

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze chimiche

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 03/C1

Settore Scientifico disciplinare: CHIM/06

STUDIO E CARATTERIZZAZIONE DI BIOSENSORI SVILUPPATI SU
DISPOSITIVI INORGANICI ED ORGANICI

Presentata da: **SIMONE BONETTI**

Coordinatore Dottorato

ADRIANA BIGI

Relatore

BRUNO SAMORÌ

Correlatore

MICHELE MUCCINI

Esame finale anno 2013

Indice

Introduzione - 11

CAPITOLO 1 - I biosensori - 13

1.1 Biosensori: stato dell'arte - 14

1.2 Componenti dei biosensori - 17

1.2.1 Elementi di riconoscimento - 17

1.2.2 Elementi di Trasduzione - 18

1.2.2.1 Trasduttori elettrochimici - 18

Potenziometria - 19

Amperometria -20

Cronoamperometria - 21

Conduttimetria - 22

1.2.2.2 Trasduttori ottici - 24

1.2.2.3 Trasduttori acustici - 24

1.2.2.4 Trasduttori termici - 24

1.2.2.5 Trasduttori piezoelettrici - 25

CAPITOLO 2 -Funzionalizzazione di superfici di bioriconoscimento - 26

2.1 Deposizione di molecole su superfici inorganiche – 26

2.2 Tioli e molecole tioalte su oro – 27

2.3 Immobilizzazione di oligonucleotidi su superfici d'oro – 29

2.4 Metodi elettrochimici utilizzati per lo studio e lo sviluppo di un biosensore per la rilevazione di DNA su elettrodi in oro – 34

2.4.1 Celle elettrochimiche a tre elettrodi - 35

2.4.2 Voltammetria ciclica - 35

2.4.3 Voltammetria lineare - 37

**2.4.4 Colorante elettrochimicamente attivo per la rilevazione di DNA sulla superficie :
HOECHST 33258 – 38**

**2.4.5 Utilizzo di nano strutture auto assemblanti per la rilevazione di DNA sulle
superfici dei biosensori - 39**

CAPITOLO 3 – Rilevazione elettrochimica di ibridazione di DNA su un biochip planare a due elettrodi - 43

3.1 Introduzione - 43

3.2 Materiali e metodi - 45

3.2.1 Preparazione degli elettrodi d'oro - 45

3.2.2 Cella microfluidica - 46

3.2.3 Fabbricazione del filo di Ag/AgCl utilizzato come elettrodo di riferimento - 46

3.2.4 Misure elettrochimiche su superficie in oro - 46

3.2.5 Funzionalizzazione dell'oro e trattamento con Hoechst 33258 - 47

3.2.6 Misure elettrochimiche - 48

3.3 Risultati e discussione - 48

3.3.1 Principio di misura - 50

3.3.2 Voltammetria sugli elettrodi in oro funzionalizzati con oligonucleotidi - 54

3.3.3 Elaborazione scansioni di potenziale multipli - 55

3.3.4 Rilevazione di DNA in soluzione - 57

3.3.5 Due misure per ogni paio di elettrodi - 58

3.3.6 Risposta del biosensore a varie concentrazioni di target - 59

CAPITOLO 4 - Ottimizzazione e sviluppo su superfici microfabbricate del biochip a due elettrodi per la rilevazione di DNA - 62

4.1 Introduzione - 62

4.2 Materiale e Metodi - 64

4.2.1 La struttura del biochip - 64

4.2.2 Strategia di allineamento - 65

4.2.3 Caratteristiche tecniche degli elettrodi - 65

4.2.4 Caratteristiche tecniche della fluidica - 67

4.2.5 Pulizia del biochip - 67

4.2.6 Caratterizzazione della pulizia - 68

4.2.7 Immagini AFM - 68

4.2.8 Funzionalizzazione dell'oro e trattamento con Hoechst 33258 - 68

4.2.9 Flussi utilizzati all'interno della camera - 69

4.2.10 Scheda di misura - 69

4.2.11 Amplificazione molecolare con il Tetraedro a DNA o con l'HCR (Reazione di ibridizzazione a catena) - 71

4.3 Risultati e discussione - 72

4.3.1 Chip Microfabbricato, pulizia ed analisi superficiale - 72

4.3.2 Ottimizzazione della funzionalizzazione, dei parametri microfluidici e dell'incubazione con il target - 75

4.3.3 Misure diretta ed inversa del biosensore su superfici ultrapiatte e micro fabbricate con diverse concentrazioni di target - 78

4.3.4 Metodi di amplificazione molecolare sulla superficie del biosensore: tetraedro e HCR - 82

4.3.5 Conclusioni - 85

CAPITOLO 5 - Studio e sviluppo di un dispositivo organico ad effetto campo per la stimolazione e la rilevazione di segnali cellulari bioelettrici - 86

5.1 Introduzione - 86

5.1.1 I semiconduttori organici - 87

5.1.2 La teoria del trasporto di carica - 88

5.2.3 Transistor organici ad effetto di campo a film sottile - 91

5.2.4 Fabbricazione di OTFT con materiali biocompatibili e biodegradabili - 92

5.2.5 Biosensori OFET per la rivelazione di analiti - 95

5.3 Tecnologie esistenti per la rivelazione di segnali bioelettrici cellulari - 96

5.3.1 I segnali bioelettrici cellulari - 96

5.3.2 La tecnica del patch clamp - 98

5.3.3 Metodi ottici e fluorimetrici - 101

5.3.4 Matrici di Micro elettrodi per la registrazione extracellulare - 102

5.3.5 Transistor basati su tecnologia inorganica - 105

5.4 SCOPO DELLA RICERCA - 106

5.5 Materiali e metodi - 108

5.5.1 Misure spettroscopiche - 108

5.5.2 Immagini AFM - 108

5.5.2 Misure dell'angolo di contatto - 109

5.5.3 Fabbricazione dell'OTFT e caratterizzazione elettrica - 109

5.5.4	Simulazioni numeriche del campo elettrico e del campo elettrostatico - 110
5.5.5	Preparazione delle culture di neuroni delle radici dei gangli dorsali - 110
5.5.6	Stimolazione extracellulare e misura ottica del voltaggio di membrana - 111
5.5.7	Misure di fluorescenza su calceina-AM - 113
5.5.8	Test di vitalità cellulare - 113
5.5.9	Lunghezza dei neuriti - 114
5.5.10	Immunofluorescenza - 114
5.5.11	Patch-clamp - 115
5.5.12	Stimolazione con l'OTFT e lettura con il patch-clamp - 115
5.5.13	Registrazione extracellulare dell'OTFT - 116
5.5.14	MEA stimolazione e registrazione - 117
5.5.15	Soluzioni e prodotti chimici - 117
5.5.16	Registrazioni extracellulari, analisi dei dati e statistiche - 117
5.6	Risultati e discussione - 119
5.6.1	Caratterizzazione del materiale organico - 119
5.6.1.1	Spettro ottico e livelli di energia - 120
5.6.1.2	Morfologia del film - 122
5.6.1.3	Bagnabilità superficiale di differenti substrati cellulari - 121
5.6.2	Caratterizzazione elettriche dell'OTFT di P13 in differenti condizioni - 123

5.6.3 La capacità del semiconduttore di mantenere le caratteristiche funzionali e di vitalità delle cellule - 124

5.6.4 Stimolazione dei potenziali d'azione e la modulazione di V_{MEM} di neuroni DRG da parte dell'OTFT di P13 - 131

5.6.5 Stimolazione e registrazione dell'attività elettrica dei DRG da parte dell'OTFT di P13 - 139

5.6.6 Analisi statistiche dei segnali bioelettrici extracellulari - 141

5.6.7 Conclusioni - 144

6-Bibliografia - 177

Introduzione

La domanda sempre crescente, sia essa a carattere scientifico o sociale, per una determinazione quantitativa di specie chimiche sia naturali che artificiali, della loro diffusione e dei loro effetti sull'ambiente e sugli organismi viventi, evidenzia il bisogno di nuove strategie e nuovi metodi di misura. Questo ha stimolato lo sviluppo di sensori chimici, e più recentemente di biosensori. Sono numerose le evidenze che indicano come la disponibilità di un biosensore del tipo Lab on a chip può eliminare le lunghe e complesse procedure tipiche delle tecniche analitiche tradizionali. Un altro vantaggio è la possibilità di eseguire, in tempo reale, *in situ*, analisi mediche o ambientali da parte di personale non specializzato. Un'ulteriore e recente evoluzione di un biosensore sono dispositivi capaci di interagire in modo bidirezionale con cellule o tessuti in vitro o addirittura impiantabili negli organismi viventi per monitorare una specifica vitalità o funzionalità di organo o sistema. In quest'ottica biocompatibilità e interazioni all'interfaccia sistema/vivente dispositivo rendono possibile l'impiantabilità del dispositivo all'interno di organismi viventi.

L'attività sperimentale svolta nel presente programma di dottorato ha riguardato principalmente lo studio e lo sviluppo di differenti approcci per la realizzazione di differenti tipologie di biosensori. In particolare, nei primi due anni è stato studiato un biosensore elettrochimico inorganico per la rilevazione di filamenti di DNA all'interno delle acque degli acquedotti, sviluppato su superfici in oro e con architettura semplificata (Capitolo 2,3,4). Successivamente, lo studio è stato rivolto verso lo sviluppo di un dispositivo elettronico basato sull'utilizzo di materiali semiconduttori organici e su un architettura (transistor organico a film sottile (OTFT)). Quest'ultimo è stato fabbricato e studiato con lo scopo di consentire la stimolazione e la registrazione di segnali bioelettrici cellulari (Capitolo 5). Nel complesso il percorso di lavoro e di ricerca di questi anni mi ha consentito di studiare approcci eterogenei per la realizzazione di biosensori mirati a differenti ed eterogenee applicazioni nell'ambito della biodiagnostica e del biomedicale. I risultati che sono qui di

seguito riportati hanno evidenziato le plurime potenzialità di realizzazione nello sviluppo dei biosensori sia basati su tecnologia inorganica che organica.

CAPITOLO 1 - I Biosensori

I biosensori sono dispositivi comprendenti un elemento sensibile di origine biologica che, attraverso il legame specifico ad un elemento trasduttore, media il riconoscimento specifico e selettivo di una determinata specie chimica. Generalmente la trasduzione avviene attraverso un segnale elettronico, ottico o optoelettronico, la cui ampiezza o intensità è proporzionale alla concentrazione della specie chimica di interesse.

Un biosensore può essere quindi considerato come una combinazione di un biorecettore costituito dalla componente biologica, il trasduttore, solitamente un elettrodo e la componente elettronica.

I recettori biologici sono i responsabili del riconoscimento delle specie di interesse. Da questi dipende la selettività e sensibilità del dispositivo finale. Infatti, le interazioni tra recettore biologico/specie di interesse possono produrre variazioni di calore, massa, luce, ioni o elettroni, che a loro volta possono essere convertite in un segnale elettrico/optico dal trasduttore e susseguentemente amplificato, elaborato e reso visualizzabile all'operatore da componenti hardware.

In quest'ottica, la combinazione della specificità dei recettori biologici e l'accuratezza delle tecnologie opto-elettroniche associata alla potenza di calcolo di microprocessori consente di modificare radicalmente i metodi analitici, attraverso approcci multidisciplinari risultanti in dispositivi a basso costo, di rapida e semplificata lettura, adatti anche ad analisi di laboratorio effettuate da non esperti del settore.

Lo schema di un tipico biosensore è riportato in figura 1.1

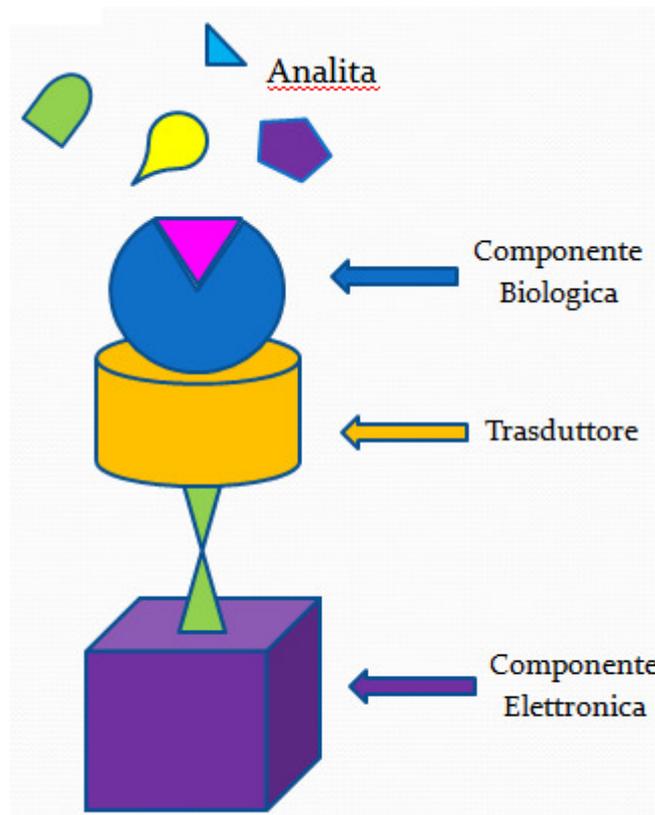


Figura 1.1: Rappresentazione schematica della struttura di un biosensore.

1.1 Biosensori: Stato dell'arte

Il padre del concetto dei biosensori è il professor Leyland D Clark il quale pubblicò un articolo sugli elettrodi ad ossigeno (1956). Basandosi su questa esperienza e desideroso di espandere il numero di analiti misurabili nel uomo, nel 1962 descrisse come effettuare un sensore elettrochimico “intelligente” tramite l'utilizzo di enzimi che processavano il materiale biologico e membrane di dialisi che permettevano il contatto con l'elettrodo solo a sostanze di piccole dimensioni. Un esempio di questi sensori è quello utilizzato per la ricerca del glucosio nel sangue e nel cibo (Figura 1.2). Il glucosio è convertito tra la prima e la seconda membrana dall'enzima glucosio ossidasi portando alla formazione di perossido d'idrogeno ed acido gluconico. Entrambi i prodotti passano da una seconda membrana e il

perossido d'idrogeno, essendo di dimensioni minori, ne attraversa anche una terza andando a contattare l'elettrodo ad ossigeno e portando ad un'amplificazione della corrente analizzata. Un picco evolutivo nel settore dei biosensori è stato riscontrato nel 1975, quando sono stati sviluppati i primi biosensori a fibre ottiche su cui venivano immobilizzate molecole d'alcool ossidasi sulla parte finale della fibra per misurare la presenza di alcool. Un altro passo importante nella ricerca biosensoristica è stato la scoperta del possibile utilizzo dei batteri come elemento biologico negli elettrodi microbici per la rilevazione sempre dell'alcool [Camman K., al. 1991].

Oggi i biosensori sono stati sviluppati per eseguire ispezioni in diversi campi applicativi tra cui: l'analisi ambientale, l'analisi chimico-industriale e la diagnostica clinica medica.

Nell'analisi ambientale sono stati sviluppati e studiati diversi biosensori tra cui quelli necessari per il rilevamento di pesticidi e di inquinanti nelle acque fluviali, per la rilevazione di microrganismi patogeni all'interno delle acque e nell'aria per scopi anti-bioterroristici, per determinare le sostanze tossiche prima e dopo il biorisanamento e per eseguire analisi di sostanze inquinanti su acqua e aria. Si utilizzano infatti delle centraline di monitoraggio basate su delle tecniche biosensoristiche per monitorare la quantità delle emissioni di gas ad effetto serra, e per monitorare se esse sono maggiori di quelle imposte dal protocollo di Kyoto. Nell'analisi chimico industriale invece sono stati sviluppati diversi biosensori tra cui: dispositivi per misurazioni analitiche di acido folico, biotina, vitamina B12 ed acido pantotenico come alternativa ai test microbiologici e per la rilevazione di organo fosfati. Altre impieghi si sono osservate nello screening di farmaci negli alimenti, come antibiotici e stimolatori della crescita (in particolare in carne e miele) e per il rilevamento di metaboliti tossici come le micotossine [Turner A., et al. 1987].

La Terza macroarea, nonché colei che ha portato allo sviluppo dell'idea di "biosensore" riguarda la diagnosi clinica. Sono stati sviluppati biosensori in grado di misurare la glicemia in pazienti diabetici, o la concentrazione di ormoni, vitamine, patogeni ed altre molecole di interesse biomedico nei fluidi corporei.

