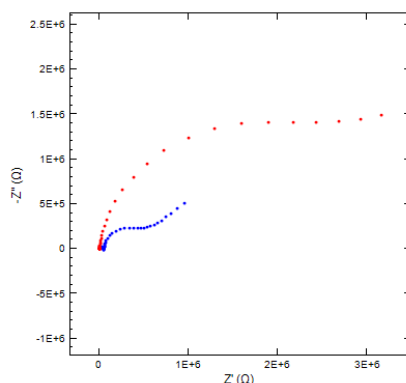


Figura 3.12 Analisi EIS sull'elettrodo prima del grafting (curva rossa) e dopo la modifica (curva blu).

Come si evince dal confronto tra i due spettri, il processo di electrografting comporta una forte diminuzione della resistenza al trasferimento di carica all'elettrodo di ITO.

Per confermare che la modifica variazione delle proprietà elettrochimiche sia dovuta all'attacco di ammine sulla superficie, si è ricorsi alla tecnica di caratterizzazione XPS.

Queste prove di caratterizzazione sono state condotte anche in condizioni drastiche al fine di verificare che l'amminofenile sia legato al substrato di ITO in modo stabile e covalente.

In figura 3.13 sono riportati i risultati ottenuti.

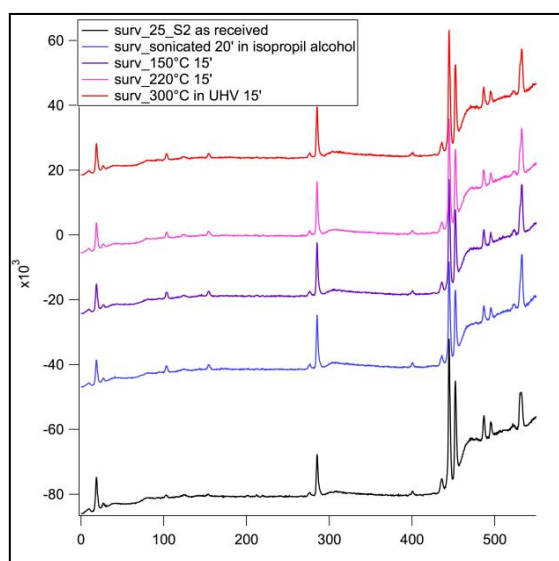


Figura 3.13 Risultati ottenuti dall'analisi XPS di un campione di ITO che ha subito grafting elettrochimico: nessun trattamento (curva nera), dopo trattamento di ultrasonicazione in alcol isopropilico per 20' (curva blu), dopo esser rimasto alla temperatura di 150°C per 15' (curva viola), dopo esser rimasto alla temperatura di 220°C per 15' (curva rosa), dopo esser rimasto alla temperatura di 300°C per 15' in ultra alto vuoto.

Le analisi XPS mostrano che l'azoto è presente sulla superficie. Il fatto che questo composto sia legato in modo covalente all'ITO è testimoniato dal fatto che qualsiasi altro tipo di interazione sarebbe venuta meno a seguito delle operazioni fatte sul campione. La permanenza del picco relativo all'azoto anche dopo il trattamento in alto vuoto a 300°C per 15' conferma che il legame tra azoto e substrato di ITO non può che essere di natura chimica. In seguito si analizza nel dettaglio il picco relativo all'assorbimento dell'azoto (figura 3.13). La deconvoluzione dei picchi (figura 3.14) mostra che sulla superficie sono presenti, tra le altre specie azotate, delle ammine e che il ricoprimento a loro dovuto corrisponde al 27% del totale. Sono presenti inoltre altre molecole sulla superficie: la linea "diazonio" corrisponde a legame tra N^{2+} e benzene, che rivela la presenza di diazonio bloccato sulla superficie che non si è ridotto ad ammina.

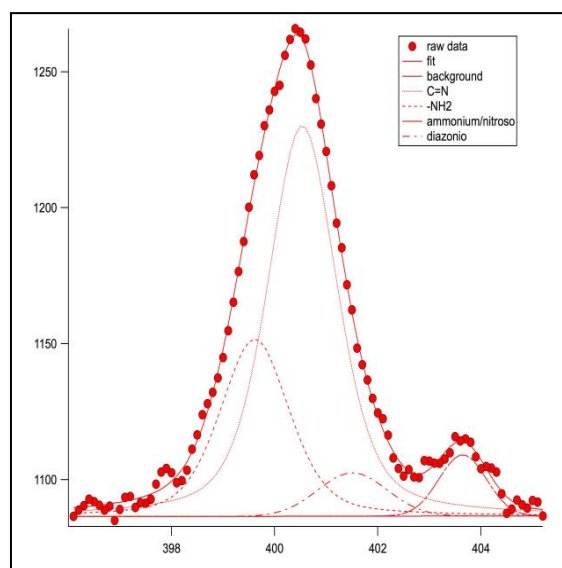


Figura 3.14 Dettaglio dell'analisi XPS dopo trattamento in alto vuoto a 300°C.

Quest'ultima analisi conferma che la reazione di modifica superficiale attuata mediante grafting elettrochimico a base di molecole di diazonio è irreversibile essendosi formato un legame di tipo covalente. Si stima che il ricoprimento di ammine sull'elettrodo abbia una densità di circa $1.2 \cdot 10^{-9}$ mol/cm²; questo valore è ricavato moltiplicando la percentuale di ammine presenti sulla superficie e la densità standard di ricoprimento di un self-assembled monolayer.

3.3.1.1 Ottimizzazione del grafting di diazonio

Dopo aver verificato che sull'elettrodo è presente uno strato di funzioni amminiche, si è proceduto ad effettuare uno studio volto a definire quale fosse la densità più adatta di ammine da realizzare sulla superficie per ottenere un alto rendimento per la successiva fase di attacco di biotine.

A questo scopo si è studiata la risposta elettrochimica dell'ITO modificato, al variare del grado di modifica superficiale. In Figura 3.15 si riportano le CV con le quali si sono realizzati i depositi consecutivi di electrografting. Si evidenzia come i picchi di corrente, riconducibili alla reazione di attacco dei sali di diazonio sulla superficie siano sempre meno evidenti e si spostino progressivamente verso alte energie. Inoltre la riduzione dell'O₂ è via via meno accentuata.

Da questi andamenti si può dedurre che la superficie disponibile all'attacco cala ad ogni ciclo.

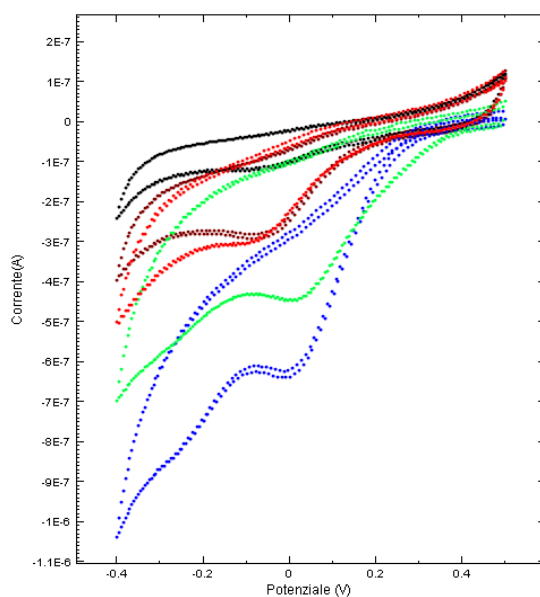


Figura 3.15 Diversi cicli di voltammetria ciclica di electrografting: 1 ciclo (blu); due cicli (verde); 4 cicli (rosso); 8 cicli (marrone); 12 cicli (nero).

L'effetto delle modifiche apportate all'elettrodo attraverso il trattamento di electrografting può essere evidenziato analizzando le CV effettuate dopo ogni ciclo di deposito, riportate in figura 3.16.

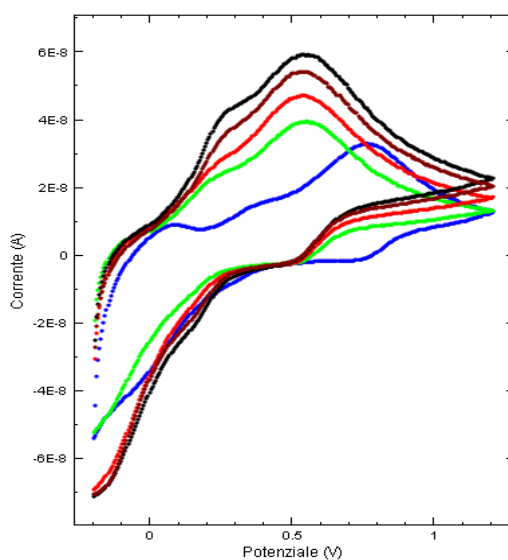


Figura 3.16 Voltammetrie cicliche effettuate dopo ogni ciclo di deposito di sali di diazonio, i colori delle curve rispecchiano quelli dei vari cicli riportati in Figura 3.15.

I risultati ottenuti evidenziano la necessità di definire il grado di funzionalizzazione della superficie che si vuole avere così da massimizzare il numero di specie biologiche da attaccare nei passaggi di modifica successivi (biotina, avidina). Un numero troppo elevato di ammine

sulla superficie comporterebbe con ogni probabilità una diminuzione della resa di coupling tra avidina e biotina che causerebbe inevitabilmente l'ancoraggio di pochi enzimi consentendo di realizzare un biosensore con scarsa sensibilità. Quindi si ritiene che la miglior scelta sia l'utilizzo di un solo ciclo di reazione di grafting per ottenere sull'elettrodo un ricoprimento sparso di ammine.

3.3.1.2 Studio della selettività della modifica

Si procede nello studio della tecnica di electrografting mediante sali di diazonio analizzandone la selettività. In particolare si intende valutare se il processo avvenga solo sull'elettrodo a cui viene applicato il potenziale di reazione. Per far questo si effettuano anche dei test per verificare se il semplice contatto tra soluzione reagente e la superficie comporti delle modifiche all'elettrodo di ITO.

Le prove effettuate per la verifica della selettività sono:

1. CV prima e dopo il passaggio della soluzione reagente per un tempo equivalente a quello necessario per il processo di deposizione;
2. CV prima e dopo il grafting sia sull'elettrodo a cui viene applicato il potenziale sia su un elettrodo a valle di questo;
3. Analisi XPS su un elettrodo che è stato solo immerso nella soluzione di grafting, su un altro che ha subito un ciclo di grafting e su un terzo, sul quale sono stati effettuati 10 cicli di grafting.

1. CV prima e dopo il passaggio della soluzione reagente per un tempo equivalente a quello necessario per il processo di deposizione.

Dapprima si analizza se il solo passaggio della soluzione reagente nel canale microfluidico comporti delle modifiche all'elettrodo.

Per fare ciò è stata fatta fluire la soluzione reagente all'interno del chip e si è atteso un tempo pari a circa 15 secondi, necessario per la reazione di grafting, prima di procedere al lavaggio.

La risposta che l'elettrodo dà in termini di CV ed EIS prima e dopo il passaggio dei reagenti è riportata in figura 3.17.

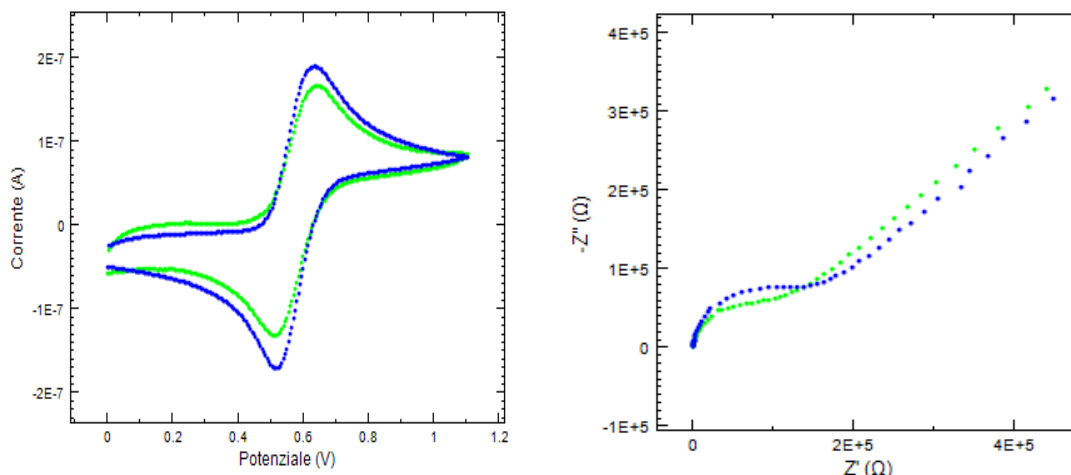


Figura 3.17 Voltammetrie cicliche e spettroscopie di impedenza elettrochimica a confronto: misura effettuata sull'elettrodo originale (curva verde), misura effettuata dopo l'immersione nella soluzione reagente di grafting per 15" (curva blu).