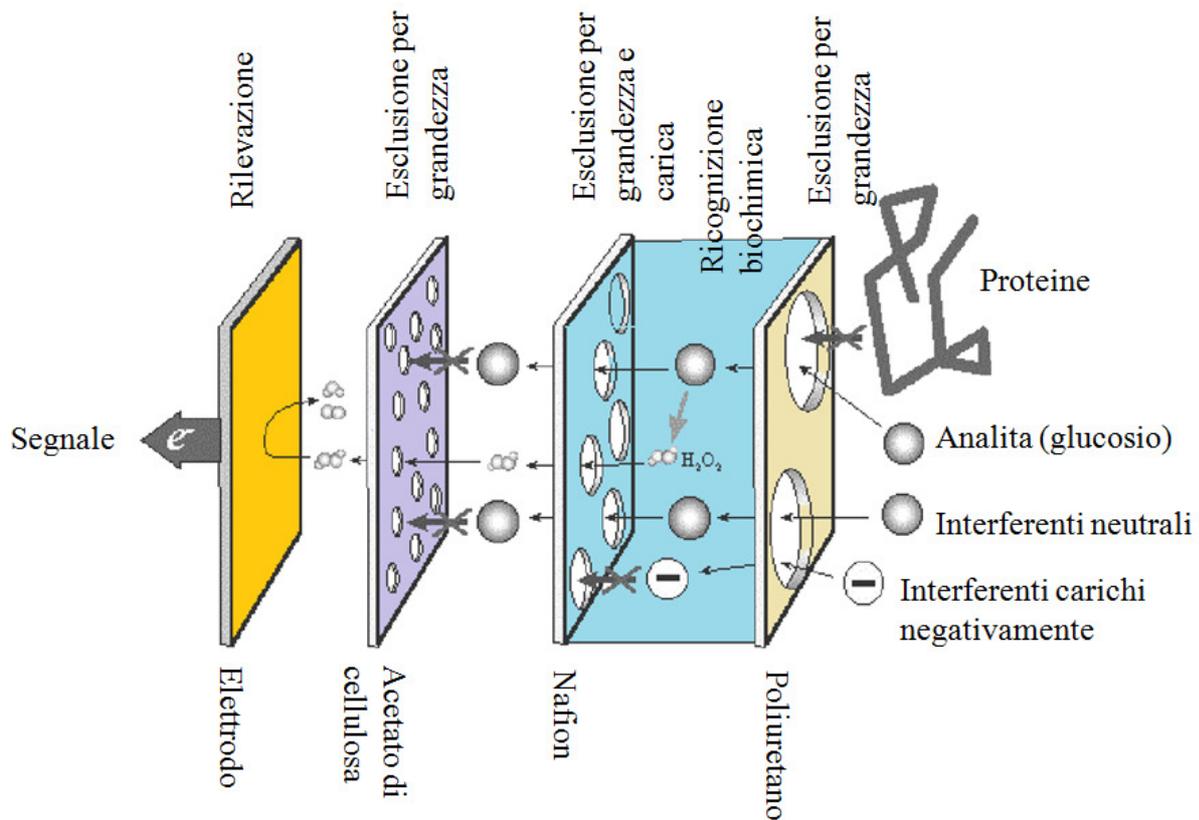


Figura 1.2: Schema di funzionamento del sensore per la rilevazione del glucosio nel sangue e nelle urine.

Inoltre, sono stati realizzati DNA ed RNA microarray per facilitare le analisi genomiche e test di gravidanza che indagano la presenza della gonadotropina corionica.

Biosensori capaci di determinare il riconoscimento di proteine plasmatiche e la visualizzazione di una bassa ossigenazione del sangue data dall'ischemia del miocardio, vengono inoltre utilizzati nelle stanze di rianimazione degli ospedali, per un immediata diagnosi di patologie come l'arresto cardiaco [McDonnel B., et al., 2009]

Nell'ambito di questo lavoro di tesi è di estrema rilevanza sottolineare come studi recenti siano stati focalizzati alla realizzazione di dispositivi impiantabili in grado di rilevare singole molecole o eventi più complessi, dati dall'insieme di diversi eventi molecolari che sottendono fondamentali funzioni fisiologiche. In quest'ottica è diventato di fondamentale importanza la

ricerca di materiali che avessero specifiche caratteristiche di affinità con le cellule viventi ovvero che ne preservassero sia la vitalità che la funzionalità.

1.2 Componenti dei biosensori

i biosensori sono composti da tre diverse componenti funzionali, la componente biologica, i trasduttori e la componente elettronica. Le diverse tipologie di questi elementi strutturali e funzionali dei differenti biosensori studiati nell'ambito del mio progetto di ricerca di dottorato saranno prese in rassegna nei seguenti capitoli.

1.2.1 Elementi di riconoscimento.

Le caratteristiche più importanti che una biomolecola deve possedere per poter essere usata nella fabbricazione di biosensori sono l'affinità e la specificità per l'analita di interesse. A tale scopo possono essere utilizzati tessuti, cellule e microrganismi, e quindi elementi cellulari in toto o alternativamente biomolecole a basso peso molecolare e macromolecole quali

- oligonucleotidi DNA, RNA o PNA;
- anticorpi, elementi di riconoscimento molto utilizzati grazie alla loro elevata specificità, versatilità e forza del legame con l'antigene;
- peptidi ed agenti leganti combinati, derivati da leganti a bassa affinità ottenuti mediante chimica combinatoriale;
- enzimi (più di 2500 utilizzati attualmente), molecole proteiche che presentano attività catalitica
- aptameri, molecole di DNA o RNA capaci di legare proteine (K_d 10^8 - 10^9 M), facili da sintetizzare ed idonee per lo screening su larga scala. Possono essere usate solo per target che legano acidi nucleici.
- Cellule: si possono analizzare differenti comportamenti riguardanti l'attività elettrica, la vitalità e l'alterazione dell'ambiente intra ed extracellulare (in particolare variazioni di pH

intra ed extracellulare) indotte dal legame o dalla interazione cellulo-mediata di una molecola, di una condizione ambientale (soluzione extracellulare) o sperimentale che vi vuole analizzare.

1.2.2 Elementi di trasduzione

La seconda componente dei biosensori è composta dai trasduttori, cioè la parte che trasforma il segnale dato dalla parte biologica, in un segnale riconoscibile ed analizzabile dalla componente elettronica. Esistono diverse tecnologie che stanno alla base dell'implementazione dei traduttori tra cui quella elettrochimica, acustica, ottica e piezoelettrica, resistiva, elettronica.

Tra le diverse tipologie di trasduzione verranno presi in esame ed elucidati con maggiore rilevanza i biosensori a trasduzione elettrochimica che hanno costituito il focus del programma di ricerca di dottorato nei primi due anni di corso..

1.2.2.1 Trasduttori elettrochimici

Un biosensore elettrochimico è formato da un trasduttore di segnale elettrico, chiamato generalmente elettrodo, connesso alla parte biologica. Il principio di funzionamento di un biosensore così preparato è il seguente: una specie chimica elettroattiva emessa dal riconoscimento della parte biologica con l'analita o utilizzata per rivelare tale riconoscimento diffonde sulla superficie elettrodica e genera un segnale elettrico che viene rilevato da uno strumento e messo in relazione alla concentrazione dell'analita in esame.

Gli elettrodi che normalmente si utilizzano per fabbricare biosensori elettrochimici sono in grado di tradurre l'interazione analita/biorecettore attraverso potenziometria, amperometria, cronoamperometria e conduttometria [Grieshaber et al. 2008].

Potenziometria

La potenziometria è una tecnica elettroanalitica in cui i trasduttori di segnale (elettrodi) misurano una differenza di potenziale che si genera, in condizioni di flusso di corrente prossima a zero, tra l'elettrodo di riferimento e quello indicatore. Essenziali per la misura potenziometrica sono l'accuratezza e la stabilità del potenziale dell'elettrodo di riferimento.

La relazione tra la forza elettromotrice della cella e l'attività dello ione di interesse in soluzione deriva dall'equazione di Nernst:

$$E = E^{\theta} + \frac{RT}{nF} \ln a_i$$

dove:

E: differenza di potenziale tra l'elettrodo di misura e quello di riferimento;

E₀: potenziale standard, V;

R: la costante universale dei gas, 8.314 J mol⁻¹ K⁻¹;

T: temperatura, K;

n: carica elettrica dello ione i, C;

F: costante di Faraday, 96485 C mol⁻¹;

a_i: attività in soluzione dello ione i.

Il coefficiente di attività (γ) dello ione, si assume uguale all'unità. Per soluzioni diluite l'attività è sostituita dalla concentrazione.

Riscrivendo l'equazione di Nernst:

$$E = K + S \log c$$

si osserva che la forza elettromotrice E della cella varia linearmente con il logaritmo della concentrazione dello ione i, con un'inclinazione (S) ed una intercetta K, dove K è una costante numerica. Il sensore potenziometrico classico è l'elettrodo a vetro per la misura del pH. Il suo funzionamento si basa su una membrana di vetro speciale, altamente selettiva allo ione H⁺.

Amperometria

L'amperometria è una applicazione della voltammetria (o polarografia). Il meccanismo su cui si basa è: si mantiene un potenziale fisso tra due elettrodi, per poter seguire una variazione di corrente, in condizioni di diffusione convettiva, in funzione della concentrazione di una data specie elettroattiva:

$$i_1 = nFA m_0 c_0$$

dove:

i_1 : corrente limite, A;

n: numero di elettroni;

F: costante di Faraday, 96485 C mol⁻¹;

A: area dell'elettrodo di lavoro, cm²;

m_0 : coefficiente di trasporto di massa, cm⁻¹;

c_0 : concentrazione della specie elettroattiva in soluzione, mol L⁻¹.

L'Equazione può essere riscritta in una forma ridotta:

$$i_1 = K \cdot c_0$$

dove K è una costante numerica

Tale tecnica analitica richiede l'uso di un sistema a tre elettrodi, anche se in casi particolari se ne possono utilizzare semplicemente due. La cella elettrochimica utilizzata nelle misure amperometriche è costituita da un elettrodo di lavoro (*working electrode*, WE), un elettrodo di riferimento (*reference electrode*, RE) e un elettrodo ausiliario, spesso chiamato anche controelettrodo (*counter electrode*, CE), tutti immersi in una soluzione elettrolitica. L'uso della configurazione a due elettrodi prevede l'impiego dell'elettrodo di riferimento e di lavoro, in questo modo il potenziale applicato ai due elettrodi tende a variare nel tempo, ma per brevi periodi operativi, rimanendo comunque è trascurabile. La concentrazione della specie elettroattiva sotto investigazione è misurata rilevando la corrente che passa tra l'elettrodo di lavoro e ausiliario, mentre è applicata una differenza di potenziale costante tra l'elettrodo di lavoro e quello di riferimento. Il potenziale di lavoro è scelto in modo tale che l'analita di interesse possa essere ossidato o ridotto all'elettrodo di lavoro, in quanto ogni reazione di ossidoriduzione è caratterizzata da un diverso potenziale elettrochimico ben definito. La scelta del potenziale di lavoro è condizionata dal materiale impiegato per la costruzione degli elettrodi di lavoro, dalle eventuali interferenze elettrochimiche e anche dalla sensibilità di misura che si desidera ottenere.

Nel caso particolare dei biosensori, usando come rivelatore di segnale un normale amperometro, si misura la corrente generata indirettamente dall'interazione dell'analita con il componente biologico. Il prodotto di questa reazione costituisce la specie elettroattiva, che diffondendo sulla superficie elettrodica, subisce una reazione redox.

Cronoamperometria

Nelle misure cronoamperometriche si misura l'andamento della corrente nel tempo per un elettrodo di lavoro (W.E) il cui potenziale è costante o varia con legge nota. Il potenziale effettivo del W.E è dato dalla relazione

$$E_{WE} = E_{POT} - E_{RE} - iR$$

Dove E_{WE} e E_{RE} sono rispettivamente i potenziali dell'elettrodo di lavoro e di riferimento, E_{POT} è il potenziale imposto e iR la caduta ohmica dovuta al passaggio di corrente.

La dimensione ottimale dell'elettrodo di lavoro risulta dal bilancio di 2 contributi opposti, quello della superficie attiva, che determina l'entità del segnale, e il valore della corrente i passante, che aumenta la caduta ohmica. In quest'ultimo caso è importante anche la resistenza R dell'elettrodo di riferimento, sia piccola. L'impiego di microelettrodi consente di mantenere il valore della corrente nell'ordine dei micro o nano Ampere, e permette l'utilizzo di una cella di elettrolisi a 2 elettrodi; se invece le dimensioni, e di conseguenza le correnti, sono più elevate, e l'elettrodo di riferimento possiede resistenza elevata, è conveniente usare, un sistema a tre elettrodi, in cui il RE fornisce solo un potenziale costante e stabile, mentre la corrente circola tra il WE e il contro elettrodo. In questo modo con i pari a zero ($i = 0$) nel ramo del circuito e il termine iR non contribuisce più al potenziale E_{WE} .

Conduttimetria

La conduttimetria si basa sulla misura della conducibilità elettrica di una soluzione elettrolitica e/o della sua variazione al variare del tipo o della concentrazione delle specie ioniche.

La conducibilità (o conduttanza, Λ) di una soluzione è definita come l'inverso della sua resistenza elettrica (R):

$$\Lambda = \frac{1}{R}$$

In base alla seconda legge di Ohm, la conducibilità diventa:

$$\Lambda = \frac{1}{\rho \frac{l}{S}} = \frac{1}{\rho} \frac{S}{l} = \chi \frac{S}{l}$$

dove:

ρ : resistività, Ω cm;

l : lunghezza del conduttore, cm;

S : area della sezione, cm^2 ;

χ : conduttività, S;

La conducibilità elettrica di una soluzione è misurata mediante un conduttimetro, collegato alla cella conduttimetrica, costituita da due elettrodi, in genere di Pt, immersi nella soluzione elettrolitica. I materiali (platino-platinato o platinopalladiato) che costituiscono l'elettrodo, presentano una superficie effettiva maggiore di quella geometrica; per questo motivo, nelle misure, si indica come costante di cella K (cm), il rapporto S/l . Dalla equazione precedente si ha quindi:

$$\Lambda = \chi \cdot K$$

dove:

Λ : conducibilità della soluzione, S;

χ : conducibilità specifica, S/cm.

I fattori che agiscono sui meccanismi di conduzione sono:

- la concentrazione degli ioni in soluzione;
- le cariche ioniche;
- la velocità di migrazione degli ioni in soluzione;

- la temperatura.

E' importante sottolineare che i trasduttori elettrochimici potenziometrici, amperometrici e conduttometrici hanno la possibilità di essere integrati in dispositivi miniaturizzati ed applicati a sistemi basati su tecnologia CMOS per ottenere una massimizzazione dell'amplificazione del segnale trasdotto, e di conseguenza una maggiore sensibilità del sensore stesso.

1.2.2.2 Trasduttori ottici

I trasduttori ottici consistono nella misura dell'assorbimento o dell'emissione di una radiazione in una regione dello spettro visivo (infrarossi, visibile, ultravioletti, raggi X). È importante sottolineare che il segnale ottico è proporzionale al numero di molecole e non alla loro concentrazione, e che pertanto la geometria della regione sensibile risulta essere molto importante.

La variazione di assorbanza può essere dovuta sia alla specie attiva che al reagente (metodo indiretto: complesso reagente-sostanza analizzata) [Nirschl et al. 2011].

1.2.2.3 Trasduttori acustici

I trasduttori acustici consistono nel tradurre un segnale elettrico (di tensione o di corrente) in un segnale acustico. L'intensità di tale segnale acustico dipende chiaramente dal segnale che il trasduttore trova in ingresso [Nirschl et al. 2011].

1.2.2.4 Trasduttori termici

I metodi di rivelazione termica consistono nella misura dell'entalpia di una determinata reazione, e si basano sul principio del calorimetro.

Tali trasduttori utilizzano enzimi come parte biologica, in quanto spesso le reazioni enzimatiche sono molto esotermiche.

Il vantaggio connesso all'impiego dei metodi termici è quello di ottenere una risposta lineare su un intervallo di circa 5 ordini di grandezza [Nirschl et al. 2011].

1.2.2.5 Trasduttori piezoelettrici

I trasduttori piezoelettrici si basano sulla misura del cambiamento della frequenza di risonanza di un oscillatore meccanico, dovuto al riconoscimento di analiti di interesse da parte della molecola biologicamente attiva immobilizzata su di esso [Nirschl et al. 2011]. Questi oscillatori sono cristalli piezoelettrici, conosciuti solitamente come microbilance di cristalli di quarzo che vengono inserite in un circuito oscillante e la cui frequenza di risonanza rispetto ad un quarzo di riferimento viene rilevata con un frequenzimetro

CAPITOLO 2 - Funzionalizzazione delle superfici di bioriconoscimento

2.1 Deposizione di molecole su superfici inorganiche

Già nella prima metà del secolo scorso è stata studiata la possibilità di ottenere monostrati molecolari su superfici solide. I primi studiosi in questo campo furono gli scienziati Irving Langmuir e Katharine Blodgett i quali misero a punto una metodica la quale prevede inizialmente un'organizzazione di un monostrato di molecole all'interfaccia liquido-aria e successivamente lo spostamento di esso su di un substrato solido. Tale metodica quindi prevedendo inizialmente una disposizione delle molecole e poi lo spostamento di esse sul substrato, ha come conseguenza un orientamento disorganizzato delle molecole ed un'insufficiente copertura del substrato stesso. Nonostante ciò rimane un approccio particolarmente indicato quando si vuole definire un "multiple organized layer" [Finklea, 1996].