Dal grafico si vede che il semplice passaggio della soluzione reagente all'interno del canale non comporta modifiche sensibili all'elettrodo. Il leggero aumento dei picchi redox del tracciante e la corrispondente diminuzione del semicerchio nel diagramma di Nyquist indicano una minor resistenza al trasferimento di carica dell'elettrodo. Questo fenomeno è riconducibile all'acidità della soluzione reagente che corrode i primi strati atomici dell'elettrodo pulendolo da eventuali depositi organici.

2. CV prima e dopo il grafting sia sull'elettrodo a cui viene applicato il potenziale sia su un elettrodo a valle di questo.

Dopo aver attuato la tecnica di electrografting su un elettrodo, definito come elettrodo lavorante positivo, si pongono a confronto le voltammetrie cicliche effettuate prima e dopo il processo sia sull'elettrodo lavorante, che su un elettrodo posto a valle, definito elettrodo lavorante negativo.

I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 3.19.

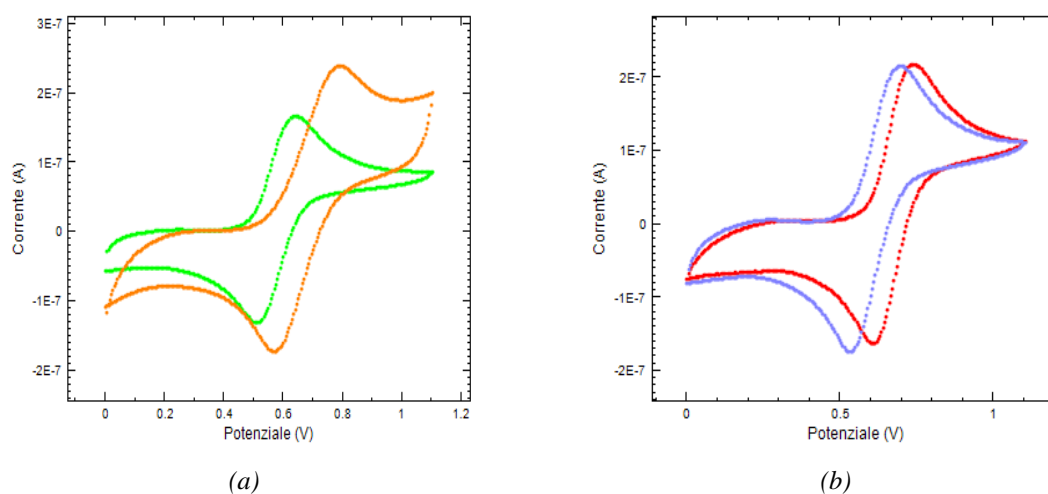


Figura 3.19 Voltammetrie cicliche a confronto: (a) relativo alla misura ottenuta prima (curva verde) e dopo (curva arancio) la reazione di grafting, (b) relativo alla misura realizzata su un elettrodo posto a valle di quello sul quale avviene la modifica superficiale.

Come si vede dai grafici la risposta dei due elettrodi è diversa: per l'elettrodo negativo la risposta non cambia apprezzabilmente nelle due condizioni considerate; l'elettrodo positivo invece, mostra picchi di riduzione e ossidazione del tracciante che si allontanano e con valori di corrente più elevati. Inoltre il segnale ottenuto dopo la modifica mostra il consueto contributo di corrente dato dalla presenza di ammine sulla superficie, a potenziali positivi.

3. *Analisi XPS su un elettrodo che è stato solo immerso nella soluzione di grafting, su un altro che ha subito un ciclo di grafting e su un terzo, sul quale sono stati effettuati 10 cicli di grafting*

Infine, lo studio sulla selettività della modifica di sali di diazonio si conclude con i risultati ottenuti dalla caratterizzazione XPS.

Nei grafici sottostanti sono riportati e messi a confronto i dati sperimentali relativi a tre campioni che hanno subito trattamenti di modifica differenti:

- semplice immersione nella soluzione reagente (curva di colore nero);
- 1 ciclo di grafting con sali di diazonio (curva di colore blu);
- 10 cicli di grafting con sali di diazonio (curva di colore rosso).

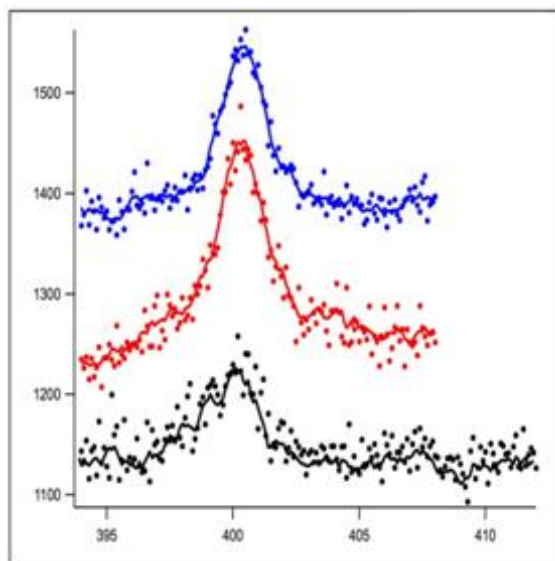


Figura 3.20 Analisi XPS dei diversi campioni: elettrodo immerso nella soluzione reagente (curva nera), trattato con un ciclo di grafting (curva rossa), trattato con dieci cicli di grafting (curva blu).

I risultati dell'analisi XPS mostrano che la quantità di azoto presente sui campioni varia a seconda dei trattamenti che i diversi elettrodi hanno subito.

In particolare, sul campione su cui non è stato effettuato il grafting, il contenuto di azoto risulta essere molto basso. Gli altri due campioni invece mostrano un picco relativo all'emissione dell'azoto molto più marcato.

3.3.2 Modifica superficiale mediante cisteammina

Per effettuare la modifica superficiale dell'ITO si applica la tecnica electrografting utilizzando anche la cisteammina.

Questa molecola, la cui formula chimica è $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{SH}$, è un'ammina di tipo lineare che presenta un gruppo tiolico $-\text{SH}$.



Figura 3.21 Struttura chimica della cisteammina.

Il processo di electrografting avviene mediante una soluzione di cisteammina disciolta in acetonitrile. L'impiego di questo solvente aprotico risulta necessario per evitare che la presenza di protoni liberi nell'ambiente di reazione possa rendere inefficace l'attacco di cisteammina.

La reazione di electrografting infatti avviene mediante una deprotonazione del gruppo tiolico conseguente all'applicazione di potenziale all'elettrodo. Lo ione negativo di cisteamina $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{S}^-$ così formato va quindi a legarsi covalentemente alla superficie di ITO.

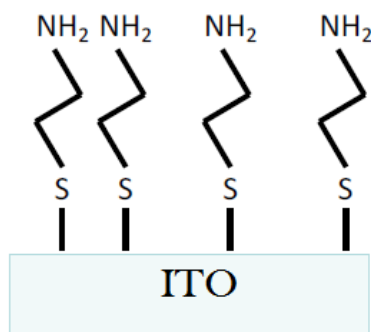


Figura 3.22 Struttura di uno strato cisteaminico sulla superficie di ITO.

mediante reazione di ossidoriduzione. Per ottenere questa condizione si elimina l'ossigeno dalla soluzione e dall'ambiente di reazione mediante insufflazione di azoto.

Dal punto di vista energetico la reazione avviene quando all'elettrodo viene fornito il potenziale necessario mediante una voltammetria ciclica.

La risposta che l'elettrodo restituisce durante il trattamento è riportata in figura 3.23.

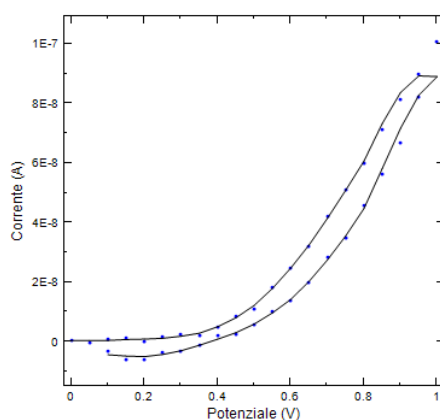


Figura 3.23 Electrografting di cisteamina su ITO mediante voltammetria ciclica.

Come nel caso precedente le modifiche superficiali dell'elettrodo ottenute mediante il grafting di cisteamina sono caratterizzate attraverso misure di CV e EIS.

Come si vede da figura 3.24, il grafting di cisteamina comporta un abbassamento e un allontanamento dei picchi di ossidazione e riduzione del tracciante; il ricoprimento di cisteamina quindi causa un aumento della resistenza al trasferimento di carica tra la soluzione e l'elettrodo.

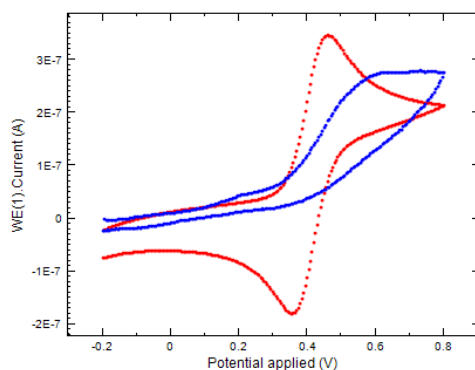


Figura 3.24 Voltammeteria ciclica effettuata su un elettrodo che ha subito il trattamento di grafting in cisteammina: in rosso è riportato il segnale ottenuto prima della modifica, in blu quello conseguente al grafting.

Lo stesso fenomeno è confermato anche dai risultati di spettroscopia di impedenza elettrochimica riportati in figura 3.25: dopo il trattamento si osserva un allargamento del semicerchio nel diagramma di Nyquist che testimonia un' aumentata resistenza dell' elettrodo.

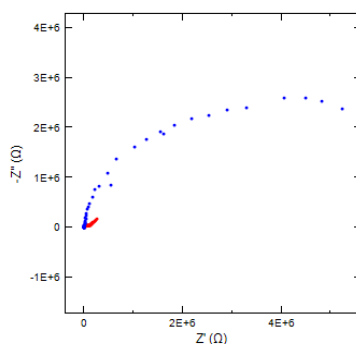


Figura 3.25 Diagramma di Nyquist per la spettroscopia di impedenza elettrochimica: si confrontano le due misure ottenute prima della modifica (curva rossa) e dopo il grafting di cisteammina (curva blu).

Questo risultato è giustificabile se si considera che il layer di cisteammina prodotto non è conduttivo, a differenza di quello a base di aniline realizzato in precedenza partendo dai sali di diazonio.

3.3.2.1 Ottimizzazione del grafting di cisteammina

Anche per il processo di electrografting a base di molecole di cisteammina si effettua uno studio volto a capire quale effetto abbiano sull' elettrodo cicli ripetuti di deposizione elettrochimica.

In figura 3.26 si mostra il comportamento dell'elettrodo in soluzione di ferrocene dopo aver subito un diverso numero di cicli di grafting: sono state effettuate misurazioni dopo 2, 4, 6, 8 e 10 cicli.

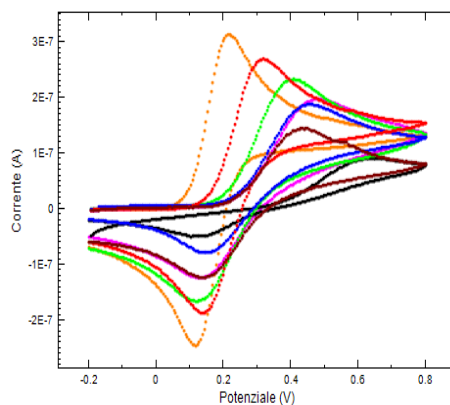


Figura 3.26 Voltammetrie cicliche effettuate in soluzione di ferrocene dopo diversi cicli di grafting: elettrodo pulito (curva arancio), dopo 1 ciclo di grafting di cisteamina (curva rossa), dopo 2 cicli (curva verde), dopo 4 cicli (curva rosa), dopo 6 cicli (curva blu), dopo 8 cicli (curva marrone), dopo 10 cicli (curva nera).