Contemporaneamente allo sviluppo tale metodica, venne sviluppata una nuova strategia di deposizione. Nel 1946 Zisman studiò la preparazione di uno strato con lo spessore di una singola molecola tramite auto-assemblaggio di un surfactante su una superficie metallica.

Tale scoperta non fece molto scalpore inizialmente, ma dopo molti anni, in particolare negli anni 80, si capirono le vere potenzialità e l'importanza del self assembly monolayer (SAM).

Grazie al lavoro di Kunh e colleghi su molecole modificate con clorosilani e successivamente grazie alle scoperte fatte da Nuzzo e Allara che mostrarono la possibilità di preparare SAM di alcantioli su oro tramite adsorbimento di n-alcil-disolfuri presenti in soluzioni diluite [Ulman, 1996], si iniziò a dare il giusto peso a tale scoperta.

Evolvendo con gli anni l'elenco dei gruppi chimici funzionali utilizzati per derivatizzare una superficie mediante autoassemblaggio è progressivamente aumentato. Tioli, solfuri e disolfuri

sono molto utilizzati su oro, tuttavia sono stati ottenuti SAM utilizzando anche acidi grassi (su metalli ossidati), silani (su diossidi di silicio e superfici alcoliche), fosfonati (su metalli fosfonati) e isonitrili (su platino) [Chidsey et al., 1990].

Tra i substrati utilizzati il più vantaggioso è l'oro in quanto le superfici, se opportunamente ottenute e trattate possono risultare altamente lisce e pulite. Tali proprietà sono caratteristiche necessarie di un substrato per poter permettere la formazione di SAM compatti e ordinati. Anche argento e rame sono utilizzati in quanto materiali più economici, ma la loro tendenza ad ossidarsi al contatto con l'aria pone dei problemi durante la deposizione delle molecole. In circostanze differenti sono stati impiegati anche platino e mercurio. Per quanto riguarda il platino, i SAM che sono stati ottenuti su questo metallo, mostravano grosse irregolarità, poichè permeabili a ioni e quindi poco stabili. L'utilizzo del mercurio invece ha come vantaggio quello di ottenere superfici molto lisce e pulite, ma non esistono chiare evidenze della formazione di SAM compatti e regolari su questi substrati [Finklea, 1996].

In conclusione, rispetto ai monostrati ottenuti mediante altre tecniche come i Langmuir-Blodgett film a cui si è già accennato, le molecole che compongono i SAM presentano un orientamento e un ordine ben definito, ma soprattutto possono incorporare una grande varietà di gruppi chimici, sia a livello della catena alchilica, sia all'estremità libera di tali catene. Questo permette non solo un notevole controllo nelle qualità dei SAM [Ulman, 1996], ma consente anche lo sviluppo di un'ampia varietà di superfici.

Nel lavoro che ho svolto nel periodo iniziale del mio dottorato, è stato fondamentale studiare, attuare e successivamente modificare protocolli di funzionalizzazione con SAM di oligonucleotidi. Nelle prossime pagine approfondirò aspetti riguardanti la derivatizzazione di superfici solide, in particolare di superfici d'oro, con DNA.

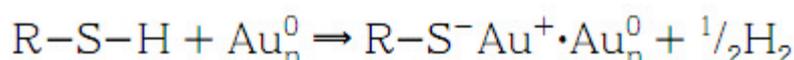
2.2 Tioli e molecole tiolate su oro

Come è già stato anticipato, molteplici indagini condotte sui SAM riguardano la deposizione di composti tiolati su superfici d'oro. Oltre all'utilizzo di singoli cristalli d'oro, è molto

frequente l'impiego di film sottili evaporati su superfici di vetro o di mica, che consentono di ottenere strati d'oro con un orientamento (111) in seguito ad annealing termico, e con una rugosità sufficientemente bassa per permettere la formazioni di SAM ordinati e compatti.

Diversi fattori hanno portato all'utilizzo di un substrato metallico ed in particolare d'oro. Come infatti è già stato sottolineato è relativamente semplice fabbricare superfici d'oro piatte, stabili e pulite. Inoltre a differenza di altri metalli come il platino e l'argento, l'oro è inerte, non subendo ossidazione in normali condizioni ambientali. Infine, il forte legame che si forma tra l'atomo di zolfo e l'oro (a cui si devono aggiungere le interazioni tra le catene idrocarburiche degli alcanotioli) consente di preparare con una certa facilità monostrati densi e quasi cristallini di alcanotioli a partire da fasi gassose o liquide [Vericat et al., 2006].

Nel caso degli alcanotioli questa reazione può essere considerata formalmente un'addizione ossidativa del legame S-H sulla superficie d'oro, seguito dall'eliminazione riduttiva di idrogeno. Quando si utilizza una superficie d'oro pulita, il protone va a formare idrogeno gassoso (H₂). Questo può essere dedotto dal fatto che si formano monostrati di questo tipo da una fase gassosa in completa assenza di ossigeno o di qualunque altro agente ossidante [Finklea, 1996].



Il legame del gruppo tiolo alla superficie d'oro è molto forte (circa 40 kcal mol⁻¹) [Ulman, 1996]; in molti lavori è stata ben documentata la stabilità termica dei SAM formati da alcanotioli e per esempio è stato mostrato come i tioli tendano a staccarsi dalla superficie d'oro in un intervallo di temperatura compreso tra 170 e 230°C [Nuzzo et al., 1987].

Gli studi cinetici riguardanti la deposizione di alcanotioli su superfici d'oro hanno mostrato come, nel caso di soluzioni diluite (10⁻³ M), si possano distinguere due fasi ben distinte [Ulman, 1996]. La prima fase è molto veloce, in quanto si realizza in pochi minuti ed in cui il monostrato raggiunge all'incirca il massimo dello spessore (circa 80-90%); la seconda fase invece, è molto più lenta e può durare anche alcune ore e permette l'ispessimento massimo del SAM.

Lo step iniziale è in generale ben descritto dal modello di Langmuir basato sulla diffusione, e dipende fortemente dalla concentrazione delle molecole tiolate. Quindi questa fase è governata dall'interazione tra i tioli e la superficie. Lo step successivo invece può essere descritto come un processo di cristallizzazione dei tioli sulla superficie, in cui le catene alchiliche passano a una condizione di maggior ordine. Questa fase è influenzata dal tipo di catene alchiliche presenti, dal tipo di interazione che si formano tra catene adiacenti (VDW, dipolo-dipolo...) e dalla mobilità delle catene rispetto alla superficie.

Per esempio è stato dimostrato che la cinetica di adsorbimento è molto più veloce per alcanotioli con catene lunghe, proprio grazie a un maggior numero di interazioni intercatena. Al contrario, la presenza di gruppi chimici molto ingombranti lungo la catena, possono mantenere il SAM in uno stato di alto disordine [Whitesides and Laibinis, 1990].

Molti lavori, comunque, mostrano che tale modello non descrive interamente ciò che avviene sulla superficie e che in realtà la cinetica di adsorbimento degli alcanotioli è molto più complessa. Infatti è probabile che eventi di desorbimento possano avere un importante ruolo nella definizione della struttura finale del monostato [Ulman, 1996].

2.3 Immobilizzazione di oligonucleotidi su superfici d'oro

Come accennato precedentemente, negli ultimi anni è cresciuto molto l'interesse verso lo sviluppo di biosensori per la rilevazione di DNA. Questi dispositivi si basano sulla preparazione di array costituiti da singoli filamenti di DNA fissati a un substrato per la cattura delle molecole di DNA complementari. Esistono due metodi principali per ottenere queste superfici: è possibile sintetizzare direttamente gli oligonucleotidi sulla superficie di supporto [Pease et al., 1994; Southern et al., 1994], oppure si possono legare alla superficie oligonucleotidi presintetizzati, eventualmente modificati con vari gruppi funzionali, per favorirne l'adsorbimento sulla superficie [O'Donnell et al., 1997; Gingeras et al., 1987].

Il primo approccio è molto diffuso nella la preparazione dei DNA microarray, in quanto consente di produrre array ad alta densità e con un elevato grado di ordine. Tuttavia, questi sistemi richiedono risorse e competenze che non sono sempre disponibili in tutti i laboratori; quindi nell'ambito della ricerca viene maggiormente sfruttato il secondo approccio.

Nel corso degli anni sono stati messi a punto numerosi metodi: alcuni di questi prevedevano l'attacco di avidina alla superficie e la successiva aggiunta di DNA biotinilato, la derivatizzazione delle superfici con gruppi carbossilici in grado di reagire con le basi del DNA, l'immobilizzazione di DNA tramite un intercalante che interagisce con la superficie di un SAM preformato e la formazione di un sottile film di alcanodifosfato su alluminio carico positivamente per l'attacco elettrostatico del DNA [Huang et al., 2000].

Attualmente il sistema più semplice e più utilizzato nei laboratori di ricerca per la produzione di SAM di DNA prevede l'utilizzo di oligonucleotidi a cui viene legato covalentemente a una delle due estremità un linker, solitamente una catena alchilica di sei o raramente di tre atomi di carbonio, che presenta un gruppo tiolo all'estremità libera [Herne and Tarlov, 1997]. Il suo posizionamento rispetto all'oligonucleotide pare non essere un aspetto trascurabile in quanto è stato osservato che, modificando la posizione del linker all'estremità 5' o all'estremità 3', si determina un significativo cambiamento nella struttura e nel compattamento del SAM [Sam et al., 2001]. Al tempo stesso è stato sottolineato come l'allontanamento dell'oligonucleotide dalla superficie favorisca l'evento di ibridizzazione [Wirtz et al., 2004], promuovendo quindi l'utilizzo di catene alchiliche di 6 atomi di carbonio, rispetto a quelle a 3. Inoltre il linker agisce anche da isolante elettrico tra la superficie metallica ed il DNA, aumentando così l'isolamento elettrico all'aumentare del compattamento e dello spessore del SAM.

La relativa facilità con cui si riescono a depositare alcanotioli su oro ha generato un aumento di interesse verso tali SAM. Tuttavia questo discorso non è applicabile ai SAM costituiti da oligonucleotidi tiolati; nonostante l'interesse sia molto alto, non è così semplice ottenere SAM di questo tipo.

Uno dei principali ostacoli per la formazione di SAM di DNA compatto e ordinato riguarda la formazione di interazioni aspecifiche tra i nucleotidi e la superficie d'oro.

In teoria, una molecola di DNA modificata con un gruppo tiolo a un'estremità dovrebbe interagire con la superficie solo tramite l'atomo di zolfo. In realtà è stato osservato che, durante le prime fasi dell'adsorbimento, si formano altre interazioni tra gli atomi di azoto contenuti nei nucleotidi e la superficie.

In letteratura è stato dimostrato come le ammine primarie siano in grado di interagire mediante legami deboli con una superficie d'oro [Leff et al., 1996].

Pur trattandosi di interazioni deboli, è possibile che durante la deposizione se ne formino un numero sufficiente da renderle un fenomeno non trascurabile e si è visto che pur effettuando un lavaggio al termine della deposizione, i legami deboli che si formano tra DNA e oro non vengono eliminati [Herne and Tarlov, 1997; Lao et al., 2005; Petrovykh et al., 2003].

Questo fenomeno risulta molto più accentuato all'aumentare della lunghezza dei nucleotidi che compongono il SAM. Infatti sempre Steel ed i suoi collaboratori, hanno osservato che molecole corte di DNA possiedono una struttura più rigida e quindi favoriscono l'adsorbimento tramite il gruppo tiolo. Aumentando la lunghezza invece si accentua sempre più la natura polimerica dell'oligonucleotide; in questa situazione le interazioni non specifiche aumentano determinando una minore densità di molecole sulla superficie e quindi un minor ordine e compattamento del SAM. [Steel et al., 2000].

Il secondo tra i principali ostacoli per la realizzazione di SAM ordinati e compatti di DNA risiede nella presenza dei gruppi fosfato lungo la catena di DNA. Infatti, a differenza di un SAM costituito da alcanotoli a lunga catena [Finklea et al., 1987], in cui le interazioni di van der Waals fra le catene laterali favoriscono il compattamento del monostato, tra gli oligonucleotidi adiacenti di un SAM di DNA si instaura invece una repulsione elettrostatica non trascurabile.

Per ottenere monostati di DNA ad alta densità è quindi necessario riuscire a schermare queste cariche negative. Diversi gruppi di ricerca si sono impegnati a definire quali siano le condizioni necessarie per raggiungere una maggiore copertura e, cosa più importante, le

condizioni migliori per determinare l'orientamento ideale delle molecole in relazione all'evento di ibridizzazione.

Herne e Tarlov [Herne and Tarlov, 1997], lavorando con oligonucleotidi a singolo filamento, hanno osservato che condizioni di alta forza ionica, ottenute utilizzando soluzioni di KH_2PO_4 con concentrazioni maggiori di 0.4 M, consentono di ottenere una buona copertura della superficie d'oro. In queste condizioni infatti, le cariche negative dei fosfati vengono maggiormente schermate dai controioni (in questo caso K^+) presenti in soluzione [Petrovykh et al., 2003].

Anche la valenza del catione presente nel buffer influenza la densità del monostrato; un catione bivalente infatti consente di aumentare l'effetto di schermatura tra i filamenti di DNA carichi negativamente, diminuendo le interazioni repulsive, e perciò ottenendo una maggiore densità di probe. Sembra inoltre che la valenza del catione abbia maggior impatto sulla variazione di densità rispetto alla concentrazione del catione; Petrovykh e collaboratori infatti, utilizzando un catione bivalente piuttosto che uno monovalente, osservano un aumento superiore al 100% nella densità del SAM. [Petrovykh et al., 2003].

Altri gruppi di ricerca si sono concentrati invece su come poter sfruttare questa particolare caratteristica del DNA. Era già noto che la deposizione di alcanotioli poteva essere resa molto più veloce applicando all'elettrodo un potenziale anodico, ma non solo: applicando un potenziale è possibile per esempio controllare con buona precisione la composizione di un SAM misto composto da C_{16}SH e $\text{HSC}_{15}\text{CO}_2\text{H}$ [Ma and Lennox, 2000].

Allo stesso modo è possibile applicare questa strategia agli oligonucleotidi. Infatti l'applicazione di un potenziale negativo tende a rallentare se non a impedire la deposizione delle molecole di DNA sulla superficie, proprio a causa della repulsione elettrostatica tra l'elettrodo e i gruppi fosfato; al contrario, un potenziale positivo accelera di molto la loro deposizione [Ge et al., 2003]. In questo modo è possibile controllare l'orientamento del DNA immobilizzato sulla superficie. Per esempio Wackerbarth e collaboratori [Wackerbarth et al., 2004] hanno osservato come l'applicazione di un potenziale negativo a un monostrato di

oligonucleotidi consenta non solo di modificarne l'orientamento rispetto alla superficie, ma anche di mantenere tale orientamento nel tempo.

Alcuni ricercatori hanno pensato di risolvere il problema della repulsione elettrostatica utilizzando i “*peptide nucleic acid*” (PNA) come probe in biosensori a DNA [Wang et al., 1996]. I PNA sono analoghi del DNA in cui lo scheletro costituito dall'alternanza di zucchero e fosfato viene sostituito da una struttura “peptide-like” che consiste in unità ripetute di N-(2-aminoetil) glicina tenute assieme da legami peptidici. Oltre ad essere una molecola sostanzialmente neutra (grazie all'assenza dei fosfati), le modifiche apportate non modificano la disposizione spaziale dei nucleotidi, e ciò rende i PNA perfettamente in grado di ibridizzare con una sequenza di DNA complementare. Non solo, la stabilità dell'ibrido DNA-PNA è indipendente dalla concentrazione salina del buffer di ibridizzazione (Orum et al., 1995), e l'assenza di cariche lungo la molecola determina la mancata di repulsione elettrostatica tra il PNA e il DNA, e quindi una maggior stabilità termica dell'ibrido PNA-DNA.

Nonostante esistano numerose incongruenze riguardanti l'efficienza di ibridizzazione relativa alle diverse strategie appena citate, è ampiamente riconosciuto che uno degli aspetti che caratterizza l'evento di ibridizzazione riguarda la densità degli oligonucleotidi sulla superficie. Il motivo principale di ciò deriva, molto probabilmente, dall'ingombro sterico e dalla repulsione elettrostatica che diventano sempre più rilevanti con l'aumentare della densità [Peterson et al., 2001].

Gli stessi ricercatori hanno sottolineato come l'evento di ibridizzazione sia condizionato anche dalla presenza di mismatch e dalla posizione in cui si realizza l'ibridizzazione rispetto alla superficie. In questi esperimenti, che sto per citare, vengono utilizzati probe di 25 nucleotidi e vengono studiate le cinetiche di ibridazione relative a due target di 18 nucleotidi: uno dei target è complementare alle prime 18 basi del probe, mentre l'altro è complementare alle ultime 18 basi. Quello che osservano è che quando il probe è fissato a una superficie i due target ibridizzano con una cinetica differente, questa differenza dipende dalla regione del probe coinvolta nella formazione del duplex. Si è osservato che l'efficienza di ibridizzazione,

almeno nelle prime fasi, è maggiore per il target che ibridizza con la porzione superiore del probe rispetto all'altro target che invece ibridizza in prossimità della superficie.

Infine, un altro aspetto interessante mostrato dagli stessi ricercatori [Heaton et al., 2001] è la possibilità di controllare l'evento di ibridizzazione applicando diversi potenziali alla superficie d'oro. L'applicazione di un potenziale positivo (+300mV) è in grado di aumentare il tasso di ibridizzazione sia per filamenti complementari che in presenza di un mismatch, rispetto ad una un'ibridizzazione "passiva". La cosa più interessante però è che questo aumento di ibridizzazione è maggiore nel caso del target che presenta un mismatch. Al contrario, l'applicazione di un potenziale repulsivo (-300mV), porta a un notevole rallentamento dell'ibridizzazione.

Nella mia attività di ricerca sono stati depositati sulla superficie degli oligonucleotidi corti (20 nucleotidi) e le soluzioni precedentemente elencate, per evitare le interazioni aspecifiche con il substrato che la repulsione tra gli scheletri fosfodiesterici degli oligonucleotidi immobilizzati sulla superficie.

2.4 Metodi elettrochimici utilizzati per lo studio e lo sviluppo di un biosensore per la rilevazione di DNA su elettrodi in oro

Parte della seguente tesi ha riguardato lo sviluppo di un biosensore elettrochimico "semplificato" su elettrodi in oro, per la rilevazione di DNA all'interno delle acque degli acquedotti. Per far ciò, oltre ad utilizzare tecniche elettrochimiche classiche per la caratterizzazione e lo sviluppo del biosensore (viste in parte nei prossimi paragrafi), sono stati studiati, confermati e ottimizzati metodi innovativi alla base della logica di rilevazione del biosensore, che ne permette il facile utilizzo, la facile fabbricazione, il mantenimento delle prestazioni e la possibilità di eseguire più di una misura significativa su di un biosensore.

2.4.1 Celle elettrochimiche a tre elettrodi

Non è possibile misurare la differenza di potenziale attraverso l'interfaccia tra l'elettrodo e la soluzione. È invece possibile misurare la differenza di potenziale tra un sistema di interfacce, utilizzando un sistema elettrochimico, o cella elettrochimica, costituito da almeno due elementi conduttori immersi in una soluzione elettrolitica.

La maggior parte delle analisi elettrochimiche vengono eseguite tramite l'impiego di un sistema a tre elettrodi. L'elettrodo sul quale si esegue l'analisi è detto elettrodo di lavoro (o *working electrode*, WE) accoppiato con un altro elettrodo di potenziale noto che viene definito elettrodo di riferimento (o *reference electrode*, RE). Il terzo elettrodo è definito controelettrodo (o *counter electrode*, CE) ed è utilizzato con il solo scopo di permettere il passaggio di corrente attraverso l'elettrodo di lavoro. In generale questo tipo di elettrodi sono sostanzialmente inerti, come per esempio platino o grafite, in quanto non devono interferire con le reazioni che avvengono sull'elettrodo di lavoro. A livello di tale elettrodo, si possono distinguere due diversi processi: faradici e non faradici. Uno comprende tutte quelle reazioni in cui delle cariche (elettroni per esempio) vengono trasferite attraverso l'interfaccia elettrodo-soluzione. Dato che queste reazioni sono governate dalla legge di Faraday, sono spesso definite processi faradici. In alcuni casi, per esempio durante eventi di adsorbimento o desorbimento, si possono verificare dei cambiamenti nel potenziale, nell'area dell'elettrodo o nella composizione della soluzione. I processi che causano ciò sono detti non faradici. Benché non ci siano cariche che attraversano l'interfaccia elettrodo soluzione, quando si verificano questi processi è possibile che si generino correnti, spesso transienti (Bard and Faulkner, 2001).

2.4.2 Voltammetria ciclica

Un esperimento di voltammetria ciclica rientra tra i metodi potenziometrici in quanto si

applica un potenziale al sistema, e si misura la corrente faradica risultante. Il potenziale applicato varia nel tempo, passando da un valore iniziale (E_0) a un valore limite (E_F) (Figura 2.1a). Una volta raggiunto questo valore (spesso è definito *Potenziale di inversione*), la direzione della scansione di potenziale viene invertita, e il medesimo intervallo di potenziale viene scansionato ma nella direzione opposta (da E_F a E_0).

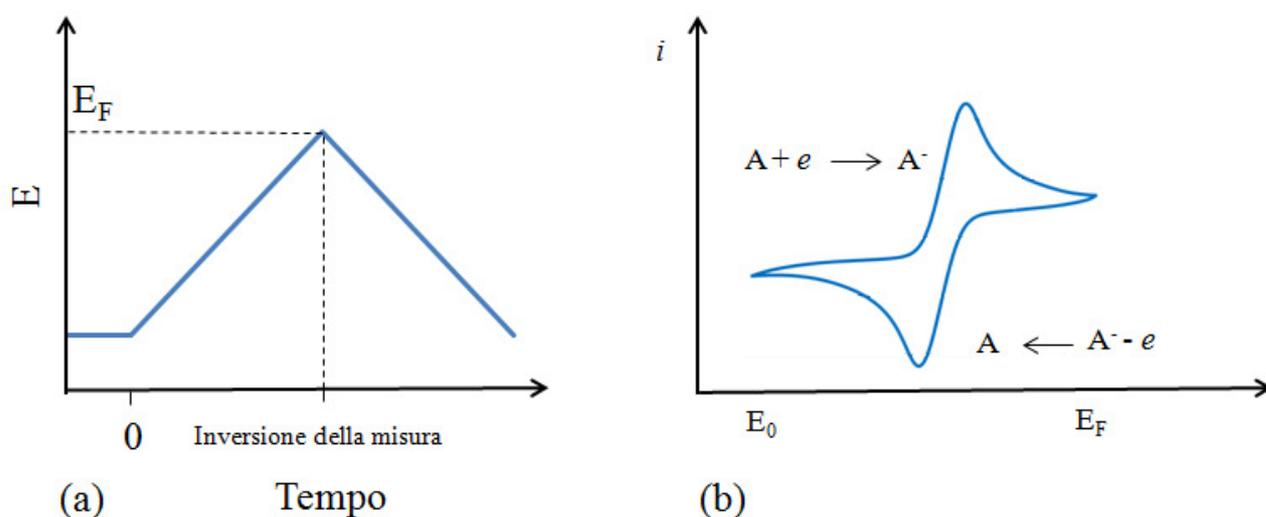


Figura 2.1: Voltammetria ciclica o ciclovoltammetria: (a) variazione di potenziale in funzione del tempo in un esperimento di voltammetria ciclica e (b) conseguente passaggio di corrente attraverso l'elettrodo in seguito a eventi di ossidoriduzione.

In questo modo è possibile ottenere diverse informazioni riguardanti potenziali di ossidoriduzione dei composti analizzati. Come mostrato dalla figura 2.1b, la prima scansione (da E_0 a E_F) produce un picco di corrente che corrisponde alla riduzione di un analita che può essere ridotto in quell'intervallo di potenziale. La corrente raggiunge il suo valore massimo in corrispondenza del potenziale di riduzione dell'analita, e successivamente diminuisce a causa della progressiva diminuzione di analita in prossimità dell'elettrodo. Quando viene invertita la direzione della scansione, si raggiunge un valore di potenziale in cui viene riossidato il

prodotto della precedente reazione di riduzione, producendo una corrente di polarità inversa rispetto alla scansione precedente (a meno che l'analita non rimanga irreversibilmente ridotto, grazie alle sue proprietà chimico-fisiche).

Gli esperimenti di voltammetria ciclica sono spesso condotti con una molecola redox in soluzione (ad esempio $K_3Fe(CN)_6$ o RuHex). Questa tecnica, soprattutto grazie alla sua relativa semplicità di esecuzione, è impiegata come analisi preliminare per determinare la qualità del SAM (Lao et al., 2005; Berggren et al., 1999; Steel et al., 1998).

2.4.3 Voltammetria Lineare

La voltammetria lineare è simile e concettualmente uguale alla voltammetria ciclica ma con la sola differenza che una volta arrivata alla fine della differenza di potenziale applicata (E_F), questa non si inverte ma semplicemente finisce la misura, riducendo o ossidando l'analita scelto, in base al potenziale applicato (Figura 2.2 a,b).

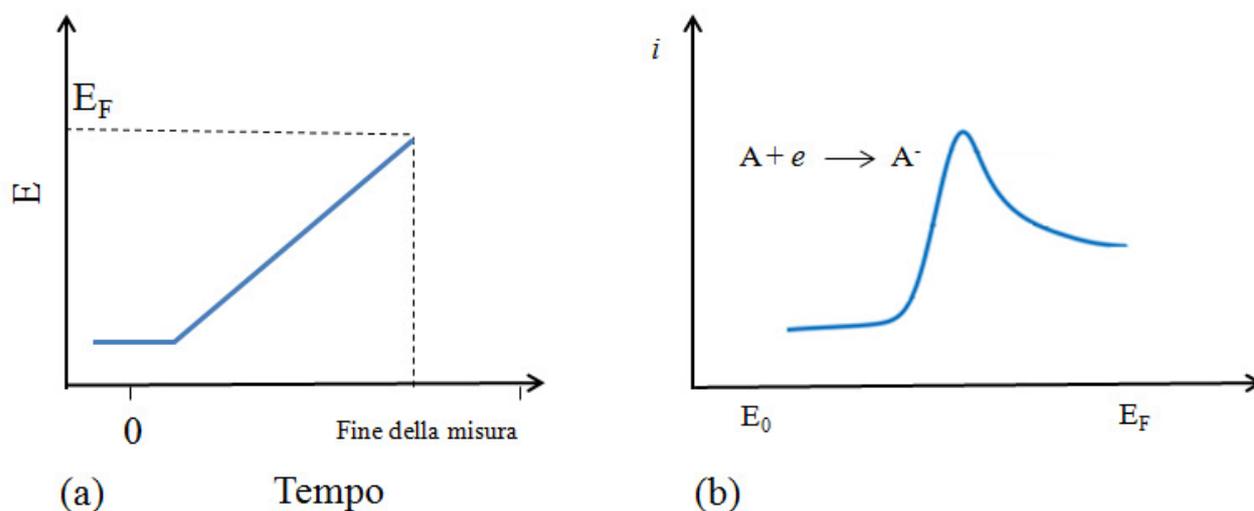


Figura 2.2: (a) variazione di potenziale in funzione del tempo in un esperimento di voltammetria lineare e (b) conseguente passaggio di corrente attraverso l'elettrodo in seguito a eventi di ossidoriduzione.

2.4.4 Colorante elettrochimicamente attivo per la rilevazione di DNA sulla superficie : HOECHST 33258

L'Hoechst 33258, 2'-(4-idrossifenil)-5-[5-(4-metilpiperazina-1-yl)benzimidazo-2-yl]bezimidazolo (Figura 2.3), è un bis-(benzimidazolo) sintetico derivato dalla ricerca dell'Hoechst Pharmaceutical Company [Salpse et al., 1997]. Fino dagli inizi del 1970, molti ricercatori si sono interessati a plurimi utilizzi di questa molecola.

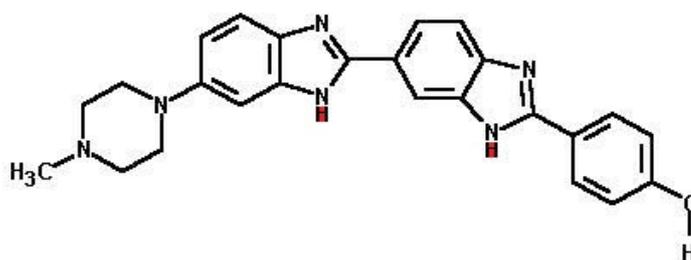


Figura 2.3: 2'-(4-idrossifenil)-5-[5-(4-metilpiperazina-1-yl)benzimidazo-2-yl]bezimidazolo, colorante utilizzato per lo rilevazione dell'avvenuta ibridizzazione del DNA sulla superficie del biosensore studiato in parte di questa tesi.

Tale colorante inizialmente è stato ampiamente utilizzato come marcatore fluorescente del DNA [Bontemps et al., 1975, Ellwart et al., 1990]. HOECHST 33258 infatti permette di produrre immagini molto luminose del DNA cromosomale con alto contrasto dovuta alla minima interferenza data dal legame del colorante con altri componenti cellulari. Tale colorante è utilizzato anche per la visualizzazione del DNA appena sintetizzato in quanto la fluorescenza dell' HOECHST è quenziata dalla 5-bromouridina che è incorporata all'interno dei cromosomi [Latte t al., 1975]. Questo colorante è stato spesso utilizzato anche per determinare la presenza di singolo o doppio filamento di DNA in base all'innalzamento dell'intensità di fluorescenza indotto dai legami tra di esso e gli acidi nucleici, singoli o legati [Downs et al., 1983, Cesarone et al, 1979]. Recentemente invece, Kobayashi ed i suoi collaboratori hanno studiato un nuovo metodo elettrochimico per la quantificazione d'ibridizzazione del DNA, utilizzando le proprietà di ossido-riduzione del colorante

[Kobayashi et al., 2004]. Infatti l'HOECHST 33258 viene ossidato da potenziali attorno i 470 mV, cedendo elettroni dagli azoti degli anelli imidazolici permette di rilevare la possibile ibridizzazione del DNA, in quanto esso si lega maggiormente al doppio filamento rispetto che al singolo filamento. È stato inoltre riportato in letteratura che tale colorante ed i suoi derivati provvedono ad una significativa protezione contro la rottura dei filamenti di DNA indotti da radiazioni, senza provocare effetti indesiderati nella struttura dell'acido nucleico [Danison et al., 1992, Adhikary et al., 1997]. In altri lavori, è stata studiata invece la specifica affinità di legame dell'HOECHST alla struttura di DNA singolo e doppio filamento ed le diverse conformazioni che quest'ultimo può assumere.

È stato indagato come tale colorante, legni fortemente il solco minore del DNA (struttura formata solo nel caso di DNA a doppio strato) ed in particolare nelle regioni ricche di adenina e timina [Weisblum et al., 1974, Latt et Wohlled, 1975]. Tale interazioni infatti è resa molto stabile da forze di van der Waals e da legami ad idrogeno. Altri studi invece hanno mostrato come l'HOECHST interagisce debolmente con lo scheletro fosfodiesterico del DNA, andando quindi a legare non solo il doppio filamento di DNA ma anche, in maniera più blanda, quello singolo [Muller et al., 1975]. Maiti ed i suoi collaboratori hanno riportato che l'HOECHST ha inoltre una moderata affinità con le strutture di DNA chiamate G-quadruplex (sequenze di acidi nucleici ricche di guanina capaci di formare strutture a 4 filamenti), permettendo quindi di studiare le formazioni e la rilevazione di tali strutture mediante l'uso del colorante sopracitato [Maiti et al., 2003].

2.4.5 Utilizzo di nano strutture auto assemblanti per la rilevazione di DNA sulle superfici dei biosensori

Molti dei progressi recenti raggiunti nell'ambito dell'amplificazione molecolare sono stati ottenuti grazie all'applicazione di principi che appartengono alle nanobiotecnologie. In particolare uno degli obiettivi è quello di applicare le scoperte delle nanotecnologie alla ricerca biomedica, ambientale ed industriale. È altresì importante il contributo fornito dalle nanotecnologie alle ricerche sugli acidi nucleici. Quest'area di ricerca ha applicato tecnologie

innovative allo studio degli acidi nucleici (ad esempio la microscopia a forza atomica) ed ha impiegato le molecole di DNA come “*building blocks*” per lo sviluppo di nanostrutture autoassemblanti. Tali strutture sono state anche utilizzate per l’ottimizzazione e per l’aumentare l’efficienza di diverse tipologie di Biosensori a DNA.

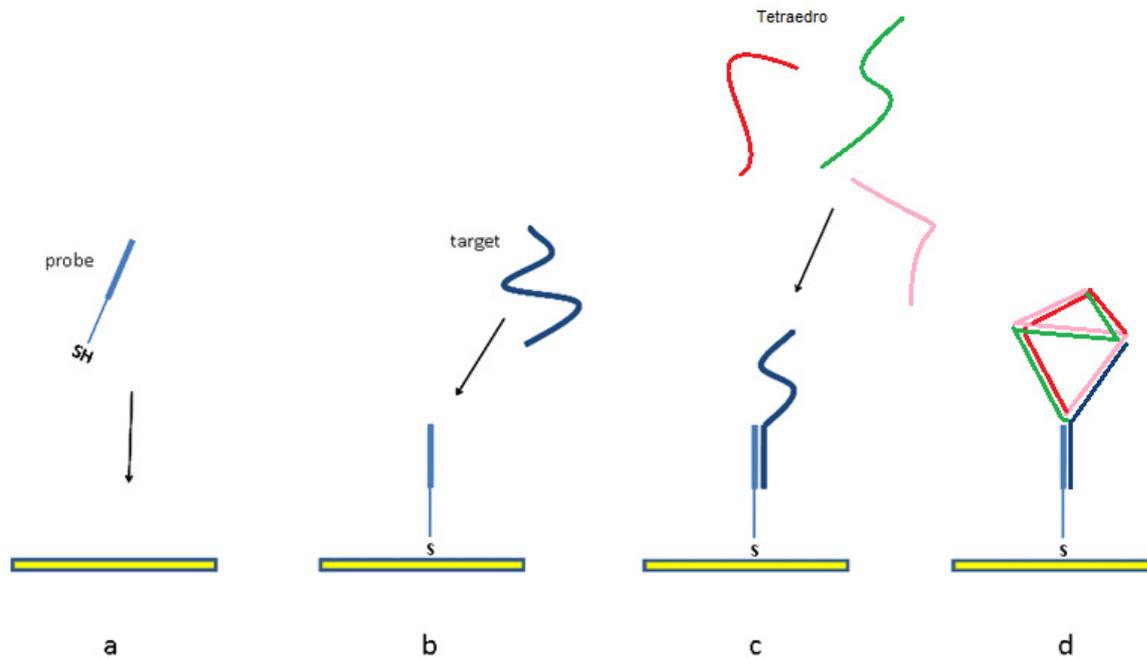


Figura 2.4: In seguito alla formazione del SAM composto dagli oligonucleotidi tiolati (a) si aggiunge il target (b) e successivamente gli oligonucleotidi componenti il tetraedro (c). Successivamente è possibile effettuare la misura elettrochimica(d).