Come si vede dalla figura, all'aumentare dei cicli di deposito i picchi relativi alla riduzione e ossidazione del ferrocene progressivamente si abbassano e si allontanano.

Ciò si spiega con un crescente isolamento che la cisteamina provoca all'aumentare del numero di depositi. Da questo si deduce che una ripetizione di cicli di grafting non può che alterare la conducibilità dell'elettrodo.

3.3.2.2 Studio della selettività della modifica

Dopo aver verificato la presenza della cisteamina sulla superficie si procede analizzando il comportamento e gli effetti del trattamento in termini di selettività. Si considera, cioè, se il deposito avviene solamente sull'elettrodo al quale si applica il potenziale di deposizione.

Per studiare questo aspetto si confrontano le misure di voltammetria ciclica effettuate prima e dopo il grafting di cisteamina sia sull'elettrodo a cui viene applicato il potenziale, sia su un elettrodo posto a valle. I risultati delle analisi sono riportati in figura 3.27.

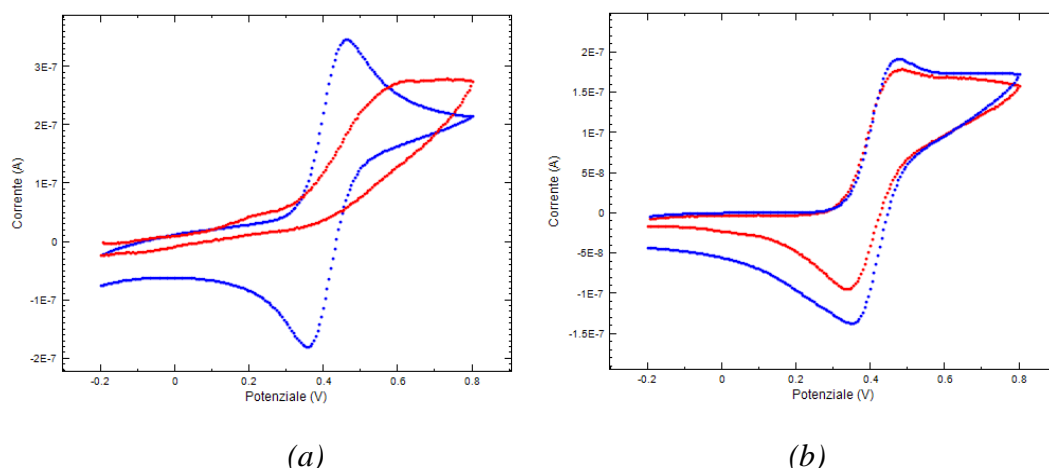


Figura 3.27 Voltammetrie cicliche effettuate in soluzione di ferrocene. La figura (a) mostra due CV effettuate prima (curva blu) e dopo la modifica di grafting (curva rossa); la figura (b) mostra due CV effettuate sull'elettrodo di controllo prima e dopo l'applicazione sull'altro elettrodo del potenziale di reazione: in curva blu si ha il segnale iniziale, in curva rossa si mostra la risposta dopo il passaggio della soluzione reagente.

I risultati ottenuti evidenziano che la risposta elettrica restituita dai due elettrodi nei due casi è differente. L'elettrodo a cui viene applicato il potenziale mostra uno spostamento ed una riduzione del picco di ossidoriduzione del ferrocene. L'elettrodo negativo invece mostra un leggero abbassamento dei picchi, ma non una loro traslazione. I dati quindi confermano che il deposito di grafting con cisteamina è selettivo.

3.3.3 Confronto e scelta tra le due tipologie di grafting

Dopo aver confrontato gli effetti della tecnica di electrografting ottenuta utilizzando due specie chimiche differenti risulta determinante scegliere quale delle due specie chimiche impiegare per la modifica superficiale dell'ITO e con che metodologia attuare la tecnica.

Per quanto riguarda la tecnica di electrografting a base di molecole di diazonio i risultati ottenuti permettono di dire che:

- non necessita di particolari condizioni operative;
- il ricoprimento che si forma comporta un aumento della conducibilità dell'elettrodo;
- un non accurato controllo dei tempi e dei lavaggi può comportare un danneggiamento irreversibile del semiconduttore dovuto alla presenza di soluzioni acide.

Il grafting di cisteamina invece:

- si ottiene in condizioni operative stringenti, quali l'anossia dell'ambiente e della soluzione;

- l'impiego dell'acetonitrile è fonte di degrado per il PDMS della piattaforma microfluidica;
- il deposito di cisteamina sulla superficie determina un isolamento elettrochimico della superficie di ITO;
- la reazione di grafting non prevede reazioni intermedie dato che è la stessa cisteamina presente in soluzione a legare covalentemente il semiconduttore.

A fronte di queste considerazioni, la scelta ricade sull'utilizzo dei sali di diazonio poiché questi vanno ad aumentare la conduttività dell'elettrodo e per le meno stringenti condizioni di reazione richieste.

3.4 Sviluppo del biosensore

Una volta scelto il materiale e il metodo con cui rendere chimicamente attiva la superficie di ITO e avere verificato stabilità e selettività della modifica superficiale, si procede andando a esaminare se le ammine presenti sulla superficie siano in grado di legare la biotina. Per testare questo legame si ricorre a tecniche ottiche oltre che elettrochimiche.

3.4.1 Studio dell' attacco di biotina

Dopo aver assicurato la presenza sulla superficie conduttiva fossero di ammine legate in modo covalente, si è analizzato quale potesse essere il metodo migliore per legare su di esse le molecole di biotina, che costituiscono il primo step biologico per la costruzione del biosensore. Innanzitutto, si sceglie di impiegare la vitamina biotina per questa

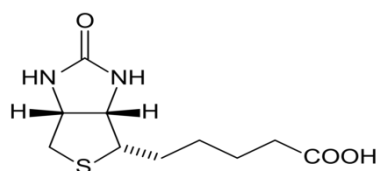


Figura 3.28 Struttura della biotina.

fase poiché presenta una catena alifatica con un gruppo carbossilico, capace di legarsi alle ammine presenti sulla superficie formando un legame ammidico. Oltre a ciò si vuole sfruttare il legame forte non covalente che ogni biotina forma con quattro avidine.

Innanzitutto si intende determinare i parametri cinetici che regolano la reazione di attacco di ogni molecola di biotina con un'ammina disponibile sulla superficie. A tal fine, per prima cosa si analizza la natura del solvente in cui è disciolta la proteina.

Per quanto riguarda la scelta di una corretta concentrazione di biotina risulta determinante il calcolo di densità di ammine che ricoprono l'elettrodo. Da questa informazione infatti si ricava quale sia il valore di concentrazione da avere per saturare i siti attivi, cioè quante molecole di biotina siano necessarie alla reazione se il legame tra biotine e ammine avvenisse con rendimento unitario. Ipotizzando che le molecole presenti in soluzione nel canale microfluidico al di sopra dell'area dell'elettrodo partecipino in modo totale alla reazione, si ricava quale sia il valore di concentrazione minima da imporre alla soluzione di biotina.

Sulla base di quanto esposto in §3.3.1, si ottiene la densità superficiale di ammine presenti sulla superficie dell'elettrodo. Esso corrisponde a un valore di $1.2 \cdot 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$, quindi, essendo la superficie dell'elettrodo pari a 1 mm^2 , si ricava che la quantità minima di molecole da avere in soluzione al di sopra dell'elettrodo è $1.2 \cdot 10^{-11}$ moli. Sapendo che il volume al di sopra dell'elettrodo è pari a 0.1 mm^3 si ha che la concentrazione minima da avere in soluzione deve essere pari a $1.2 \cdot 10^{-10} \text{ mol/mm}^3$, corrispondenti a un valore di molarità pari a $120 \text{ }\mu\text{M}$. Poiché le ipotesi poste per questo calcolo risultano essere molto stringenti, di conseguenza, si ritiene opportuno lavorare con una concentrazione di biotina abbondantemente in eccesso rispetto alle ammine presenti sulla superficie. Poiché la biotina succinimide ha un costo elevato, al posto di utilizzare una soluzione con concentrazione maggiore a $120 \mu\text{M}$, si preferisce utilizzare una soluzione di biotina $20 \mu\text{M}$ e rinnovare il liquido all'interno del canale microfluidico più volte in modo da garantire comunque la quantità di molecole necessarie alla saturazione dei siti attivi di ammina presenti sull'elettrodo. Il numero minimo di volumi da rinnovare sopra la superficie dell'elettrodo è pari a 6. Per assicurare un apporto di biotina in eccesso rispetto alle condizioni minime sopra determinate, si sceglie di rinnovare il liquido a contatto l'elettrodo per 12 volte.

Delineata questa condizione, si procede con la valutazione del tempo necessario alla reazione per raggiungere una buona resa. Si lavora a questo aspetto partendo dall'ipotesi che la velocità di reazione è elevata; si assume quindi che sia il trasporto di materia il fenomeno controllante per il sistema. Considerando che il trasporto avviene solo per diffusione si valuta preliminarmente il tempo di diffusione necessario al reagente per diffondere dal centro del volume del canale microfluidico alla superficie reattiva.

Conoscendo le dimensioni del canale, ed avvenendo la reazione in un volume stagnante, si ricava facilmente, utilizzando (3.1), il tempo di diffusione necessario ad una molecola per attraversare verticalmente il volume del canale al di sopra della superficie dove avviene la reazione.

$$t = \frac{L^2}{D} \quad (3.1)$$

Da letteratura è noto che il coefficiente di diffusione della biotina D è pari a $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$; per quanto riguarda l'altezza del canale microfluidico invece, questa corrisponde a 10^{-2} cm . Dalla formula (3.1) ricaviamo che il tempo necessario alla biotina per diffondere nel canale è pari a 20 s.

Dovendo però effettuare 12 ricambi di volume al di sopra dell'elettrodo per garantire che la quantità dei reagenti sia in eccesso rispetto allo stechiometrico, si deduce che il tempo minimo per effettuare i 12 cicli di deposito equivale a 4 minuti. Anche in questo caso si preferisce lavorare con un tempo superiore rispetto a quello considerato: si sceglie quindi un tempo di attesa di 5 minuti per ogni deposito. Il tempo complessivo necessario all'attacco di biotina risulta quindi essere di 30'.

Dopo aver atteso il tempo necessario per il deposito, si opera un lavaggio di 3 minuti con una portata di $25 \mu\text{L}/\text{min}$ con il solvente DMSO in modo da asportare le molecole che non hanno reagito.

Immettendo nel canale la soluzione con il tracciante ferrocene si può stimare quale sia stato l'effetto del deposito di biotina sulla risposta elettrochimica dell'elettrodo.

In figura 3.29 sono riportate due misure di voltammetria ciclica effettuate prima e dopo il deposito di biotina.

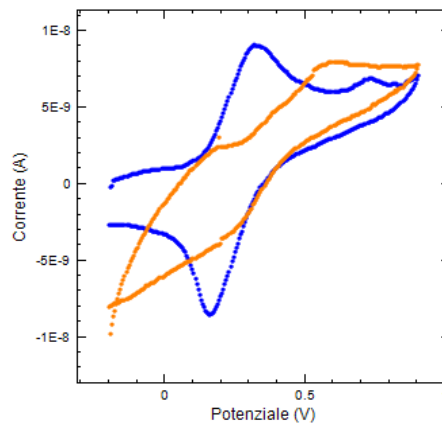


Figura 3.29 Voltammetrie cicliche a confronto: prima del deposito di biotina (curva blu), dopo il deposito di biotina (curva arancio).

Come si vede dall'immagine, l'elettrodo mostra un'aumentata inerzia elettrica poiché i picchi di ossidoriduzione del tracciante risultano diminuiti e allontanati. Questo risultato può essere associato ad un maggior sporco della superficie, attribuibile al deposito di biotina.

3.4.1.1 Test di immunofluorescenza per la rilevazione di biotine superficiali

Le analisi di tipo elettrochimico hanno permesso di rilevare che il deposito di biotina in soluzione determina uno sporco della superficie conduttiva.