Tra questi sistemi possiamo trovare la formazione di strutture tridimensionali discrete sulla superficie del biosensore (tra cui tetraedri e cubi e ottaedri) (Figura 2.4) [Goodman et al., 2005], l’utilizzo sulla stessa della HCR (reazione di ibridizzazione a catena) (Figura 2.5) o della RSA (amplificazione ciclica rotolante). Tutti questi sistemi, una volta innescati dall’iniziale riconoscimento da parte del sistema dell’oligonucleotide scelto come analita, permettono l’aumento della mole di materiale genetico da rilevare sulla superficie del biosensore permettendo la rilevazione quantità di analita esigue.

In letteratura si trovano molti esempi di utilizzo di strutture tridimensionali discrete. In particolare vengono utilizzate strutture come il tetraedro (Figura 2.4) in quanto si autolassembla facilmente e forma una struttura compatta che si completa ad una distanza trascurabile dalla superficie. Questo permette l'utilizzo di metodologie elettrochimiche di rilevazione, tra cui quelle riguardanti lo scambio di correnti faradiche tra i coloranti redox e la superficie dell'elettrodo del biosensore.

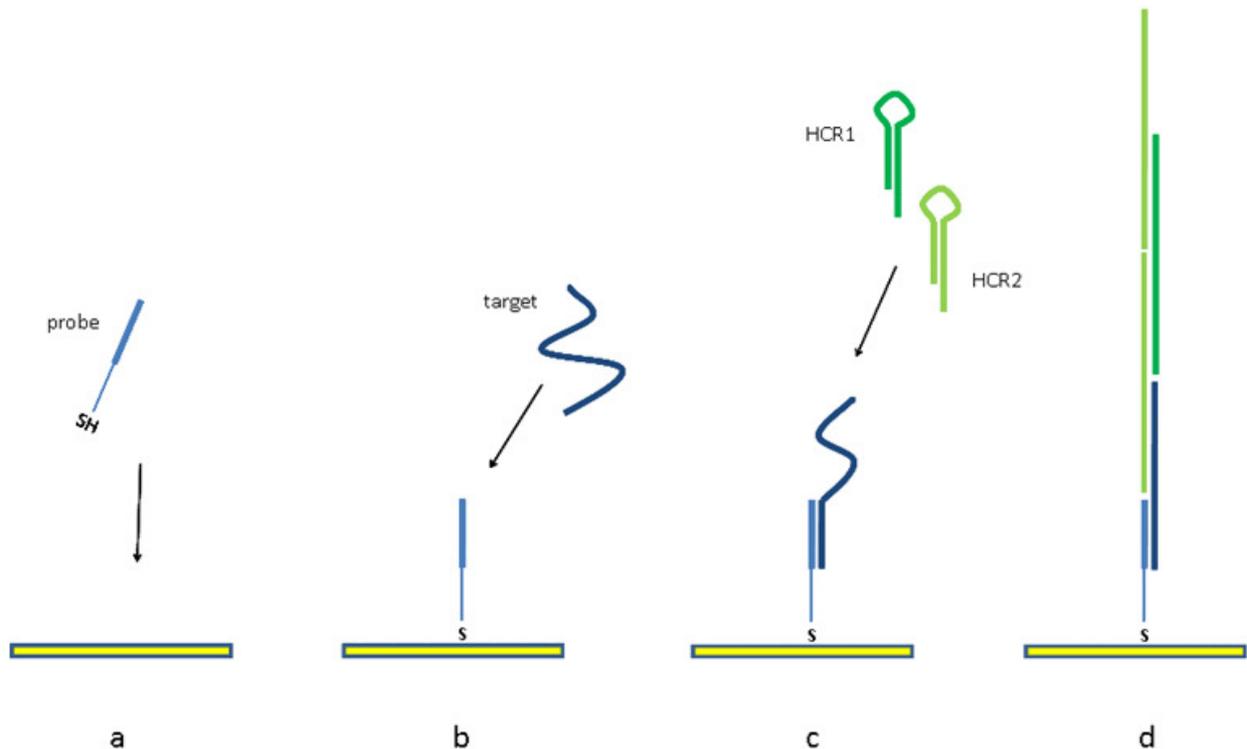


Figura 2.5: In seguito alla formazione del SAM composto dagli oligonucleotidi tiolati (a) si aggiunge il target (b) e successivamente gli oligonucleotidi componenti l'HCR (struttura a forcina) (c). A questo punto è possibile effettuare la misura elettrochimica(d).

Tra i sistemi elencati precedentemente vi è il metodo dell'HCR. Tale processo molecolare prevede l'utilizzo di due diverse molecole di DNA con struttura a forcina (H1 e H2) (Figura 2.5a). Nei *molecular beacon*, le sequenze possiedono delle regioni alle estremità complementari tra loro che sono responsabili della struttura a forcina. Tra di esse è presente un'ansa molto ampia e la regione a doppia elica è molto corta. Nell'HCR, al contrario, sono infatti delle anse molto ristrette protette da porzioni a doppia elica lunghe.

Queste strutture consentono di stabilizzare H1 e H2 nella conformazione a forcina e allo stesso tempo permettono di immagazzinare l'energia che verrà rilasciata solo dopo l'aggiunta di un iniziatore (I), in questo caso il target. Una volta avvenuta l'ibridizzazione tra probe e target (Figura 2.5c), la parte non ibridizzata del target si lega a parte del filamento componente H1, portando all'apertura di quest'ultimo, con conseguente esposizione di una nuova estremità a singolo filamento (Figura 2.5d). Quest'ultima ibridizza con l'estremità libera di H2, aprendo la forcina e liberando un'estremità che è identica alla sequenza dell'iniziatore. Quindi ogni copia di iniziatore dà origine a una serie di eventi di ibridizzazione tra H1 e H2, portando alla formazione di una lunga sequenza a doppia elica (Figura 2.5d).

La reazione di polimerizzazione termina solo quando si esauriscono H1 o H2 e il peso molecolare del polimero è inversamente correlato alla concentrazione di iniziatore utilizzato.

Dirks e Pierce, che per primi hanno descritto questo sistema nel 2004 [Dirks and Pierce, 2004] hanno studiato i prodotti dell'HCR mediante elettroforesi su gel di agarosio e mediante fluorescenza. Nel loro articolo Dirks e Pierce propongono alcune possibili applicazioni in cui sfruttare l'HCR menzionando la possibilità di applicare questa strategia per sviluppare biosensori basati su aptameri di DNA o RNA. Oppure suggeriscono un possibile impiego dell'HCR nell'amplificazione del segnale di riconoscimento, ad esempio modificando il metodo e inserendo strutture ramificate per assicurare un'amplificazione di tipo esponenziale piuttosto che lineare.

La RSA (amplificazione ciclica rotolante) invece è un metodo semplice ed efficace che può essere utilizzato per la sintesi di lunghe molecole a singolo filamento di DNA. Questo metodo richiede la presenza contemporanea di tre elementi: uno stampo di DNA circolare a singolo filamento, una sequenza complementare a una regione del DNA circolare che funge da iniziatore per una DNA polimerasi con alta processività, il terzo elemento.

Tale sistema è molto utilizzato ed efficace [Blanco et al., 1989, Yoshimura et al., 2006] ma essendo un enzima fondamentale per il suo funzionamento, ed essendo quest'ultimo molto sensibile a variazioni ambientali e facilmente degradabile, è stato scelto di non utilizzare tale metodica per amplificare molecolarmente il segnale del sensore a DNA studiato.

CAPITOLO 3 - Rilevazione elettrochimica di ibridazione di DNA su un biochip planare a due elettrodi

3.1 Introduzione

Negli ultimi 20 anni, la ricerca sui biosensori ha seguito la via dell'economicità, della rapidità, della sensibilità, della parallelizzazione e dell'automatizzazione. Tale orientamento è stato causato dall'applicazione dei biosensori in diversi campi, tra cui la medicina personalizzata, il controllo ambientale, il controllo dei cibi ed agricolo e la sicurezza internazionale.

Sono infatti disponibili diverse strategie per la rilevazione di acidi nucleici di patogeni, usando biosensori e relative tecniche analitiche. Virus [Hashimoto et al. 1998], batteri [Zhang et al. 2010] [Sanvicens et al. 2009], protozoi [Wang et al. 1997] o altri organismi sono stati identificati e caratterizzati tramite la rilevazione dei loro acidi nucleici da parte dei biosensori.

Queste tecniche hanno inoltre delle buone potenzialità anche per la rilevazione di polimorfismi negli acidi nucleici e per le variazioni genetiche negli uomini. Una grande percentuale di biosensori per la rilevazione di oligonucleotidi è basata sull'immobilizzazione di analiti su superfici solide, all'interfaccia solido liquido. Tale riconoscimento molecolare è stato evidenziato tramite un vasto numero di metodi analitici tra cui quello elettrochimico [Wan et al. 2009], quello ottico [Parab et al. 2010], quello piezoelettrico [Hong et al. 2010], ed infine quello gravimetrico [Gabl et al. 2004].

La moderna microelettronica ha reso conveniente l'utilizzo di strategie elettrochimiche che possono condurre all'implementazione, all'economicità, alla miniaturizzazione, alla parallelizzazione, all'automatizzazione e alla sensibilità di dispositivi per la rilevazione di analiti [Cagnin et al. 2009]. Grazie alla forte base metodologica sviluppata per le tecniche elettrochimiche, ed all'ulteriore studio e miglioramento di esse, la trasposizione di queste competenze scientifiche verso lo sviluppo di biosensori è sempre più attuabile.

Nella prima parte del mio lavoro di tesi, mi sono occupato della rilevazione elettrochimica di DNA tramite un sensore a due elettrodi che sfrutta l'attività red-ox del colorante HOECHST 33258, già utilizzato con successo per questo scopo [Ahmed et al. 2009, Ahmed et al. 2010]. I due elettrodi in oro uguali permettono di effettuare due misure equivalenti dell'ammontare del DNA immobilizzato sulla superficie di quest'ultimi, mentre con il metodo classico, utilizzando un set-up a tre elettrodi, è possibile eseguire solamente una singola misura. Tale semplificazione apporta un vantaggio competitivo quando è necessaria una riduzione delle dimensioni del biosensore, quando lo si vuole inserire in un sistema microfluidico e quando si rende necessaria la rilevazione in parallelo di diversi DNA target su di un singolo biosensore. Tale metodo inoltre semplifica la fabbricazione riducendo ad un numero limitato le fasi di microfabbricazione, facilitando quindi un possibile ed economico sviluppo industriale. È possibile anche l'eventuale implementazione con schede portatili che vadano a sostituire la stazione elettrochimica di misura, portando sempre più verso la miniaturizzazione, alla disponibilità ed al semplice utilizzo di tale strumentazione.

Come già accennato precedentemente, L'HOECHST 33258 è un legante del solco minore del DNA a doppia elica ed è per questo che può discriminare la presenza sulle superfici del biosensore dei singoli o dei doppi filamenti di acido nucleico. L'HOECHST 33258, inoltre, ossida irreversibilmente a 470 mV vs Ag/AgCl, tramite l'ossidazione degli azoti degli anelli benzimidazolici [Sufen et al. 2002] fornendo una corrente anodica direttamente proporzionale alla quantità di colorante vicino all'elettrodo, e quindi legato al doppio filamento di DNA immobilizzato su di esso.

Parte del mio lavoro di tesi riguarda quindi lo sviluppo di tale biosensore elettrochimico a due elettrodi in oro, per la rilevazione di DNA tramite l'utilizzo dell'HOECHST 33258. In particolare lo scopo applicativo di tale biosensore è la rilevazione del patrimonio genetico di patogeni [in particolare giarida lamblia], all'interno delle acque degli acquedotti. Da come verrà mostrato nei risultati che seguono, tale sensore possiede una sensibilità di rilevazione dei filamenti di DNA comparabile a quella ottenuta con il setup standard a tre elettrodi.

3.2 Materiale e Metodi

Tutti i reagenti sono da Sigma-Aldrich se non diversamente specificato, e sono stati utilizzati come tali senza ulteriore purificazione.

3.2.1 Preparazione degli elettrodi d'oro

La superficie ultrapiatta in oro su cui sono stati effettuati gli studi di assorbimento superficiale dell'HOECHST 33258 e le misure con il DNA, è stata ottenuta tramite l'utilizzo di un filo d'oro (99,99% di purezza, 0,2 mm di diametro, Electron microscopy science, Hatfield, PA, U.S.A.) dopo un lavaggio con la soluzione piranha basica (3:1 v/v di soluzione concentrata di idrossido d'ammonio e 30% di perossidasi d'idrogeno).

Gli elettrodi d'oro per le misure con il DNA sono stati fabbricati con la tecnologia chiamata comunemente "template stripped gold" (TSG) [Hegner et al. 1993; Wagner et al. 1995]. 200 nm di oro ultrapuro (Electron microscopy science, 99,99%) sono stati evaporati in vuoto su un substrato di muscovite mica, da poco sfogliata, che era stata lasciata la notte precedentemente a 300°C in vuoto a 10^{-6} Torr.

Dopo il raffreddamento, sono stati incollati sulla superficie in oro dei supporti circolari di vetro con un diametro di 12 mm con EpoTek 377 (Epoxy Technology Inc., Billerica, MA, U.S.A.), fatta poi solidificare per 12 ore in stufa a 60°C. Prima dell'utilizzo delle superfici in oro, si toglie il vetrino dalla mica, esponendo così la superficie d'oro ultrapiatta ed ultrapulita. Per creare i due elettrodi su tale superficie, l'oro viene diviso in due parti tramite il raschiamento della superficie con una punta metallica affilata.

3.2.2 Cella microfluidica

La cella microfluidica è stata fabbricata tramite la polimerizzazione del PDMS (Polidimetilsiloxano, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA), in un apposito stampo, progettato e fabbricato in laboratorio. La cella che collega i due elettrodi in oro è stata realizzata con un canale a ponte tra i due, formando così un elettrodo di 1 mm^2 da entrambi le parti del TSG (vedi sopra).

Tale geometria permette di avere una piccola distanza (5 mm) ed un piccolo volume di soluzione ($2 \text{ }\mu\text{l}$) tra i due elettrodi (figura 3.1).

La cella a tre elettrodi è stata anch'essa costruita tramite la polimerizzazione del PDMS. Vi sono stati inseriti l'elettrodo di riferimento e il contro elettrodo nella cameretta di misura, a cui arrivano anche i tubi, uno di entrata ed uno di uscita, del sistema microfluidico. In questo caso è stata forzata la fabbricazione di una cella più grande con un volume di $21 \text{ }\mu\text{l}$ ed un area esposta dell'elettrodo di lavoro di 7 mm^2 .

3.2.3 Fabbricazione del filo Ag/AgCl utilizzato come elettrodo di riferimento

L'elettrodo di Ag/AgCl è stato fabbricato tramite l'immersione di un elettrodo di argento (99.99 % purezza, 0.25 mm diametro) in una soluzione 0,1 M di KCl ed imponendo una corrente di $2,5 \text{ mA/cm}^2$ con un galvanostato rispetto ad un elettrodo di platino. A diversi tempi di applicazione della corrente, corrispondono diversi spessori dello strato di cloruro. Per 1 cm di elettrodo, sono stati applicati $0,190 \text{ mA}$ di corrente per 2 minuti e 30 secondi per ottenere $1 \text{ }\mu\text{m}$ di spessore dello strato.

3.2.4 Misure elettrochimiche su superficie in oro

L'elettrodo d'oro è immerso in un beaker contenente $100 \text{ }\mu\text{M}$ di HOECHST 33258 in un buffer fosfato ($50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 100 mM NaCl , pH 7), insieme ad un

controelettrodo di grafite ed elettrodo di riferimento di Ag/AgCl, integrato all'interno del sistema.