Passo successivo è la verifica che il deposito rilevato sulla superficie dell'elettrodo sia effettivamente costituito da biotine disponibili per reazioni successive.

Per realizzare questa verifica si ricorre alla tecnica di analisi di immunofluorescenza.

Per capire se la specie biotina è presente all'interno del chip e se questa è legata in modo covalente alla superficie dell'elettrodo su cui è avvenuta l'attivazione chimica, si attua sul canale microfluidico il protocollo per effettuare l'analisi di immunofluorescenza. Le specifiche dei composti e la metodologia utilizzata sono riportati in §2.7.

Il segnale che i fluorofori generano dopo aver attuato ripetuti lavaggi è riportato in figura 3.30.

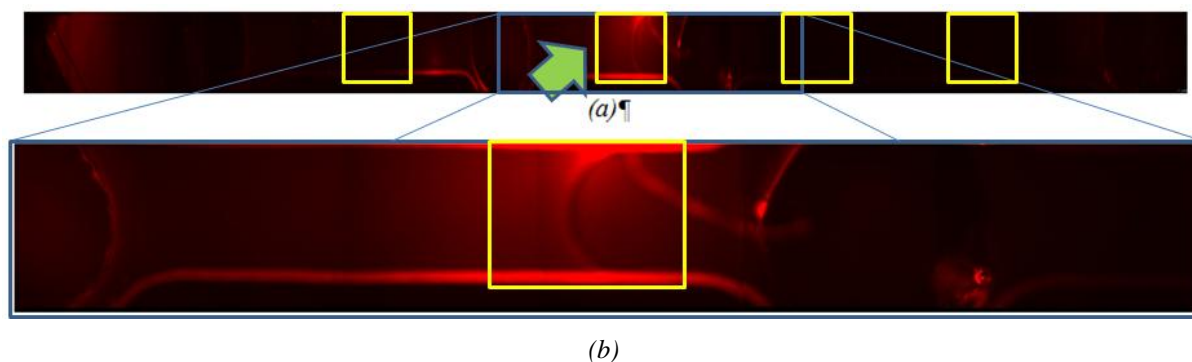


Figura 3.30 Immagine in immunofluorescenza al microscopio ottico del canale microfluidico dopo immunofluorescenza: (a) immagine relativa a tutto il canale microfluidico, (b) ingrandimento della zona centrale del canale nel quale è presente l'elettrodo che ha subito il grafting. Nei quadrati gialli sono indicate le aree dove sono presenti gli elettrodi in ITO, quello indicato con la freccia verde corrisponde all'elettrodo sul quale è stato realizzato il processo di electrografting con molecole di sali di diazonio.

L'immagine mostra che nella zona dove è presente l'elettrodo che ha subito il processo di electrografting, l'intensità di fluorescenza è significativamente maggiore che nelle altre zone del canale microfluidico.

Questo risultato è molto importante poiché conferma la presenza della specie sulla superficie dell'elettrodo e assieme alle misure chimiche (XPS) ed elettrochimiche (CV ed EIS) precedenti permette di riconoscere selettività, specificità e funzionalizzabilità ai depositi amminici in superficie.

3.4.2 Studio dell'attacco di avidina

Dopo le indagini relative alla biotina, segue lo step che prevede la realizzazione del legame tra biotina e avidina. A tal fine si fa ricorso ai principi della *click chemistry*, una strategia innovativa che permette l'unione stereospecifica tra due molecole mediante un legame forte.

Quello tra biotina e avidina è uno dei legami non covalenti più forti presenti in natura ($K_d = 10^{-15}$ M): ogni molecola di avidina può legare fino a 4 molecole di biotina contemporaneamente poiché l'avidina è una proteina tetramericata costituita da 4 subunità, ciascuna in grado di unirsi con una molecola di biotina.

Per lo studio dei parametri cinetici relativi al deposito di avidina si impongono le stesse ipotesi sia per quanto riguarda i fenomeni controllanti del processo che la geometria del sistema, fatte nell'analisi della fase di deposito della biotina.

Per fare avvenire l'attacco si utilizza una soluzione di avidina disciolta in trizma a pH 7.4, a concentrazione $10 \mu\text{g/mL}$.

Il valore del coefficiente di diffusione \mathcal{D} dell'avidina assume il valore di $5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Utilizzando quindi l'equazione (3.1), il tempo caratteristico di diffusione dell'avidina necessario per attraversare verticalmente il canale è di 3 minuti. Allo stesso modo dello step precedente, il tempo di deposito imposto per l'attacco dell'avidina viene scelto lavorando in eccesso rispetto a questo calcolo: in tal modo si fissa un tempo di deposito di 30'. La concentrazione minima di avidina da imporre alla soluzione sarebbe quella necessaria a legare ogni molecola di biotina disponibile all'attacco presente sull'elettrodo, ipotizzando poi che ogni molecola di diazonio abbia legata una biotina, e che quest'ultima a sua volta realizzi un'interazione efficiente, si ottiene che le molecole che devono trovarsi al di sopra dell'elettrodo sono $1.2 \cdot 10^{-11}$. Essendo quindi il volume al di sopra del canale 0.1 mm^2 , si ottiene una densità minima di avidina nella soluzione pari a 1.7 ng/mol , essendo il peso molecolare dell'avidina di 68 Kg/mol .

Diversamente dal metodo di deposito attuato per la biotina, si ritiene che in questo caso sia meglio realizzare il deposito mediante un solo ciclo con soluzione concentrata poiché l'avidina, quale molecola proteica, tende ad adsorbirsi nel sistema. Il deposito avviene quindi utilizzando una soluzione $10 \mu\text{g/mL}$ di avidina.

Dopo aver effettuato il deposito si caratterizza la superficie mediante la tecnica di voltammetria ciclica in soluzione di ferrocene. I risultati sono riportati in figura 3.31.

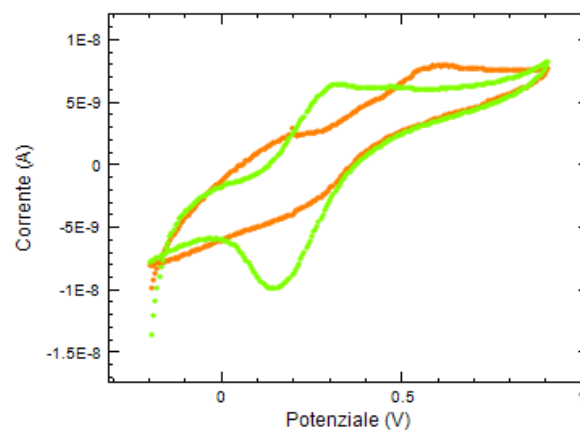


Figura 3.31 Voltammetrie cicliche effettuate in soluzione di ferrocene dopo il deposito di biotina (curva arancio) e dopo il deposito di avidina (curva verde).

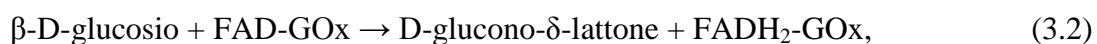
La risposta data dall'elettrodo prima e dopo il deposito di avidina è diversa. La curva arancio, relativa all'elettrodo dopo il deposito di biotina, presenta dei picchi di ossidoriduzione del ferrocene più vicini rispetto a quelli rilevati dopo il deposito di biotina. Per quanto riguarda la loro ampiezza, questa risulta aumentata.

3.4.3 Studio dell'attacco di GOx

Ultimo step previsto per la costruzione del biosensore è quello di collegare all'elettrodo ricevitore un elemento che sia in grado di generare un segnale elettrico, in seguito alla sua interazione con glucosio presente in soluzione. L'enzima glucosio ossidasi soddisfa queste richieste.

L'enzima GOx è responsabile dell'ossidazione del glucosio a glucono-lattone. La relativa reazione di riduzione coinvolge il coenzima flavina-adenina-dinucleotide, chiamato FAD. La forma ridotta del FAD può in seguito ritornare alla forma ossidata mediante la reazione con l'ossigeno molecolare disciolto in soluzione, liberando acqua ossigenata.

Le reazioni coinvolte nella rilevazione del glucosio sono quindi due reazioni redox a catena:



L'acqua ossigenata, presente in quantità stechiometrica rispetto al glucosio, può essere rilevata sfruttando la propria reazione di riduzione (3.4) che avviene ponendosi a potenziali positivi.



Quest'ultima reazione genera un flusso di elettroni proporzionale alla presenza di acqua ossigenata in soluzione, che a sua volta è proporzionale alla presenza di glucosio nel sistema secondo il modello cinetico di Michaelis-Menten.

La presenza di glucosio è indagabile sia per via diretta, andando a stimare le variazioni di corrente generate dalla reazione di riduzione del FAD (3.2), sia per via indiretta, valutando il flusso di elettroni che la presenza di acqua ossigenata genera a potenziali positivi.

Per quanto riguarda la rilevazione per via indiretta, studi precedenti hanno dimostrato che il semiconduttore ITO risulta avere una conducibilità tale da essere sensibile alla scarica di elettroni causata dall'acqua ossigenata e che il segnale prodotto dalla reazione è proporzionale alla sua concentrazione in soluzione. Dato che si utilizza un riferimento in Ag, il potenziale al quale si rileva la scarica di H₂O₂ è pari a +0.7V.

Per quanto riguarda il metodo di rilevazione della concentrazione di glucosio in soluzione sulla base della produzione di elettroni causata dalla reazione di riduzione del coenzima FAD, la letteratura suggerisce che il potenziale standard per questa reazione si trova nell'intorno -0.3V.

Prima di ciò però è meglio chiarire in che modo l'enzima GOx funzioni.

Come ogni enzima la sua cinetica di reazione segue il modello di Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (3.5)$$

dove v è la velocità di reazione enzimatica, $[S]$ la concentrazione di substrato, nel nostro caso il glucosio, e K_M il valore della costante di Michaelis-Menten. Il modello cinetico spiega come per bassi valori di concentrazione di glucosio, la velocità della reazione aumenti rapidamente; mentre per valori maggiori questa mostra un massimo, detto v_{max} . Oltre questo punto la cinetica risulta indipendente dalla concentrazione poiché i siti attivi disponibili alla reazione risultano saturati.

3.4.3.1 Ingegnerizzazione dell'enzima GOx

L'attacco e l'attività dell'enzima GOx risultano essere aspetti fondamentali per la buona riuscita del biosensore.

Al fine di migliorare l'attività dell'enzima, è stato condotto uno studio specifico in collaborazione con il Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Padova. In particolare è stata progettata e realizzata una modifica dell'enzima GOx che prevede di legare ad esso, in modo covalente, delle biotine. L'efficacia dell'intervento è stata valutata stimando la variazione dell'attività enzimatica di GOx a seguito della modifica.

La biotinilazione della GOx ha lo scopo di rendere possibile l'attacco tra la GOx e l'avidina. Come già affermato, il legame tra avidina e biotina è l'interazione molecolare più simile ad un legame covalente presente in natura. Si vuole quindi sfruttare questa proprietà per utilizzare la biotina come sistema di ancoraggio per fissare la GOx sull'avidina presente sulla superficie elettrodica.

A questo scopo si riportano i risultati ottenuti dalla ricerca svolta.

Modifica dell'enzima GOx mediante biotina-NHS

Obiettivo principale di questo studio è la funzionalizzazione dell'enzima glucosio ossidasi per permetterne l'attacco all'avidina legata all'elettrodo di ITO mediante biotina e quindi sali di diazonio.

La modifica è stata effettuata due volte con rapporti molari differenti per cercare di legare un numero di biotine crescente.

Come procedura preliminare si effettua l'analisi di massa dell'enzima nativo. Questo studio ha evidenziato che l'enzima si trova in forma monomerica, al contrario di quanto indicato dal produttore.

Per questo motivo tutti i calcoli su quantità molari, rapporti di reazione e caratterizzazioni sono riferiti alla massa molecolare del monomero dell'enzima, che secondo lo spettrometro di massa è di 71381 g/mol.

La prima modifica è stata condotta con un rapporto molare di biotina 15:1 rispetto all'enzima ed il prodotto, ottenuto con una resa molare del 67.7%, è stato caratterizzato con varie metodiche.

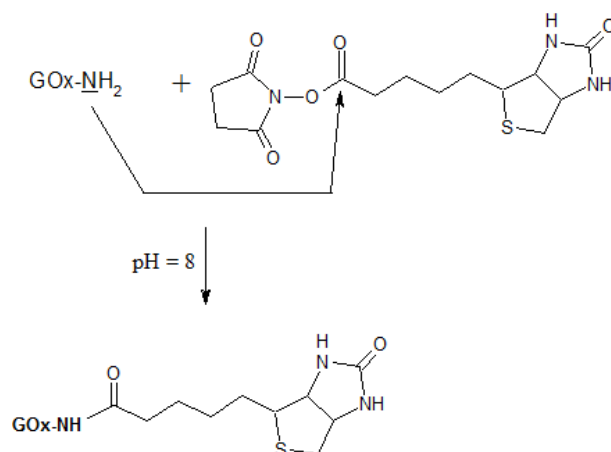


Figura 3.32 Descrizione della modifica effettuata sull'enzima GOx tramite la proteina biotina succinimide.

E' stato eseguito il test con HABA/avidina per valutare il numero di biotine legate mediante l'utilizzo della spettrofotometria UV-VIS. I dati ottenuti indicano la presenza di un'unica biotina legata. Questo dato si riferisce ad una media complessiva fatta sul totale delle molecole di enzima ed è comunque piuttosto approssimativo perché questo tipo di test permette di rilevare solo le biotine accessibili all'avidina e quindi quelle non oscurate dalla circostante struttura proteica della glucosio ossidasi a causa del suo ingombro sterico.

I risultati di questa determinazione sono comunque significativi dello per lo studio in questione, poiché permettono di determinare il numero effettivo di biotine sfruttabili per la costruzione della struttura chimica del sensore, quelle cioè disponibili all'ancoraggio con l'avidina.

Tabella 3.1 Risultati del test HABA effettuato sull'enzima GOx modificato con biotina con rapporto molare 15:1.

Prova 1		Prova 2	
$A_{H/A}$	11.096	$A_{H/A}$	11.125
$A_{H/A/B}$	0.9921	$A_{H/A/B}$	0.9864
$A_{H/A/B}$	0.9915	$A_{H/A/B}$	0.9874
$A_{H/A/B}$	0.9923	$A_{H/A/B}$	0.9883
$A_{H/A/B}$	0.9929	$A_{H/A/B}$	0,9889
$A_{H/A/B}$	0.9931		-
Media	0.9924	Media	0.9878
Rapporto biotine/enzima	0.38	Rapporto biotine/enzima	0.83

In tabella 3.1 sono riportati i valori risultanti dal test HABA: con $A_{H/A}$ si indicano i valori di assorbanza relativi al solo colorante, con $A_{H/A/B}$ i valori di assorbanza ottenuti dopo aver miscelato al colorante il campione da misurare. Dalla differenza di assorbanza misurata e utilizzando l'equazione di Lambert-Beer si riesce a ricavare la concentrazione di biotine libere presenti in soluzione, e quindi di quelle legate alla proteina.

Una stima più accurata del numero di biotine legate è stata ottenuta con la spettrometria di massa in tecnica MALDI/TOF.

Confrontando le masse molecolari dell'enzima nativo e di quello modificato è stato ottenuto un valore medio di circa 4 biotine per molecola, dato maggiormente attendibile.

Il grado di modifica complessivo ottenuto è quindi del 26.7%.

In figura 3.33 viene riportata la spettro di massa risultante dall'indagine.

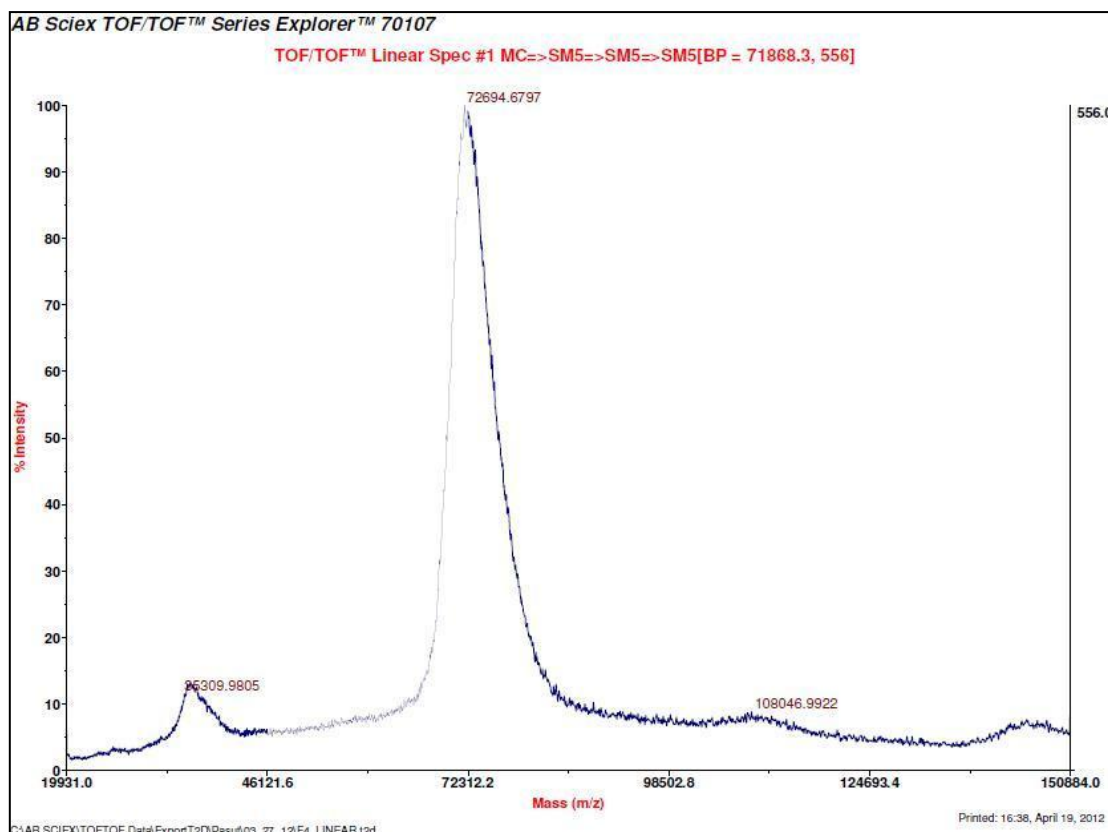


Figura 3.33 Grafico risultante dalla spettrometria di massa con tecnica MALDI su campioni di GOx modificata con biotina con rapporto molare 15:1 rispetto l'enzima.

La differenza tra le due analisi è dovuta probabilmente al fatto che le biotine legate all'enzima non sono tutte disponibili per l'interazione con l'avidina per motivi di ingombro sterico dovuti alla struttura terziaria dell'enzima stesso. Infatti, se una biotina va a legarsi ad una lisina posizionata all'interno di una tasca essa può trovarvi spazio sufficiente per alloggiarvi, ma non per rendere possibile l'interazione con l'avidina per il test con HABA.

La seconda modifica dell'enzima è stata condotta con un rapporto molare di 19:1, leggermente più alto rispetto al precedente, per cercare di ottenere un maggior numero di siti funzionalizzati.

E' stato ottenuto un prodotto con resa del 22.7%. Tale valore, piuttosto basso se confrontato con la sintesi precedente, è dovuto a perdite durante le operazioni di purificazione, dato che durante la dialisi la biotina in eccesso precipitava e con la successiva filtrazione portava a perdite di prodotto per fenomeni di adsorbimento e di occlusione.

Al test con HABA/avidina il risultato indica un numero di biotine legate maggiore rispetto al prodotto della prima sintesi, come ci si aspettava. In questo caso ne risultano legate 2.

Tabella 3.2 Risultati del test HABA effettuato sull'enzima GOx modificato con biotina con rapporto molare 19:1.

Prova 1		Prova 2		Prova 3	
$A_{H/A}$	0.9902	$A_{H/A}$	10.117	$A_{H/A}$	0.9946
$A_{H/A/B}$	0.8506	$A_{H/A/B}$	0.8157	$A_{H/A/B}$	0.8236
$A_{H/A/B}$	0.8382	$A_{H/A/B}$	0.8112	$A_{H/A/B}$	0.8247
$A_{H/A/B}$	0.8421	$A_{H/A/B}$	0.8126	$A_{H/A/B}$	0,8281
$A_{H/A/B}$	0.8457	$A_{H/A/B}$	0.8113		-
Media	0.8442	Media	0.8127	Media	0.8255
Rapporto biotine/enzima	1.01	Rapporto biotine/enzima	2.11	Rapporto biotine/enzima	1.50

Dall'analisi dello spettro di massa al MALDI/TOF invece, sono state evidenziate un numero di biotine legate all'enzima pari a 6, ottenendo quindi da questa reazione un grado di modifica di 40% dei siti disponibili.

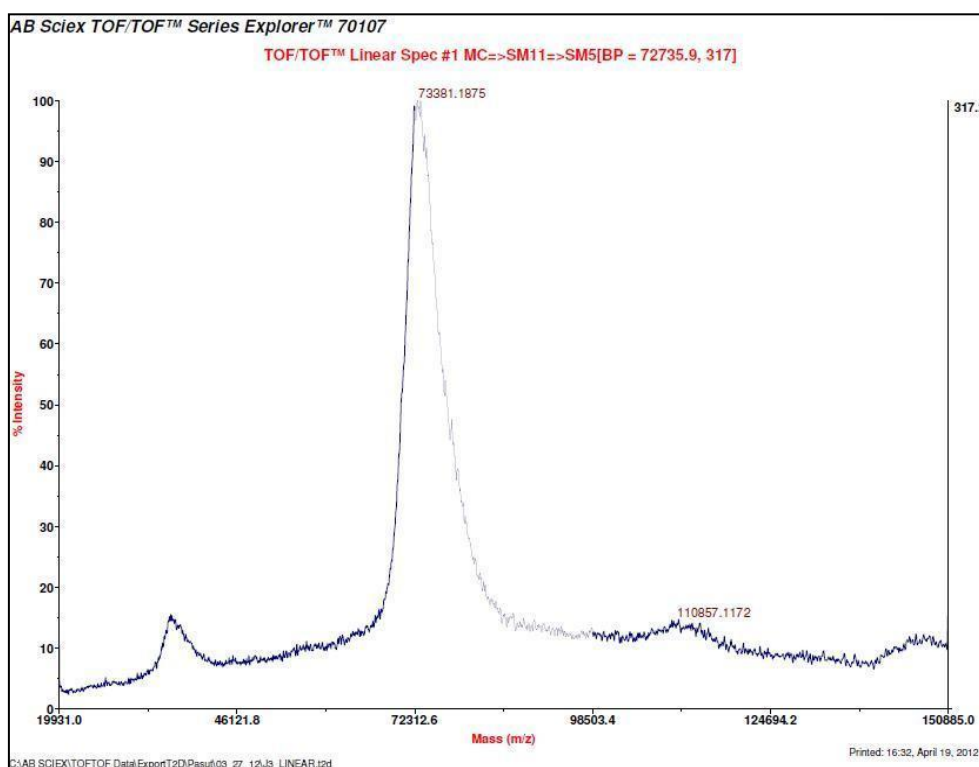


Figura 3.34 Grafico risultante dalla spettrometria di massa con tecnica MALDI su campioni di GOx modificata con biotina con rapporto molare 19:1 rispetto l'enzima.

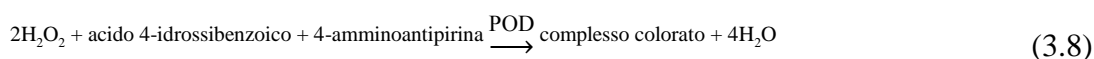
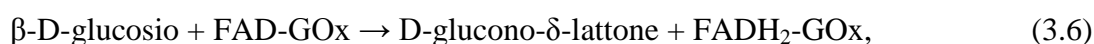
Test sull'attività enzimatica della GOx

E' stato eseguito un test per quantificare l'attività enzimatica della glucosio ossidasi e verificare come questa sia influenzata dalle modifiche effettuate.

Per le analisi è stato utilizzato un kit fornito dalla K-GLOX e seguita la procedura riportata al Capitolo di Materiali e Metodi.

Questo test prevede di far reagire direttamente, all'interno della cuvetta utilizzata per le misurazioni, la GOx con una soluzione standard di β -D-glucosio. L'acqua ossigenata che viene prodotta viene poi rilevata grazie alla presenza di perossidasi, un cromoforo che emette fotoni in presenza di acqua ossigenata.