Le voltammetrie cicliche sono state eseguite a 100 mV/s tra -0,2 e 0,8 V vs Ag/AgCl usando la stazione elettrochimica μ Autolab (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands) ed il software G-PES.

3.2.5 Funzionalizzazione dell'oro e trattamento con HOECHST 33258

I TSG sono stati derivatizzati con gli oligonucleotidi in accordo con il seguente protocollo. Una soluzione di oligonucleotidi modificati con tioli (probe) ad una concentrazione di 3 μ M (5'-SH-TTTTAGGTTGAGTTGGAGCA-3') è preparata in 50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl a pH 6.8. Dopo aver riscaldato la soluzione per 1 minuto a 90°C e lasciata in agitazione per 30 secondi, vengono messi circa 10 μ l di tale soluzione sulla superficie d'oro appena scoperta dallo strato di mica. Successivamente viene coperta con una Hybrislip™ [Sigma] e lasciata poi per una notte a temperatura ambiente in una cameretta umida. L'elettrodo viene poi risciacquato con 1 ml di H₂O millQ ultrapura (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) molto delicatamente per evitare il distaccamento dalla superficie del materiale genetico e successivamente viene asciugata sempre delicatamente con un flusso di Azoto gassoso.

L'incubazione con il DNA solubile da rilevare (target), viene eseguita dopo aver montato all'interno della cameretta microfluidica il TSG con il DNA probe immobilizzato sulla sua superficie. Vengono poi immessi circa 300 μ l di buffer di incubazione composto da 30 mM sodio citrato, 300 mM NaCl, a pH 7.0 con all'interno il target (5'-CCTCCAATGTATACAACTAGTTCTGCTCCAACCT-3') o il target utilizzato come controllo negativo, cioè non specifico alla sequenza probe (5'-AGGAAGAAGATGACGACCAGCTCAACGAGAAGGTCGCAG-3'). Alla fine dell'iniezione, il sistema viene fermato e lasciato a riposo per 30 minuti a temperatura ambiente, per permettere l'eventuale riconoscimento del target da parte del probe.

Successivamente vengono iniettati 500 μl di HOECHST 33258 100 μM in buffer fosfato (50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl , pH 7) e lasciato ad incubare per 5 minuti. Lo stesso buffer, senza colorante, viene utilizzato per il lavaggio dall'HOECHST 33258 che consiste in un passaggio di 1 ml di soluzione, e per le misure successive.

3.2.6 Misure elettrochimiche

La misura di voltammetria lineare a 2 e 3 elettrodi è stata eseguita tramite la stazione elettrochimica $\mu\text{Autolab}$ (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands) usando il software G-PES. Le misure a tre elettrodi sono state eseguite ad un potenziale di scansione che andava da 0,4 a 0,7 V vs Ag/AgCl. Nelle misure a due elettrodi invece, un elettrodo è connesso al contatto dell'elettrodo di lavoro della stazione elettrochimica mentre l'altro è connesso ai due contatti cortocircuitati di elettrodo di riferimento e di contro elettrodo. Nell'esperimento, la misura viene effettuata 4 volte ad un potenziale di scansione imposto da 0 a 1,4 V e successivamente vengono invertiti i contatti degli elettrodi per effettuare un altro set di misure.

3.3 Risultati e discussione

Il biosensore sviluppato all'inizio della mia attività di dottorato è un dispositivo che permette il rilevamento di singoli filamenti di DNA in soluzione, tramite il loro riconoscimento da parte di DNA complementare, immobilizzato sulla superficie degli elettrodi componenti il sensore stesso. Dopo il legame degli oligonucleotidi sulla superficie, viene effettuato un trattamento con HOECHST 33258, lavato con del buffer e successivamente sottoposto a voltammetria lineare per quantificare le molecole di colorante legate al DNA, e quindi quantificare la concentrazione di acidi nucleici ibridizzata sulla superficie, a sua volta proporzionale alla concentrazione di DNA target in sospensione.

La camera microfluidica è stata fabbricata per permettere l'esposizione alla soluzione di un'area di 1 mm^2 per ogni elettrodo di oro ultrapiatto. Gli elettrodi d'oro ultrapulito ed ultrapiatto ottenuti tramite la tecnologia del "template stripped gold", sono separati in due grandi aree tramite la rimozione meccanica di parte dell'oro dal substrato. La superficie viene poi funzionalizzata con gli oligonucleotidi probe: questo è ottenuto tramite l'esposizione per una notte della superficie in oro con $3 \mu\text{M}$ di soluzione di oligonucleotidi modificati con tioli [probe] della sequenza desiderata. Il disco d'oro funzionalizzato viene poi montato all'interno della camera microfluidica (figura 3.1) dove i due elettrodi potranno entrare in contatto con la soluzione di interesse introdotta all'interno del canale.

Questa cella è stata fabbricata in PDMS, i due elettrodi sono separati da una distanza di 5 mm e da un volume di soluzione circa di $2 \mu\text{l}$. In comparazione, è stata fabbricata una camera elettrochimica più larga, contenente due elettrodi (un contro elettrodo di platino ed un elettrodo di riferimento di Ag/AgCl), da montare sulla superficie d'oro ultrapiatto che funge da elettrodo di lavoro. Tale cella è utilizzata per paragonare le misure del sistema a due elettrodi, con il sistema convenzionale a tre elettrodi.

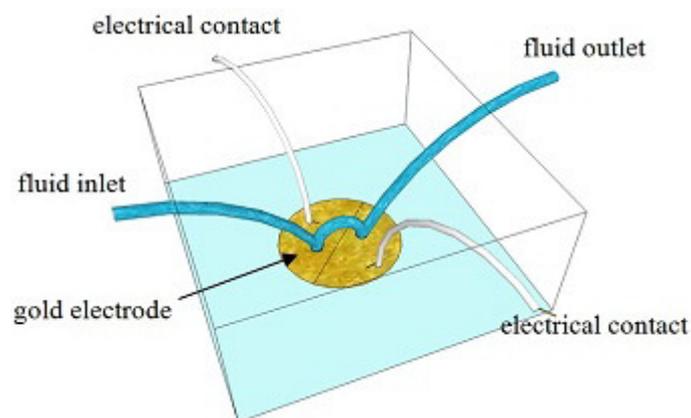


Figura 3.1: Schema dell'apparato microfluidico utilizzato per le misure. Un singolo canale fa fluire la soluzione su entrambe gli elettrodi utilizzati per la misura. I contatti elettrici sono collegati alle porzioni laterali dei relativi elettrodi non coinvolti nella porzione attiva del dispositivo.

3.3.1 Principio di Misura

Nella voltammetria, il potenziale è comunemente applicato all'elettrodo di lavoro, rispetto all'elettrodo di riferimento. Nel sistema invece a due elettrodi qui presentato, entrambi gli elettrodi in oro sono funzionalizzati con il DNA, e il potenziale dell'elettrodo che viene utilizzato come elettrodo di lavoro è controllato rispetto all'altro elettrodo, identico al primo, che funge contemporaneamente sia da riferimento che da contro elettrodo. La corrente fluisce tra i due elettrodi e viene misurata in funzione del potenziale imposto tra i due tramite una voltammetria lineare. Tale corrente è identificata come un picco d'ossidazione, dato dalla donazione di elettroni da parte degli azoti degli anelli benzimidazolici (Sufen et al. 2002) dell'HOECHST 33258. Tale picco si delinea rispetto alla corrente di background in modo simile a quello ottenuto con l'utilizzo di un sistema standard a tre elettrodi (Fig. 3.2a). La forma del voltammogramma è data da due fattori principali: il picco di corrente faradica dovuta all'ossidazione del HOECHST 33258, ed una corrente faradica esponenziale di background dovuta alla carica capacitiva ed a reazioni reversibili di altri elettroliti presenti all'interno della soluzione. Inoltre, se nel sistema standard la risposta è dovuta solo a ciò che avviene sull'elettrodo di lavoro, nel sistema semplificato a due elettrodi il potenziale applicato alla cella è ripartito su entrambe gli elettrodi, senza un diretto controllo del potenziale di lavoro, come mostrato in Figura 3.2b. Tale modello aiuta nell'interpretazione del segnale di risposta sperimentale, in particolare in rapporto a quello del sistema convenzionale a tre elettrodi. Come atteso, abbiamo osservato che nel caso di misure a due elettrodi il potenziale al quale l'HOECHST inizia ad ossidare è circa il doppio del corrispondente potenziale estrapolato della misura standard (Fig. 3.2a).

di lavoro è formato dal parallelo tra l'impedenza di background $[Z_{BG}]$ e quella del colorante $[Z_H]$, a destra invece il riferimento-contro elettrodo può essere rappresentato dalla sola impedenza di background. La capacità di double layer $[C_{DL}]$ su entrambi gli elettrodi e la resistenza di bulk $[R_B]$ sono trascurabili.

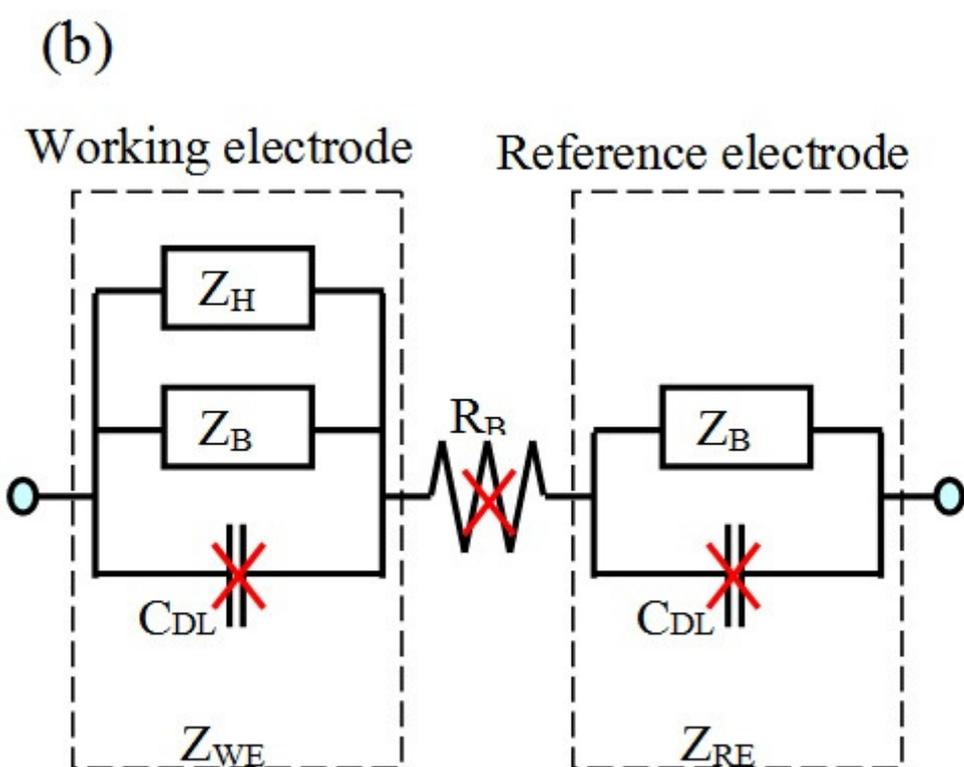
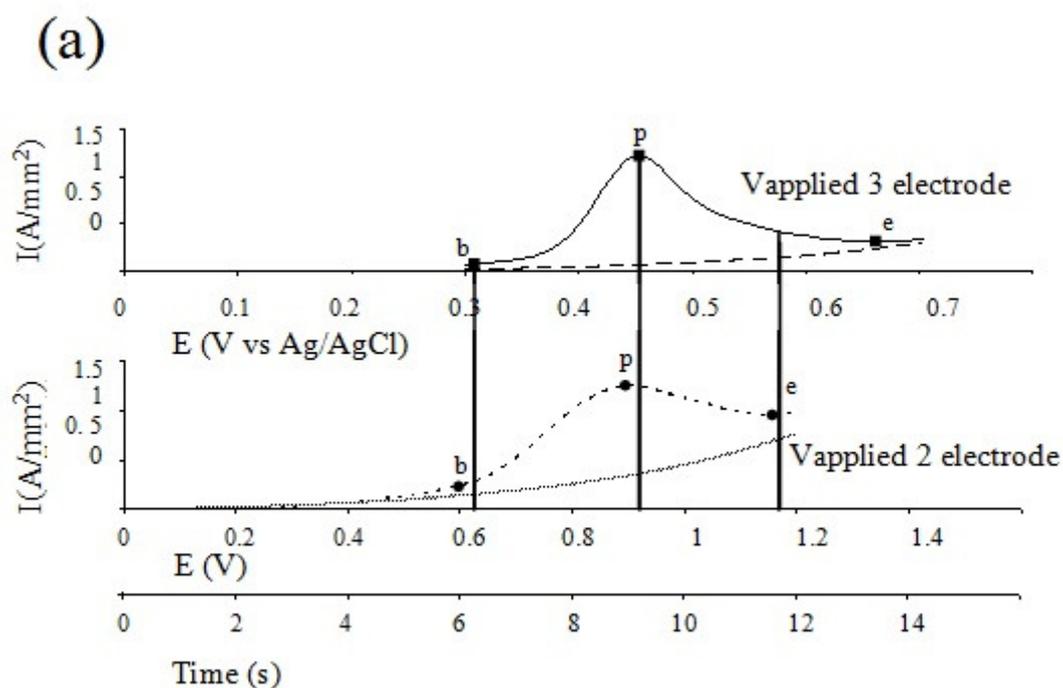


Figura 3.2: (a) Confronto tra la misura a tre e a due elettrodi su superfici in oro con HOECHST 33258. La figura evidenzia come il potenziale **b** alla base del picco di ossidazione nella misura a due elettrodi sia circa il doppio del potenziale rispettivo nella misura a tre elettrodi. La stessa considerazione può essere fatta per quanto riguarda il potenziale del picco di ossidazione **p**. (b) Modello equivalente del sistema a due elettrodi. A sinistra l'elettrodo

Questo può essere spiegato prendendo in considerazione che le impedenze nel modello equivalente sono complesse e soggette ad isteresi, in particolare l'impedenza del colorante Z_H , che rappresenta l'ossidazione dell'HOECHST, acquisisce un valore significativo solo ad un potenziale sufficientemente alto da ossidare la molecola [attorno ai 360 mV vs Ag/AgCl]. Nel modello semplificato a due elettrodi le reazioni reversibili generano la corrente di fondo che può essere rappresentata da impedenze equivalenti sui due elettrodi [Z_{BG}], mentre la capacità di doppio strato [C_{DL}] e la resistenza di bulk [R_B] sono state sperimentalmente viste essere trascurabili. Pertanto, ai potenziali dove non si verifica l'ossidazione dell'HOECHST, il sistema si approssima a due uguali impedenze di background [Z_{BG}] in serie, ed il potenziale applicato è equamente ripartito sui due elettrodi. Grazie a tale considerazione, è stato deciso di utilizzare una velocità di scansione doppia rispetto a quella utilizzata per le misure standard, per permettere di comparare le due.

Al fine di caratterizzare al meglio il segnale di fondo del nostro biosensore, abbiamo effettuato misure voltammetriche dopo aver esposto l'oro pulito all'HOECHST 33258, come da nostro protocollo di trattamento, ma senza DNA (ne probe, ne target). Tale esperimento porta alla determinazione della quantità massima di colorante che può legarsi alla superficie d'oro, ed anche se si prevede che il legame del colorante al SAM composto da oligonucleotidi sia completamente differente, misurazioni su oro nudo possono essere di riferimento. Una parte di superficie ultrapiatta in oro è stata immersa in 100 μ M di HOECHST 33258 insieme ad un filo di platino (controlettrodo) ed un elettrodo di riferimento integrato di Ag/AgCl. Una ciclovoltammetria standard è stata effettuata dopo due minuti di incubazione della superficie in oro all'interno della soluzione con il colorante. Il risultato è mostrato in figura 3.3.

Il picco di ossidazione è ben osservabile nel primo scan. Successivamente, anche se l'elettrodo viene costantemente riimmerso all'interno della soluzione di HOECHST 33258 e vengono continuamente eseguite delle ciclovoltammetrie, l'intensità di corrente diminuisce all'aumentare del numero di cicli, fino a diventare nulla, alla quarta scansione

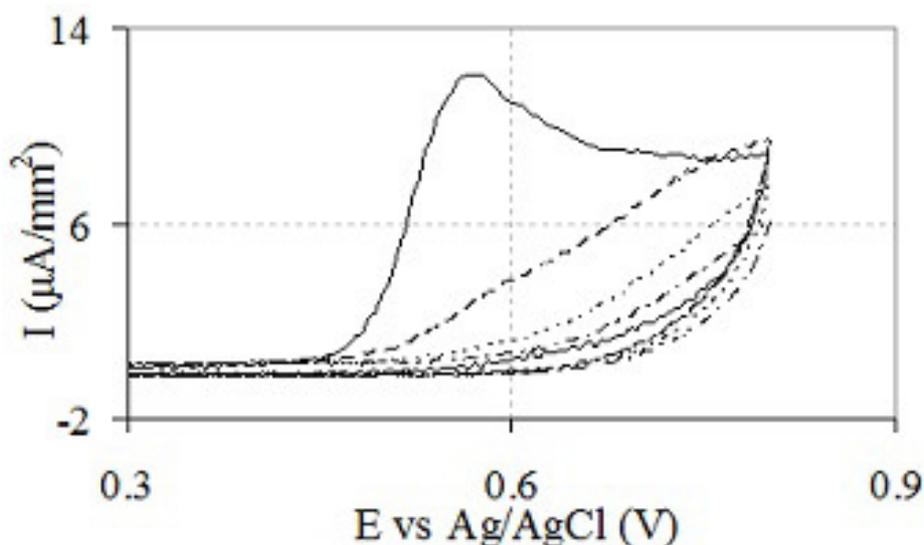


Figura 3.3: Quattro voltammetrie cicliche effettuate in sequenza su superfici in oro ultrapiatto esposto al colorante HOECHST 33258 100 µM. La progressiva riduzione della corrente anodica data dall'ossidazione del colorante è evidente con il crescere del numero dei cicli (primo ciclo: linea continua, secondo ciclo: linea tratteggio lungo, terzo ciclo: linea tratteggio corto, quarto ciclo: punto e linea). La misura è stata effettuata tramite un setup a tre elettrodi utilizzando come riferimento un elettrodo di Ag/AgCl integrato.