Le reazioni alla base di tale metodo sono le seguenti:



Per definizione, ogni unità di attività corrisponde alla quantità di enzima capace di ossidare 1.0 $\mu\text{mol/min}$ di β -D-glucosio a D-gluconolattone e H_2O_2 a pH = 5.1 e alla temperatura di 35°C.

La prima prova è stata effettuata sull'enzima nativo per verificare la sua attività effettiva ed avere un valore di riferimento da confrontare con quelli ottenuti dopo le modifiche. Questo campione presenta una concentrazione di 1.47 mg/mL e la misura viene effettuata dopo averlo diluito di 73000 volte.

Tabella 3.3 Misure di assorbanza sul campo bianco e sul campione ottenute secondo le specifiche fornite dal kit K-GLOX per la misura di attività enzimatica della GOx nativa.

Assorbanza	Bianco	Campione
A ₁	0,0123	0,0001
A ₂	0,021	0,0585

In tabella 3.3 vengono riportati i dati relativi all'assorbanza del campione e del rispettivo campo bianco per due misure differenti: la prima, indicata con A₁, si riferisce all'assorbanza determinata dalla miscelazione delle soluzioni di glucosio e di perossidasi; A₂ rappresenta invece l'assorbanza relativa alla soluzione precedente a cui è stata aggiunta una soluzione contenente il campione di glucosio ossidasi da analizzare.

Con questi dati si ottiene che l'attività enzimatica della GOx nativa è pari a 227.4 kU/g.

Per i calcoli effettuati si rimanda al Capitolo Materiali e Metodi.

Si effettua poi lo stesso test sull'enzima che ha subito la modifica con biotina con rapporto molare 15:1. La concentrazione del campione da analizzare ha un valore di 0.55 mg/mL e la misura viene ottenuta con un rapporto di diluizione pari a 1000. Per questa misura si è preferito ripetere il test due volte. In tabella sono riportati i valori di assorbanza ottenuti.

Tabella 3.4 Misure di assorbanza sul campo bianco e sul campione ottenute secondo le specifiche fornite dal kit K-GLOX per la misura di attività enzimatica della GOx modificata con biotina in rapporto molare 15:1.

Prova 1	Bianco	Campione	Prova 2	Bianco	Campione
A ₁	0,0184	0,0059	A ₁	0,0145	0,0013
A ₂	0,0302	0,9621	A ₂	0,0177	0,8686

Dai valori di assorbanza ottenuti è possibile ricavare l'attività dell'enzima così modificato che risulta pari a 193.1 kU/g.

Allo stesso modo si procede ad analizzare la GOx ottenuta dalla modifica con biotine in rapporto molare 19:1. La concentrazione del campione è 0.15 mg/mL, la misura si ottiene con un rapporto di diluizione pari a 1000.

Si riportano in tabella i dati ottenuti dalle due prove effettuate.

Tabella 3.5 Misure di assorbanza sul campo bianco e sul campione ottenute secondo le specifiche fornite dal kit K-GLOX per la misura di attività enzimatica della GOx modificata con biotina in rapporto molare 19:1.

Prova 1	Bianco	Campione	Prova 2	Bianco	Campione
A ₁	0,0661	0,0428	A ₁	0,0732	0,0529
A ₂	0,0872	0,3743	A ₂	0,0931	0,3874

L'attività enzimatica ricavata è pari a 201.1 kU/g.

Dai dati ottenuti si può notare come le modifiche effettuate influiscano sull'attività catalitica dell'enzima abbassandola circa del 10-15% rispetto al complesso nativo. Si può comunque affermare che le biotine legate non interferiscono direttamente con il sito catalitico dell'enzima.

E' ipotizzabile che la diminuzione di attività sia dovuta a fattori sterici per la presenza delle biotine legate e a variazioni della struttura terziaria della proteina dovute a parziale degradazione della stessa durante la reazione.

Inoltre è possibile affermare che aumentando il numero di biotine legate, l'attività non vari in maniera così significativa.

Riassumendo, in tabella sono illustrati i risultati ottenuti nello studio condotto presso laboratorio del Dipartimento di Chimica:

Tabella 3.6 Tabella nella quale vengono riassunti gli studi di ingegnerizzazione dell'enzima GOx.

	Moli enzima [μmol]	Moli biotinaNHS [μmol]	Rapporto molare	Numero Biotine disponibile in superfici	Numero Biotine totali	Attività enzimatica [kU/g]	Variazione attività enzimatica rispetto all'enzima nativo [%]
1[^] mod.	0.418	6.48	15: 1	1	4	193.1	-15
2[^] mod.	0.090	1.75	19: 1	2	6	201.1	-11

Studio dell'attacco di GOx in microfluidica

Dopo aver verificato che l'enzima modificato mantiene le sue proprietà catalitiche per la reazione di produzione di acqua ossigenata, risulta importante individuare la strategia sperimentale più opportuna per massimizzare la resa di attacco della GOx in microfluidica.

Come effettuato per gli step precedenti, anche in questo caso lo studio è rivolto alla definizione della concentrazione e della durata del deposito in grado di massimizzare l'efficienza di attacco di GOx.

Quest'enzima ha un coefficiente di diffusione pari a $2 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Volendo calcolare il tempo necessario a una molecola per attraversare verticalmente tutto il canale al di sopra dell'elettrodo alto 0.1 mm, si utilizza la formula relazione (3.1) da cui si ricava che è necessario un per la diffusione pari a 10 minuti.

A scopo cautelativo, si decide di lasciare l'elettrodo immerso nel reagente stagnante per un'ora.

Per quanto riguarda la concentrazione del reagente si sceglie di non considerare la quantità di di avidina disponibile all'interazione con la glucosio ossidasi, ma di utilizzare una soluzione di trizma in cui la densità di GOx biotinilate sia 1 mg/mL. Dopo le modifiche apportate all'enzima, le analisi di spettrometria di massa mostrano che il peso molecolare della GOx-biotinata è 72735 g/mol, da cui si ricava che la concentrazione molare della molecola è 13.74 μ M.

Il confronto tra le voltammetrie cicliche riportato in figura 3.35 evidenzia l'effetto che ha il deposito di GOx sulla reversibilità del tracciante ferrocene in soluzione.

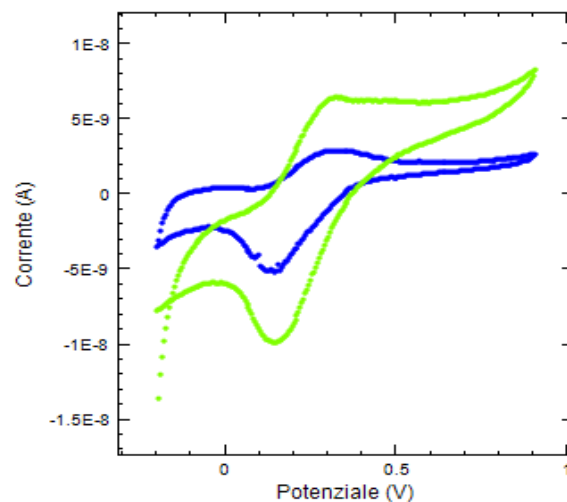


Figura 3.35 Voltammetrie cicliche a confronto: misura effettuata dopo il deposito di avidina (curva verde) e misura effettuata dopo il deposito di GOx (curva blu).

Si è giunti a questo punto alla fine della costruzione del biosensore sull'elettrodo di ITO. In figura 3.35 si riporta il confronto tra le CV in ferrocene ottenute ad ogni step di deposito. Il grafico sopra riportato mostra una diminuzione sensibile della conducibilità dell'elettrodo a conferma dell'efficacia dei trattamenti fatti.

3.5 Applicazioni

Dopo aver effettuato test enzimatici e aver messo a punto il metodo di deposito con risultati soddisfacenti, si procede all'introduzione nel chip di soluzioni di glucosio in trizma a diverse concentrazioni. Per ogni concentrazione introdotta si effettua una CV ad ampio intervallo di potenziale in modo da verificare più zone nella quale si possono avere scariche di corrente riconducibili alla presenza di enzima e substrato nel canale microfluidico. Nelle prove effettuate si riscontra una diminuzione progressiva dell'area di picco presente a potenziali

negativi all'aumentare della concentrazione di glucosio presente nella piattaforma microfluidica.

In figura 3.36 si riportano le CV ottenute variando la concentrazione di glucosio nel chip.

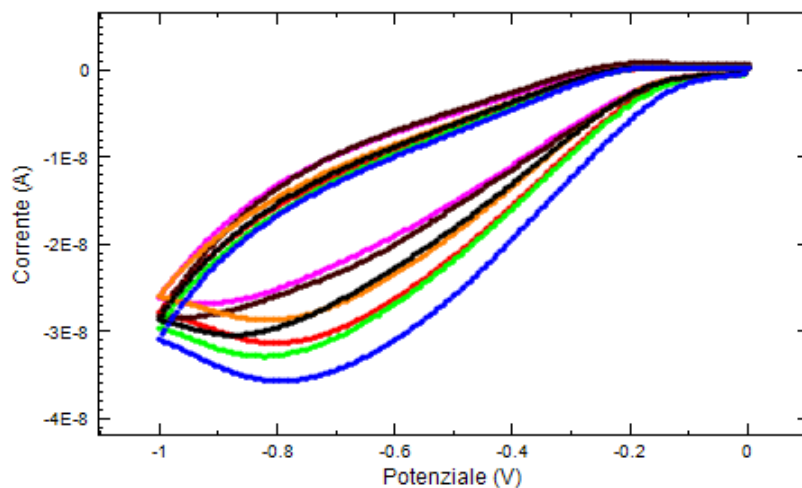


Figura 3.36 Voltammetrie cicliche ottenute in soluzione di trizma a diverse concentrazioni di glucosio: 100 μ M (curva blu), 200 μ M (curva verde), 500 μ M (curva rossa), 1mM (curva arancione), 2mM (curva nera), 5mM (curva marrone), 10 mM (curva rosa), 20mM (curva gialla).

Dall'immagine si vede che all'aumentare della concentrazione di glucosio il picco a -0.8V diminuisce in ampiezza. Ciò si può spiegare considerando che la reazione di riduzione del FAD a quel potenziale viene "inibita" dalla presenza di glucosio nel sistema. Si può quindi pensare di ottenere un'informazione sulla quantità di substrato presente in soluzione andando ad analizzare di quanto risulta diminuita l'ampiezza del picco associata all'attività elettrochimica del FAD.

Si cerca quindi di correlare le concentrazioni di glucosio presente in soluzione con l'altezza di picco che viene rilevata mediante voltammetria ciclica ad ogni condizione di lavoro. L'intento è quello di chiarire se l'andamento delle variazioni è in accordo con il modello cinetico di Michaelis-Menten. In tabella si riportano i dati sperimentali relativi a questa analisi.

Tabella 3.7 In tabella sono riportati i valori di concentrazione con cui sono state effettuate le voltammetrie cicliche e l'ampiezza di picco che l'elettrodo genera rispettivamente.

Concentrazione,[mM]	Altezza di picco, [A]
0,1	-1,35E-08
0,5	-1,12E-08
1	-9,75E-09
2	-7,74E-09
5	-6,37E-09
10	-5,82E-09
20	-5,96E-09

In figura 3.37 ne viene riportato l'andamento.

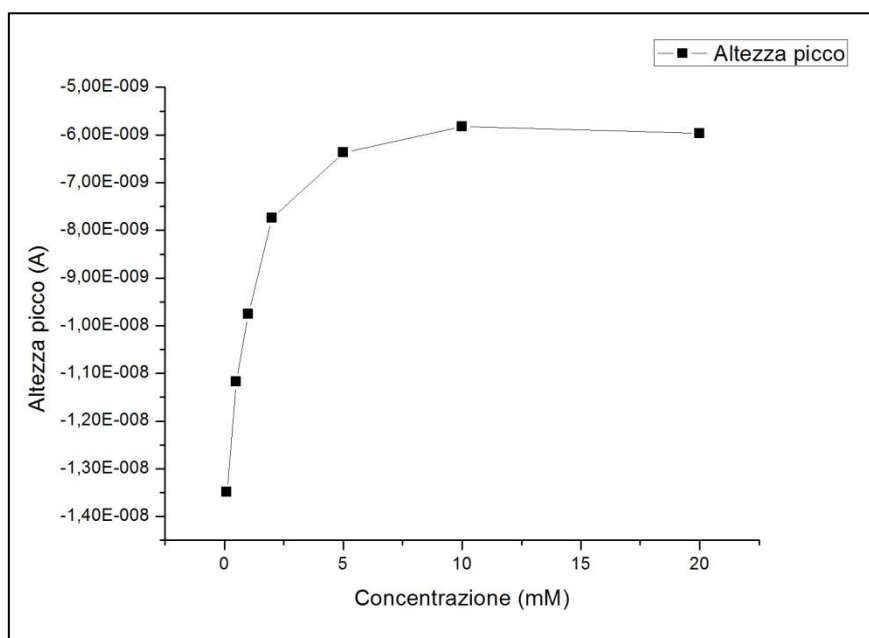


Figura 3.37 Grafico che mostra l'andamento dell'altezza del picco relativo al coenzima FAD al variare della concentrazione di glucosio in soluzione.