. Questo risultato mostra che l'HOECHST 33258 si lega all'oro e viene ossidato irreversibilmente, anche se alla prima scansione non copre tutta la superficie dell'elettrodo. Il colorante irreversibilmente legato e ossidato inibisce lo scambio di elettroni tra molecole di colorante solubili e l'elettrodo d'oro con il progredire delle scansioni; questo fenomeno si intensifica perché sempre più molecole irreversibilmente ossidate rimangono legate alla superficie d'oro. Questi risultati dimostrano che nella voltammetria sull'HOECHST 33258, la corrente anodica è realmente indicativa del colorante legato alla superficie o ad una certa distanza da essa, piuttosto che della concentrazione di molecole di colorante solubile all'interno dell'intera soluzione.

3.3.2 Voltammetria sugli elettrodi in oro funzionalizzati con oligonucleotidi

Voltammetrie cicliche a tre elettrodi e voltammetrie semplificate a due elettrodi sono state effettuate su superfici d'oro ultrapiatto funzionalizzate con oligonucleotidi, come convalida del metodo proposto. Gli elettrodi d'oro sono stati funzionalizzati con SAM di oligonucleotidi sfruttando le reazioni spontanee dei gruppi tiolo ridotti legati al DNA con la superficie d'oro [[Hashimoto et al. 1994]]. La superficie derivatizzata è stata esposta per 5 minuti a 100 μM di HOECHST 33258, lavata poi con i buffer di misura e successivamente analizzata tramite voltammetria lineare. I risultati delle voltammetrie lineari effettuate con il sistema standard e con quello a 2 elettrodi sono mostrati in figura 3.4

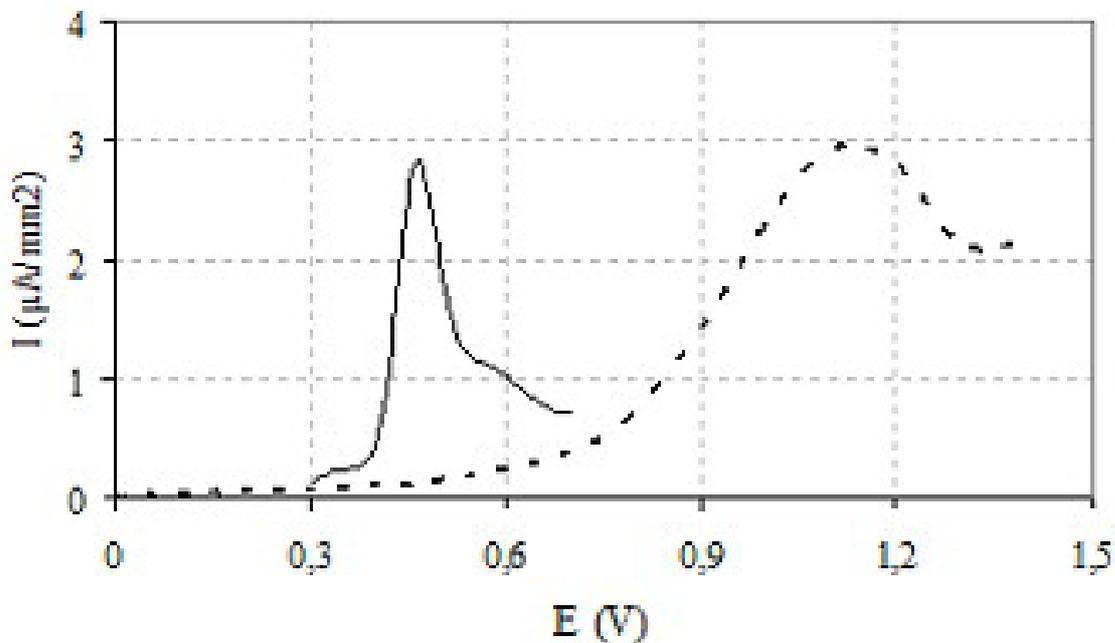


Figura 3.4: Voltammetrie lineari ottenute dopo l'esposizione di superfici ultrapiatte funzionalizzate con DNA tiolato, esposte e successivamente lavate dall'HOECHST 33258. La traccia solida è il voltammogramma ottenuto con la cella a tre elettrodi (*vs.* Ag/AgCl reference), mentre la linea tratteggiata è quella ottenuta con la cella a due elettrodi. Le misure sono state effettuate in differenti celle microfluidiche esponendo aree differenti del campione. Per essere comparati i voltammogrammi rappresentati sono stati normalizzati per unità di area superficiale.

Nella misura del sistema a due elettrodi qui proposta, c'è uno spostamento del picco di potenziale verso alti potenziali (all'incirca il doppio rispetto al potenziale del picco ossidativo della misura a tre elettrodi) ed è evidente un ampliamento della sua forma. È bene sottolineare che applicare potenziali elevati porta ad un incremento del segnale di background dovuto alla superficie carica, ma il picco di ossidazione del colorante resta chiaramente evidente. Questo permette il suo utilizzo come segnale di rilevazione. La voltammetria lineare nel sistema a due elettrodi è stata effettuata al doppio della velocità di scansione rispetto a quella effettuata su quello a tre elettrodi, per le motivazioni esplicate nel paragrafo precedente. Inoltre, osservando le due curve, si può notare come il massimo del picco di corrente anodica registrata, corrisponda ad un amperaggio molto simile per entrambi i metodi di misura.

3.3.3 Elaborazione scansioni di potenziale multipli

Come notato precedentemente per le misure su oro nudo (vedi Figura 3.3), anche quando si misura la superficie trattata con DNA, si può osservare la presenza di corrente anodica. Questa è presente anche nelle misure successive alla prima, a dimostrazione del fatto che in queste condizioni non tutte le molecole di HOECHST 33258 vengono ossidate durante la prima scansione. Tale comportamento è particolarmente evidente ad alte concentrazioni di DNA target e quindi ad alte concentrazioni di colorante sulla superficie.

Come rappresentato in figura 3.5, le scansioni successive alla prima sono contraddistinte da una progressiva diminuzione di intensità di corrente, mentre le scansioni provenienti da esperimenti con concentrazioni più elevate di target mostrano correnti più elevate rispetto a quelle provenienti da concentrazioni di target più basse. Per cercare di tener conto di tutta la corrente faradica sprigionata dal colorante sulla superficie, sono state compiute quattro voltammetrie lineari per ogni campione da misurare: le prime tre scansioni vengono sommate per la quantificazione della corrente faradica causata dall'ossidazione dell'HOECHST 33258,

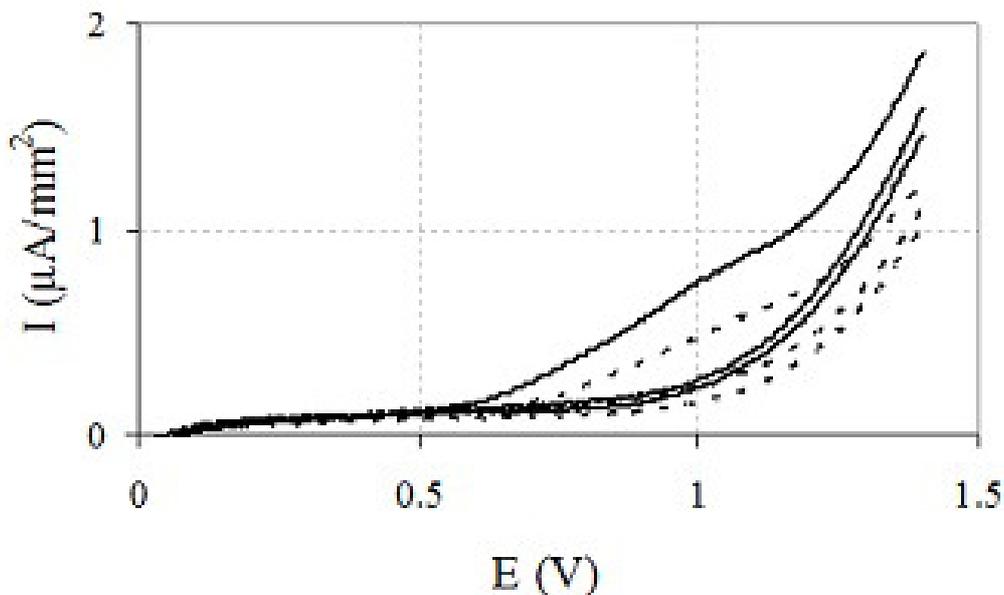


Figura 3.5: Esempio di tracce voltammetriche misurate dopo la prima misura (dalla seconda alla quarta) di un campione trattato con 100 nM di DNA target (linea solida) e di un campione trattato con 10 nM di DNA target (linea tratteggiata). In ogni esperimento, ad ogni scansione l'intensità di corrente raggiunta è minore rispetto alla precedente. È inoltre evidente che la scansione dopo la prima possiede ancora una parte di corrente faradica data dall'ossidazione del colorante. Si può sfruttare tale caratteristica per aumentare la sensibilità del dispositivo tramite l'elaborazione dei dati ottenuti.

mentre la quarta scansione viene utilizzata per la sottrazione di fondo secondo l'equazione A1. Per la determinazione del segnale di rilevamento si considera il valore della corrente corrispondente al picco di ossidazione ottenuto dall'elaborazione di queste quattro scansioni.

Equazione A1:

$$\text{Segnale di risposta} = \text{Max} (\text{Scan}_i + \text{Scan}_{ii} + \text{Scan}_{iii} - 3 * \text{Scan}_{iv})$$

3.3.4 Rilevazione di DNA in soluzione

Dopo aver verificato che il sistema a due elettrodi è in grado di registrare l'ossidazione dell'HOECHST 33258 in scansioni successive, il rivelamento dell'ibridizzazione del DNA è stato eseguito con lo stesso metodo. Utilizzando le celle microfluidiche, abbiamo standardizzato un protocollo di incubazione per l'ibridizzazione del DNA: un volume prefissato di DNA target è stato iniettato all'interno della cella microfluidica, a diretto contatto con la superficie funzionalizzata con gli oligonucleotidi complementari a quelli immobilizzati, e lasciata in incubazione per 30 minuti.

Prove di riproducibilità dell'ibridizzazione, della colorazione e della misura all'interno del nostro sistema sono riportate in figura 3.6. Nel grafico i voltammogrammi sovrapposti sono stati eseguiti su diversi dispositivi a due elettrodi per la rilevazione di DNA target presente in soluzione ad una concentrazione di 10 nM (linea nera). Si può notare come la variazione di segnale tra i diversi dispositivi, trattati con le stesse concentrazioni di target, sia trascurabile.

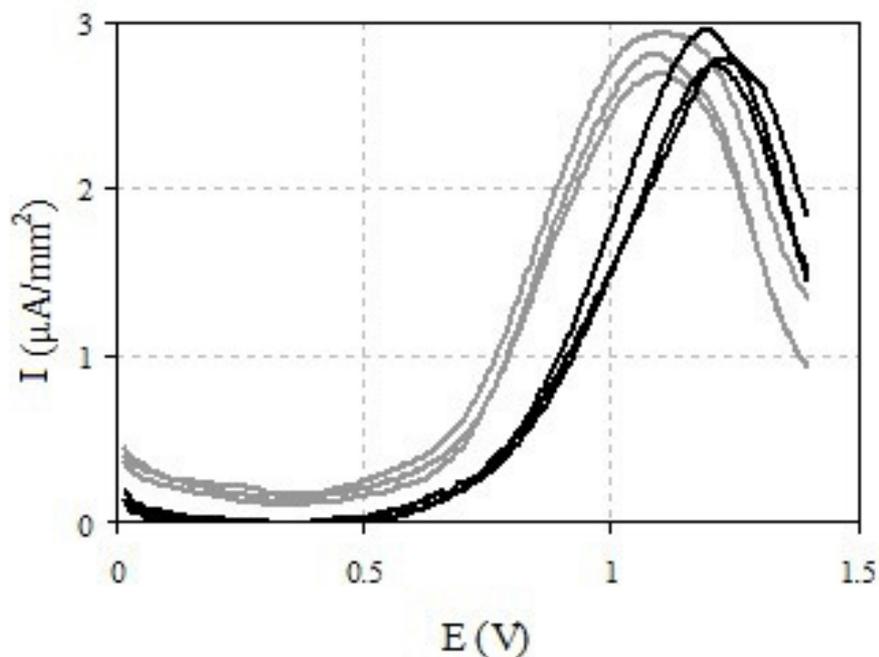


Figura 3.6: Comparazione tra elaborazioni di misure dirette (linea nera) e misure inverse (linea grigia) di tre diversi dispositivi risultanti dal rilevamento di target solubile ad una concentrazione di 10 nM.

Inoltre tale variazione è comparabile con le misure effettuate sempre su diversi dispositivi, fabbricati con i medesimi trattamenti superficiali ed analizzati con il sistema standard a tre elettrodi (Fig. 3.7). Questo dimostra quindi che tale metodo può essere facilmente impiegato per lo sviluppo di biosensori.

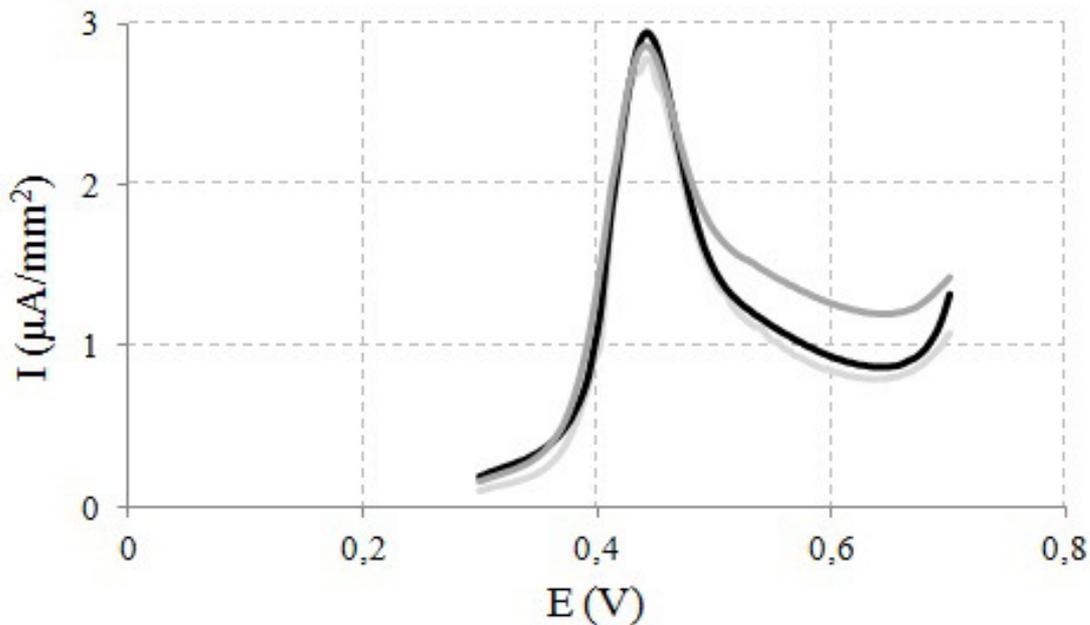


Figura 3.7: Comparazione tra misure di tre diversi dispositivi risultanti dal rilevamento di target solubile ad una concentrazione di 10 nM, misurate con un setup a tre elettrodi utilizzando come riferimento un elettrodo di Ag/AgCl integrato.