Il grafico evidenzia che la dipendenza dell'altezza di picco relativo alla riduzione del coenzima FAD al variare della concentrazione di glucosio in soluzione risulta essere del tutto riconducibile al modello cinetico di Michaelis-Menten.

Il modesto numero di dati sperimentali a disposizione non permette di determinare in modo soddisfacente i parametri cinetici attraverso il fitting dei punti sperimentali. Ad ogni modo risulta inequivocabile che l'andamento con cui il coenzima FAD risponde ai diversi stimoli di glucosio sia correlabile alle cinetiche biologiche descritte dal modello di Michaelis-Menten.

Dall'area del picco del FAD ottenuta mediante CV in trizma si può ricavare inoltre la densità di GOx presente sull'elettrodo.

Per fare ciò si ricorre al principio di Faraday. In particolare si può ricavare la densità superficiale di una specie redox andando a valutare il picco di corrente generato dalla reazione stessa. Così facendo si quantifica la carica totale scambiata e quindi le molecole che partecipano alla reazione.

La formula utilizzata è:

$$I_{picco} = \frac{n^2 F^2 v A \Gamma}{4RT} \quad (3.9)$$

Dove I_{picco} è la corrente relativa all'altezza di picco, n è il numero di elettroni scambiati nella reazione, F è la costante di Faraday, v è la velocità di scansione del potenziostato, A è la superficie dell'elettrodo, Γ è la densità superficiale in moli delle molecole adsorbite sull'area, R è la costante universale dei gas, mentre con T si indica la temperatura.

Conoscendo tutte le altre grandezze, si risolve l'equazione rispetto a Γ . Il valore ottenuto è pari a $1.22 \cdot 10^{-12}$ mol/cm².

Questo valore risulta essere molto più basso di quello atteso.

Ci si aspettava infatti che il valore del ricoprimento del FAD avesse circa lo stesso ordine di grandezza del valore relativo al ricoprimento di ammine ricavato attraverso tecniche XPS ($1.2 \cdot 10^{-9}$ mol/cm²). Dato il basso valore di ricoprimento superficiale ottenuto si decide di analizzare l'effetto che avrebbe un'amplificazione dell'albero del biosensore.

3.5.1 Tecniche di amplificazione del segnale del biosensore

Per realizzare un'amplificazione del segnale si parte dal presupposto che la GOx ha due molecole di biotina disponibili sulla superficie: una di queste lega l'avidina sottostante, mentre l'altra sarà libera di legare un'altra avidina.

Sulla base di questo ragionamento si prevede un deposito di avidina dopo quello di GOx in modo da creare un ponte tra la GOx depositata e la GOx che si sta per depositare.

Dopo aver costruito il biosensore si attua quindi un deposito di avidina e uno di glucosio ossidasi. Tra i due step si eseguono dei lavaggi in trizma.

Per quanto riguarda l'efficienza del deposito di avidina risulta evidente che, affinché questa sia massima è necessario che la biotina messa a disposizione dalla GOx sia non solo sulla

superficie dell'enzima, ma che si trovi inoltre sulla area esterna del biosensore finora costruito.

Sono stati effettuati 5 cicli di amplificazione e per ognuno di questi sono stati studiati gli effetti in termini di ricoprimento superficiale per ricavare la quantità di FAD presente.

In figura 3.38 il grafico mostra come varino le voltammetrie cicliche in soluzione di trizma ad ogni amplificazione.

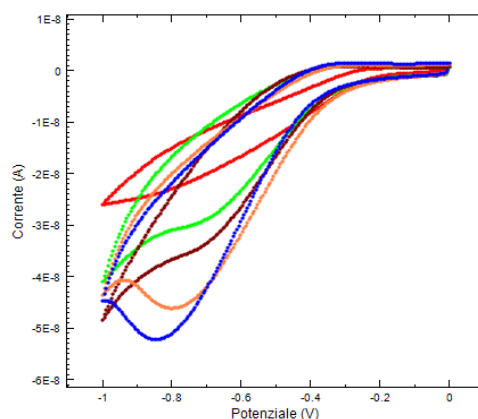


Figura 3.38 Voltammetrie cicliche effettuate in trizma dopo ogni ciclo di amplificazione: primo ciclo di deposito (curva rossa), prima amplificazione (curva verde), seconda amplificazione (curva marrone), terza amplificazione (curva arancio), quarta amplificazione (curva blu).

Come si vede dall'immagine la misura di voltammetria ciclica varia ad ogni ciclo di amplificazione, con un sostanziale aumento del picco di riduzione del FAD e allo stesso tempo un suo spostamento verso potenziali più negativi.

Questo comportamento si può spiegare considerando che le amplificazioni comportano sulla superficie un' aumentata presenza dell'enzima, e quindi di FAD. Il picco di riduzione si sposta via via a potenziali più alti poiché la successione di amplificazioni determina un progressivo allontanamento del coenzima FAD dall'elettrodo. Ad ogni amplificazione infatti l' "albero" del biosensore cresce in altezza.

Per rendere lo studio quantitativo si analizzano i picchi di riduzione del FAD al fine di ricavare dei valori di ricoprimento superficiale effettivo, secondo la procedura di calcolo già utilizzata.

In tabella 3.8 vengono riportati i risultati di questo studio ottenuti utilizzando la formula (3.9).

Tabella 3.8 Tabella in cui vengono riportati i valori di densità superficiale relativi ad ogni ciclo di amplificazione. La prima colonna si riferisce al biosensore non amplificato.

Amplificazione	Γ FAD reale, [mol/cm ²]	Γ FAD teorico, [mol/cm ²]
-	1,22077E-12	9,72E-10
Prima	3,50167E-12	2,916E-09
Seconda	1,11904E-11	8,748E-09
Terza	1,11904E-11	2,6244E-08
Quarta	1,27752E-11	7,8732E-08

I valori di ricoprimento indicati con il termine “reale” reali si riferiscono ai dati ottenuti sperimentalmente, mentre i valori teorici sono quelli che si otterrebbero se le amplificazioni avessero con rendimento unitario.

Dai risultati ottenuti si ricava che le amplificazioni comportano un effettivo aumento di ricoprimento dell'enzima GOx e quindi dell'enzima FAD sulla superficie. Anche con le amplificazioni però, come il primo ciclo di deposito, si ottiene un basso rendimento per la fase di attacco dell'enzima.

3.6 Sviluppi futuri

In questo paragrafo verranno presentati i risultati preliminari ottenuti sviluppando il biosensore su un materiale conduttivo ceramico trasparente diverso dall'ITO: l'FTO.

3.6.1 Studi preliminari sull'utilizzo dell'FTO come substrato conduttivo

In questo paragrafo verranno descritte le motivazioni che hanno spinto per la ricerca di un materiale diverso dall'ITO come substrato della piattaforma microfluidica.

Il materiale FTO, acronimo di fluorine tin oxide, è come l'ITO un semiconduttore ceramico trasparente. Esso però non mostra degradazione in soluzioni acide e non evidenzia il fenomeno di intercalazione da parte di cationi metallici se polarizzato negativamente in soluzioni contenente sali metallici.

Innanzitutto il fatto che l'FTO non si deteriora in soluzioni a pH acidi comporta due vantaggi fondamentali per l'applicazione considerata:

- Il deposito di grafting con sali di diazonio non costituisce più un passaggio delicato della funzionalizzazione dell'elettrodo. L'utilizzo di FTO permette un controllo meno accurato dei tempi e dei lavaggi poiché questa condizione non risulta critica per il materiale.
- L'enzima GOx mostra il massimo rendimento enzimatico per valori di pH pari a 5.5. L'impiego dell'ITO come substrato non permette di realizzare questa condizione poiché, anche in condizioni di acidità sono blande, è sufficiente un tempo ridotto per una completa corrosione dell'elettrodo. L'impiego di FTO quindi consente di ottimizzare l'attività enzimatica del biosensore.

Un'altra proprietà rende l'FTO un substrato più promettente dal punto di vista elettrochimico rispetto a ITO. L'FTO infatti non evidenzia il fenomeno di intercalazione dei cationi nella struttura. Questo è dovuto alla diversa natura dei due materiali ceramici. La conducibilità di ITO infatti deriva dalla presenza di vacanze di ossigeno, dovute allo sbilanciamento della carica positiva all'interno del reticolo in seguito al drogaggio dell'ossido di stagno nativo con ioni In^{3+} : quando ITO viene polarizzato negativamente, i cationi al suo interno vengono ridotti ed in presenza di un buffer ad elevato contenuto salino (come il PBS) possono essere rimpiazzati da altri cationi metallici. Con FTO invece ciò non accade in quanto gli atomi di fluoro non subiscono riduzione elettrochimica nelle condizioni operative. L'FTO quindi permette il libero impiego del PBS che, essendo la soluzione tampone più utilizzata per le colture cellulari, rende il biosensore applicabile a un maggior numero di ricerche biologiche. Oltre a questi motivi si ricorda che l'FTO mostra maggior resistenza meccanica all'abrasione e una maggiore conducibilità, pur mantenendo lo stesso valore di trasparenza. Infine, un altro motivo che fa propendere per la sostituzione dell'ITO con l'FTO è il suo minor costo economico.

La realizzazione del biosensore con substrato in FTO richiede pochi interventi rispetto alle metodologie già descritte per l'ITO. Questi sono riassumibili in due punti:

- Utilizzo del PBS come solvente e come liquido di lavaggio;
- Un diverso processo di etching rispetto all'ITO.

3.6.2 Risultati ottenuti

Gli studi preliminari sulla per la realizzazione del biosensore mediante l'utilizzo del semiconduttore FTO vengono svolti su scala macroscopica.

In primo luogo si è provveduto a realizzare la modifica superficiale dell'elettrodo mediante la reazione di electrografting con i sali di diazonio. L'FTO però, come già evidenziato, è un materiale chimicamente più inerte dell'ITO. Per realizzare quindi una sua modifica superficiale efficace sono risultati necessari 10 cicli di grafting, alle stesse condizioni utilizzate per ottenere il biosensore nel chip microfluidico. La modifica che la superficie subisce è evidenziata mediante il confronto tra le voltammetrie cicliche effettuate prima e dopo il trattamento, riportato in figura 3.39.

Dall'immagine è evidente che il comportamento che l'FTO mostra dopo il grafting ricalca i risultati ottenuti con l'elettrodo in ITO.

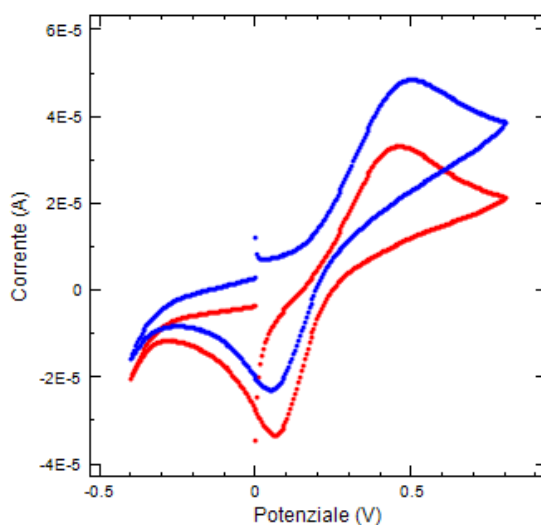


Figura 3.39 Voltammetrie cicliche a confronto: misura in ferrocene effettuata prima della modifica (curva blu) e dopo la modifica di grafting (curva rossa)

Oltre che con questa analisi, la presenza di ammine sulla superficie del semiconduttore viene verificata mediante misura di caratterizzazione XPS. I risultati ottenuti sono riportati in figura 3.40 e confermano l'effettiva presenza di ammine legate in modo covalente alla superficie.

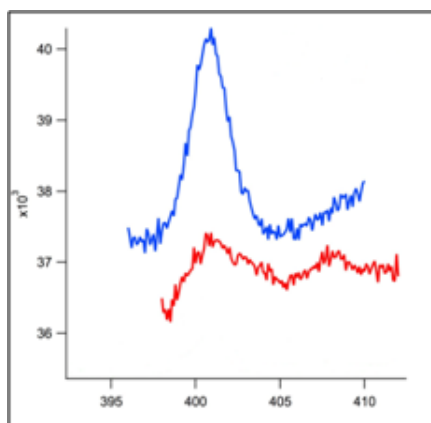


Figura 3.40 Risultati dell'analisi di caratterizzazione XPS effettuati prima (curva rossa) e dopo (curva blu) il processo di electrografting.

I depositi delle specie biologiche sono ottenuti applicando il protocollo messo a punto per il processo condotto all'interno della piattaforma microfluidica.

Dopo aver sviluppato il biosensore, se ne verifica il funzionamento ponendo l'elettrodo in soluzioni a diverse concentrazioni di glucosio.

Il biosensore mostra variazioni di corrente relative alla scarica di acqua ossigenata, nell'intorno del potenziale di 0.5 V.

In figura 3.41 sono riportati i voltammogrammi ottenuti al variare della concentrazione di glucosio in soluzione.

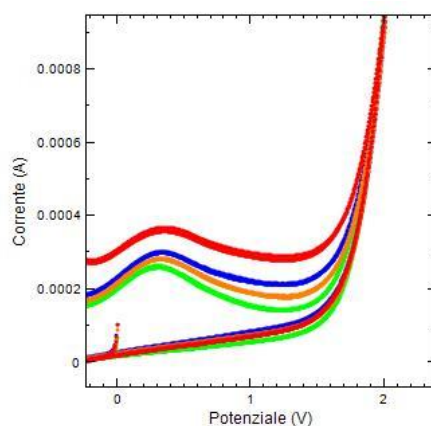


Figura 3.41 Voltammetrie cicliche ottenute a diverse concentrazioni di glucosio in trizma: 1 mM (curva verde), 2 mM (curva arancio), 10 mM (curva blu), 20 mM (curva rossa).

Analizzando i valori di corrente ottenuti al potenziale di 0.5V si ricava una curva, che presenta un andamento riconducibile a quello caratteristico di cinetiche enzimatiche descritte dal modello di Michaelis-Menten (figura 3.42).

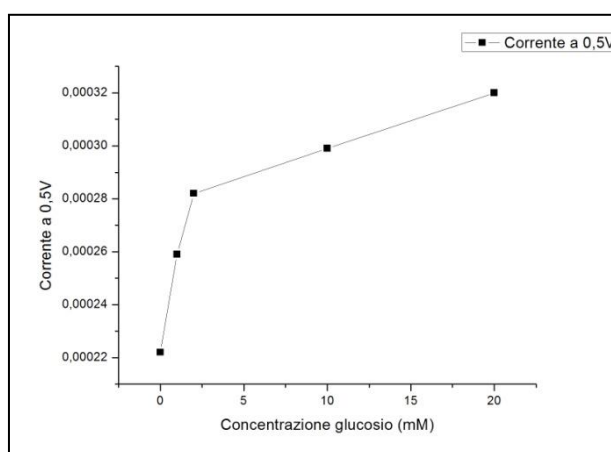


Figura 3.42 Grafico che riporta i valori di corrente rilevati a 0.5 V al variare della concentrazione di glucosio presente in soluzione.

Anche se risultati ottenuti da questo studio sono da considerarsi del tutto preliminari, si ritiene che il nuovo materiale sperimentato sia di primario interesse per migliorare le prestazioni del biosensore.

Conclusioni

Nel lavoro di Tesi svolto si è sviluppato un biosensore elettrochimico trasparente per la rilevazione del glucosio in piattaforma microfluidica mediante deposizione selettiva.

Il biosensore viene realizzato su elettrodi di ITO, materiale semiconduttore ceramico ad elevata trasparenza e conducibilità. La realizzazione del biosensore si sviluppa in più punti e parte dalla deposizione selettiva di funzioni chimiche tramite processi elettrochimici (electrografting) fino ad arrivare alla strutturazione della parte catalitica costituita da un enzima ingegnerizzato che permette di rilevare metaboliti in soluzione a basse concentrazioni. Questa tecnologia era già stata messa a punto in studi precedenti, ma su scala macroscopica. Il contributo che questo lavoro di Tesi ha apportato riguarda il trasferimento della tecnologia in piattaforma microfluidica e la definizione di un protocollo che permetta di costruire in modo selettivo il biosensore su un elettrodo alloggiato all'interno della piattaforma.

Primo risultato di questo lavoro è la realizzazione del chip nel quale è contenuto il sensore.

Allo scopo sono state utilizzate tecniche di microfabbricazione quali fotolitografia e softlitografia. Si è inoltre messo a punto un protocollo che permette di ottenere una corrosione selettiva dell'elettrodo.

Successivamente si è realizzato un sistema di alloggiamento della piattaforma microfluidica che consente di mantenere il biosensore in atmosfera controllata, di schermarlo dai disturbi elettromagnetici provenienti dall'ambiente, assicurando al contempo la comunicazione elettrica con lo strumento di misura.

Sono stati in seguito realizzati idonei elettrodi di riferimento e controelettrodi necessari per costituire una cella elettrochimica microfluidica completa. Il design della cella e la struttura tridimensionali degli elettrodi stessi ha consentito di realizzare misurazioni ripetibili ed affidabili anche lavorando con portate elevate (100 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Una volta messo a punto il sistema di alloggiamento e connessione del biosensore, l'attenzione è stata rivolta alla messa a punto del processo di modifica della superficie dell'elettrodo. Questo aspetto infatti rappresenta il primo step per lo sviluppo del biosensore. L'attacco sulla superficie viene effettuato mediante la tecnica di electrografting, mai realizzata prima su elettrodi trasparenti in piattaforma microfluidica. I risultati dello studio condotto confermano la possibilità di attivare chimicamente, in modo selettivo all'interno della piattaforma microfluidica, l'elettrodo sul quale si vuole costruire il biosensore.

Sono stati testati due materiali per la modifica superficiale: i sali di diazonio e la cisteammina. Entrambi consentono di ottenere una modifica irreversibile dell'elettrodo; si è scelto di utilizzare i sali di diazonio sia per la semplicità del protocollo di lavoro che per l'aumento di conducibilità che determinano sull'area interessata. Per validare questo processo si è ricorsi a diverse tecniche di caratterizzazione elettrochimica e alla tecnica di caratterizzazione XPS.

Per costruire il biosensore, si sfrutta la significativa affinità chimica che hanno tra loro biotina, una vitamina, e avidina, una proteina. Dapprima la biotina viene legata covalentemente alle funzioni amminiche presenti sulla superficie dell'elettrodo.

L'efficacia della reazione viene verificata sia con misure elettrochimiche sia con un'analisi di immunofluorescenza.

Lo step finale per la realizzazione del biosensore prevede il deposito dello strato catalitico costituito da enzimi opportunamente ingegnerizzati, secondo una procedura messa a punto in collaborazione con il Dipartimento di Chimica e Farmacia.

La modifica dell'enzima è stata verificata ricorrendo ad analisi di spettrometria di massa MALDI/TOF e test con HABA/Avidina mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro UV-VIS. Test appositi hanno inoltre permesso di dimostrare che non vi è una significativa diminuzione dell'attività enzimatica.

Al termine di queste numerose verifiche si esamina il funzionamento del biosensore realizzato.

Per studiare in che modo il biosensore rilevi il glucosio si introducono nel canale soluzioni a diverse concentrazioni di metabolita; effettuando delle misure di voltammetria ciclica risulta evidente la dipendenza del segnale elettrico, che l'elettrodo funzionalizzato restituisce, dalla concentrazione di glucosio presente in soluzione. I risultati conseguiti permettono di ottenere una curva con un andamento riconducibile al modello cinetico di Michaelis-Menten, confermando l'efficacia del dispositivo realizzato per la rilevazione del glucosio.

Per migliorare la sensibilità del biosensore, viene analizzata la densità di ricoprimento superficiale relativo all'enzima GOx sull'elettrodo. La bassa concentrazione di enzima in superficie rivelata suggerisce di prevedere un'amplificazione del segnale, ottenuta attraverso cicli ripetuti di deposito di avidina e di GOx. Questo metodo risulta efficace poiché il picco di riduzione relativo al FAD aumenta sensibilmente dopo ogni amplificazione.

Il biosensore però, seppur funzionante idoneo alla rilevazione di glucosio, evidenzia dei limiti soprattutto in termini di stabilità, a causa della scarsa resistenza chimica e meccanica dell'ITO.

Per questo motivo si cerca un materiale che abbia le stesse proprietà ottiche ed elettriche dell'ITO, ma che risulti più robusto di quest'ultimo.

La scelta ricade sul semiconduttore ceramico FTO, anch'esso dotato di elevata trasparenza.

Promettenti studi preliminari sull'impiego di questo materiale al posto dell'ITO evidenziano la sua adeguatezza all'utilizzo e una miglior risposta alle condizioni operative risultate critiche per l'applicazione con ITO.

Riferimenti bibliografici

Bartolo D. and Vincent Studer V. (2008). Microfluidic stickers. *Lab Chip*, **8**, 274-279.

Corgier, Bellon, Anger-Leroy, Blum, Marquette (2009). Protein-diazonium adduct direct electrografting onto SPRi-biochip. *Langmuir*, **16**, 9619-23.

Flavel, B. S., A. J. Gross, D. J. Garrett, V. Nock e A. J. Downard (1985). A simple approach to patterned protein immobilization on silicon via electrografting from diazonium salt solutions. *American Chemical Society*, **2**, 1184-1190.

Frost and Meyerhoff, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7370–7377.

Gamry Instruments (2010). Basics of electrochemical impedance spectroscopy – Application note.

Gervais, T. e K. F. Jensen (2006). Mass transport and surface reactions in microfluidic systems. *Chemical Engineering Science*, **61**, 1102-1121.

Lamberti, F., M. Giomo e N. Elvassore. (2011) Electrochemical biosensing with carbon nanotubes. In *Carbon Nanotubes - Growth and Applications* (Dr. Mohammad Naraghi, Ed.) InTech.

K. Liu, R. Wu, Y. Chuang, H. Khoo, S. Huang and F. Tseng, *Sensors*, 2010, **10**, 6623–6661.

Lyskawa, J. e D. Bélanger (2006). Direct modification of a gold electrode with aminophenyl Groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations. *Chem. Mater.*, **18**, 4755-4763.

Muzi e Bologna (1999). Tecniche di immunoistochimica – Un manuale operativo essenziale.

Rawson F., C. L. Yeung, S. K. Jackson, and P. M. Mendes. Tailoring 3D Single-Walled Carbon Nanotubes Anchored to Indium Tin Oxide for Natural Cellular Uptake and Intracellular Sensing, *Nanoletter*, 2012, Jan 23.

Y. Lv, Z. Zhang and F. Chen, *Talanta*, 2003, **59**, 571–576.

Ringraziamenti

Ringrazio mio padre e mia madre, perché i loro sacrifici hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo, perché i loro doni mi porteranno ancora più lontano. Ringrazio la mia gemella Gloria per essere semplicemente l'altra mia metà. Poli opposti che si attraggono, che non riusciranno mai a stare a distanza infinita tra loro.

Ringrazio Enrico, perché ho la certezza che sarà un punto fermo del mio futuro.

Ringrazio le mie amiche e i "tosi", per essere parte fondamentale della mia vita.

Ringrazio il "gruppo pranzo" e Giacomo, per essere stati i compagni di quest'avventura.

Ringrazio i ragazzi del BIOERA, per avermi insegnato a non distruggere un laboratorio; ringrazio in particolare Enrico, che mi ha introdotto al metodo dello ST.

Ringrazio infine Flambert per essere stato il mio mentore in questi sei mesi di Tesi, per i "ma occe!", per le risate e per il brevetto perduto.