3.3.5 Due misure per ogni paio di elettrodi

Come dimostrato precedentemente, il legame dell'HOECHST 33258 è irreversibile, quindi è possibile effettuare l'analisi su un solo campione utilizzando una strumentazione standard a tre elettrodi. Tramite l'utilizzo del dispositivo a due elettrodi invece, a uno dei due elettrodi viene applicato un potenziale negativo (elettrodo di riferimento e contro elettrodo) che non porta all'ossidazione del colorante, cosa che avviene invece sull'elettrodo di lavoro a cui

invece viene applicato un potenziale positivo. Di conseguenza, dopo la prima misura, può essere sfruttata ancora la presenza del colorante ridotto che si trova sull'elettrodo a cui si è applicato il potenziale negativo nella prima misura. Invertendo quindi la funzione degli elettrodi si applica un potenziale positivo a quello che nella prima misura era il contro elettrodo, inducendo così l'ossidazione dell'HOECHST 33258 presente su di esso e quindi una seconda misura significativa utilizzando lo stesso dispositivo. Tali misure sono state chiamate rispettivamente misura diretta e misura inversa (poiché è stato invertito il significato funzionale degli elettrodi).

In figura 3.6 vengono mostrate le tracce delle misure dirette ed inverse effettuate su tre diversi dispositivi sottoposti ad analita contenente 10 nM di DNA target. Ogni traccia del grafico è il risultato della combinazione delle quattro scansioni effettuate su uno stesso campione, dove il background sperimentale è sottratto alla corrente di risposta, come descritto nella formula A1, vista in precedenza. La corrente corrispondente al picco di ossidazione risultante dalle misure inverse (linea grigia), è comparabile con quella risultante dalle misure dirette (linea nera); entrambe le misure mostrano una buona ripetibilità. Il vantaggio pratico della sovrapposizione quantitativa tra le misure inverse e quelle dirette, è la possibilità di avere un controllo incrociato ed una conferma dei risultati ottenuti con la prima misura, per compensare errori sperimentali e conseguentemente aumentare l'affidabilità del biosensore. In alternativa, funzionalizzando i due elettrodi con SAM di oligonucleotidi specifici per diversi target, le due misure potrebbero quantificare la presenza di due differenti acidi nucleici all'interno della stessa soluzione, permettendo così la rilevazione di più target sullo stesso dispositivo.

3.3.6 Risposta del biosensore a varie concentrazioni di target

Dopo aver studiato e caratterizzato il funzionamento del biosensore, è stata investigata la risposta dello stesso a diverse concentrazioni di target, per comparare la sua efficacia con quella dei dispositivi standard a tre elettrodi, utilizzando anch'essi HOECHST 33258. I risultati sperimentali sono mostrati in Figura 3.8 dove ogni punto sperimentale è dato dalla media di misure dirette di 6 diversi dispositivi sia per il set up a due elettrodi che per quello a tre. I

campioni analizzati sono costituiti da 3 differenti concentrazioni di target, un controllo negativo [100 nM di oligonucleotide non complementare alla sequenza immobilizzata sulla superficie] ed il bianco sperimentale [la soluzione senza target].

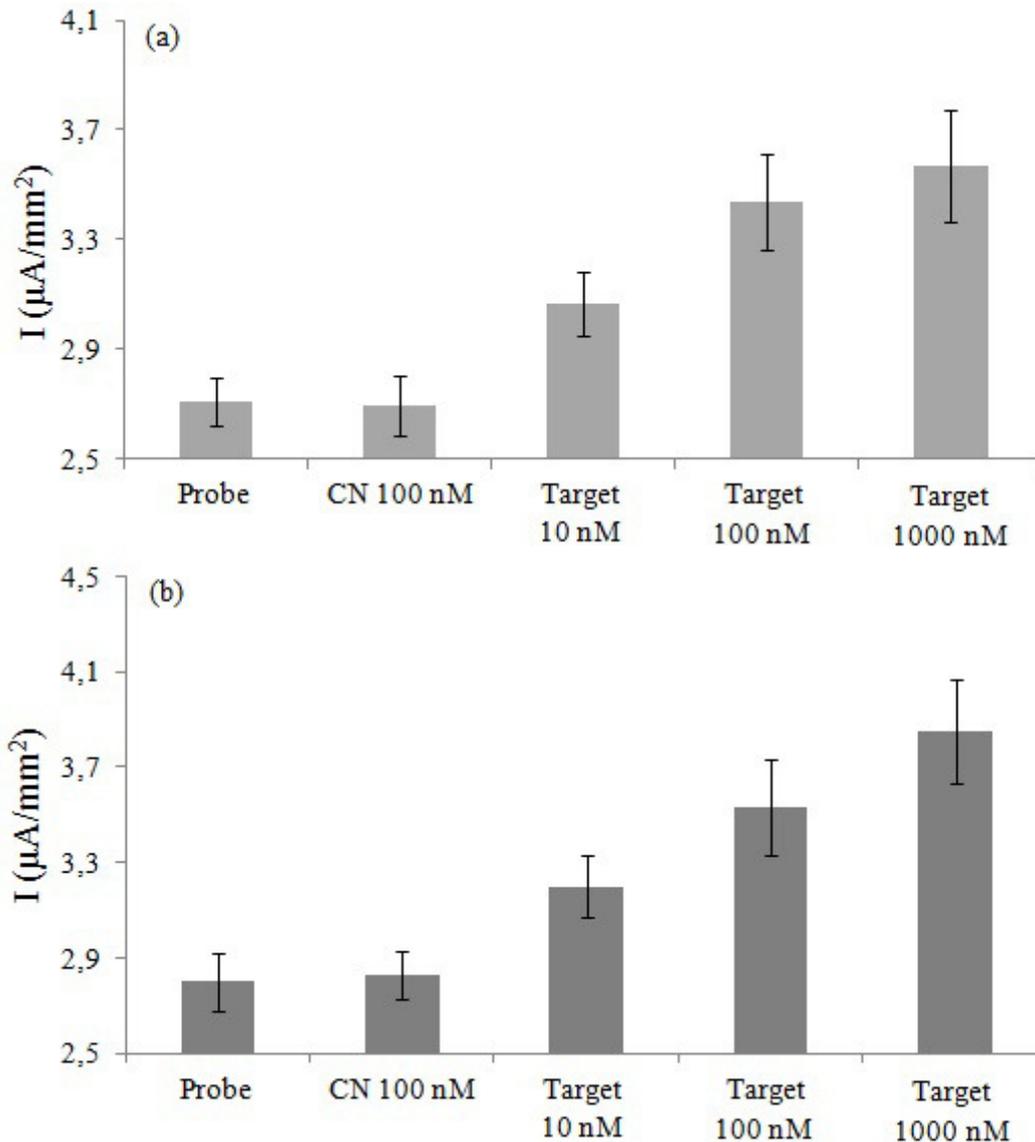


Figura 3.8: Comparazione tra la risposta del sistema a tre elettrodi (a) ed il sistema a due elettrodi (b) trattati con 3 diverse concentrazioni di target, un bianco (probe) ed un controllo negativo trattato con target non complementare alla sequenza immobilizzata sulla superficie (CN 100 nM).

Da come è mostrato nei grafici di figura 3.8, dove è visibile la comparazione tra la metodica standard e quella semplificata a due elettrodi, si possono notare diverse caratteristiche in comune tra le due metodiche. Infatti il dispositivo a due elettrodi si comporta in maniera proporzionale alla quantità di target con cui viene trattato come è osservabile anche nel metodo standard.

Entrambe le metodiche possiedono un limite di rilevamento della concentrazione di target dell'ordine di 10 nM , ed in entrambi i casi si può osservare come normalizzando le aree degli elettrodi, la densità di corrente analizzata è simile tra i due sistemi, rispetto al medesimo punto sperimentale visualizzato. In entrambi i sistemi inoltre la deviazione standard cresce al crescere della concentrazione, fenomeno atteso in quanto a maggiori concentrazioni di target vi è un aumento di interazioni aspecifiche.

In conclusione, è possibile affermare che il sistema semplificato a due elettrodi mediante l'utilizzo di HOECHST 33258 possiede le medesime prestazioni dei sistemi standard utilizzati con lo stesso colorante per la rilevazione di oligonucleotidi in soluzione, risultando inoltre più economico, più versatile ed avendo una maggiore possibilità di parallelizzazione e miniaturizzazione.

Per tali caratteristiche, nel prossimo capitolo sarà descritta l'ottimizzazione e lo studio focalizzato all'ambito della microfabbricazione industriale di tale biosensore elettrochimico a due elettrodi.

CAPITOLO 4 - Ottimizzazione e sviluppo su superfici microfabbricate del biochip a due elettrodi per la rilevazione di DNA

4.1 Introduzione

Per permettere lo sviluppo a livello industriale del biosensore discusso nel capitolo precedente, è stata trasferita la competenza ottenuta su dispositivi fabbricati all'interno del laboratorio (TSG) a dispositivi prodotti con tecnologie industriali di micro fabbricazione. Tale passo è stato eseguito per ottenere una maggiore parallelizzazione delle analisi compiute dal dispositivo, per ridurre i costi di produzione del biosensore, e per la portabilità e la miniaturizzazione dello stesso.

Per eseguire questo passaggio, sono state inizialmente studiate diverse tecniche di pulizia della superficie d'oro microfabbricata selezionandone poi la migliore, in base a tecniche elettrochimiche di analisi superficiale. Successivamente la superficie in oro dei chip micro fabbricati industrialmente è stata studiata morfologicamente rispetto alla superficie ultrapiatta dei TSG tramite l'utilizzo di microscopia a forza atomica (AFM). Tale studio ha evidenziato rugosità maggiore delle superfici micro fabbricate come ci si attendeva. Ciò comporta quindi una difficile funzionalizzazione delle stesse, e diventa necessario l'utilizzo di trattamenti alternativi rispetto ai precedenti per derivatizzare le superfici con gli oligonucleotidi tiolati (probe). È stato quindi deciso di utilizzare il Tris (2-carbossietil) fosfina (Tcep), che reagendo con gli oligonucleotidi tiolati prima di essere messi sulla superficie [Duchardt F. et al., 2009, Nossal N. G. et al., 2007], scinde i ponti disolfuro che si creano facilmente in soluzione portando alla formazione di dimeri di oligonucleotidi tiolati. Riducendo questi ponti disolfuro tra gli oligonucleotidi vi è una maggiore reattività tra il gruppo solfuro del tiolo e la superficie in oro (Figura 4.1).

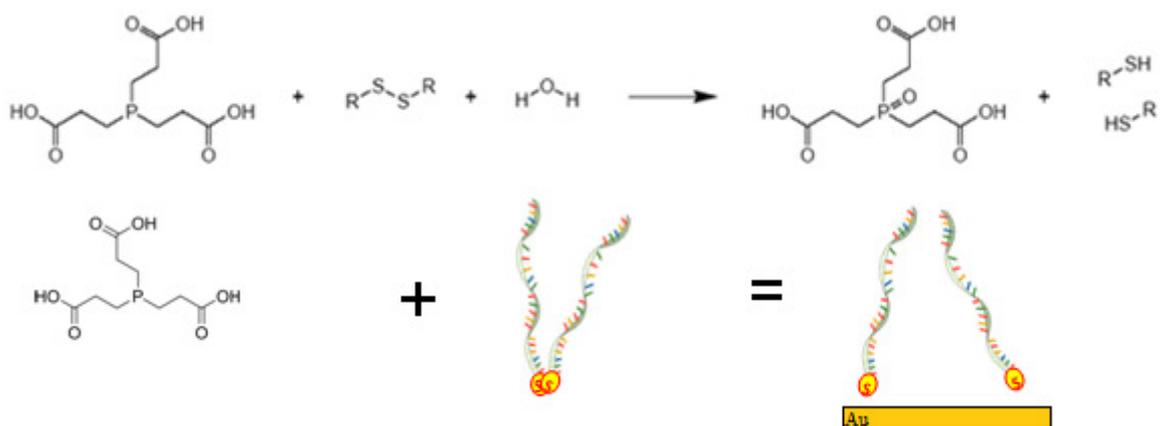


Figura 4.1: Il Tris (2-carbossietil) fosfina viene utilizzato per rompere i dimenri solfuro che si formano tra gli oligonucleotidi tiolati, aumentando l’affinità degli stessi con la superficie in oro.

Successivamente sono stati effettuati ulteriori cambiamenti inerenti alla camera microfluidica utilizzando un apparato fabbricato anch’esso industrialmente ed adoperando un sistema di iniezione controllato da una pompa a siringa per monitorare la velocità di incubazione e lavaggio all’interno della camera.

Tali cambiamenti, da come descritto e spiegato in seguito, hanno apportato a un notevole miglioramento, non solo processuale, ma anche funzionale in quanto sono stati ottenuti i medesimi risultati su entrambi le superfici, migliorandone anche l’affidabilità.

Una volta eseguiti gli studi di ottimizzazione del biosensore sia dal punto di vista dispositivistico che da quello chimico e microfluidico, sono stati studiati diversi approcci per amplificare il segnale estrapolato dal biosensore, grazie a diversi processi di amplificazione molecolare.

Infine, per apportare una maggiore maneggevolezza e portabilità dell’intero sistema, è stata fabbricata una scheda integrata per sostituire la stazione elettrochimica, permettendo un trasporto più agile.

4.2 Materiale e Metodi

4.2.1 La struttura del biochip

La struttura del biochip è descritta in Fig. 4.2. Una struttura in peek con coperchio in alluminio comprime i tre strati (vetro, Viton e silicio) della camera in cui avvengono incubazione, ibridazione e sensing, e ne assicura l'impermeabilità. La combinazione di questi strati compone la microfluidica e l'elettronica del biochip, dove il chip di silicio e il vetro sono le pareti inferiore e superiore del canale, mentre le pareti laterali sono ricavate nel Viton.

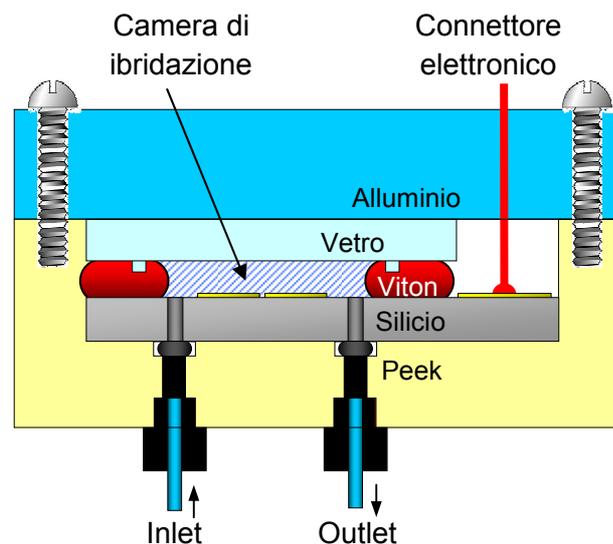


Figura 4.2: Sezione del biochip e della struttura di supporto, composta da 5 strati: Peek, Silicio, Viton, Vetro e Alluminio pressati tra loro. Le connessioni al sistema elettrochimico avvengono attraverso un foro nel coperchio di alluminio. Le connessioni fluidiche avvengono attraverso fori nella base in peek e nel chip di silicio. L'impermeabilità è garantita da guarnizioni di tipo O-ring e dallo strato di Viton.

Questa struttura a sandwich viene assemblata prima dell'utilizzo, in modo da permettere la funzionalizzazione biologica degli elettrodi separatamente in tempo e luogo rispetto al

montaggio e all'utilizzo. Buchi passanti nel silicio permettono l'iniezione dei buffer utilizzati per la misura attraverso la base in peek. Due strategie garantiscono la tenuta fluidica del dispositivo: guarnizioni di tipo O-ring sono permutate tra il chip di silicio e la base di peek, mentre lo strato elastico di Viton è premuto da rilievi presenti nel vetro intorno al bordo dei canali microfluidici. Tubi standard di microfluidica in teflon sono collegati alla base della struttura di supporto in peek tramite connettori commerciali, per l'iniezione di soluzioni nel dispositivo. Anche il connettore elettronico è commerciale, per l'eccitazione e la lettura del segnale elettrochimico sugli elettrodi.

4.2.2 Strategia di allineamento

Abbiamo sviluppato una strategia di allineamento per l'assemblaggio delle componenti fluidiche elettroniche che permette un semplice assemblaggio e ne minimizza gli errori. I tre strati che compongono il biochip (silicio, Viton, vetro) sono sagomati in maniera da disporsi precisamente in una scanalatura rettangolare ricavata nella base di peek (Fig. 4.3). In questo modo si allineano facilmente tutte le componenti fluidiche ed elettroniche con la base di peek, in particolare i fori nel chip di silicio con le guarnizioni, e gli elettrodi con il connettore elettronico a molla.

4.2.3 Caratteristiche tecniche degli elettrodi

Il sito di misura elettrochimica è composto da due elettrodi quadrati di area 1 mm^2 , ognuno connesso con una piazzola quadrata di lato 1.4 mm per il collegamento con lo strumento di misura attraverso il connettore a molla. Ogni chip contiene fino a 4 coppie di elettrodi, disposti e dimensionati in maniera da minimizzare le capacità parassite che si possono generare attraverso l'ossido di silicio e il silicio sottostante. Grazie alla tecnologia di fabbricazione presente in LioniX BV (Enschede, NL) è stato possibile fabbricare elettrodi sopra a uno strato di ossido di silicio sufficientemente spesso ($2.8 \text{ }\mu\text{m}$) da rendere trascurabile l'effetto di queste capacità parassite.

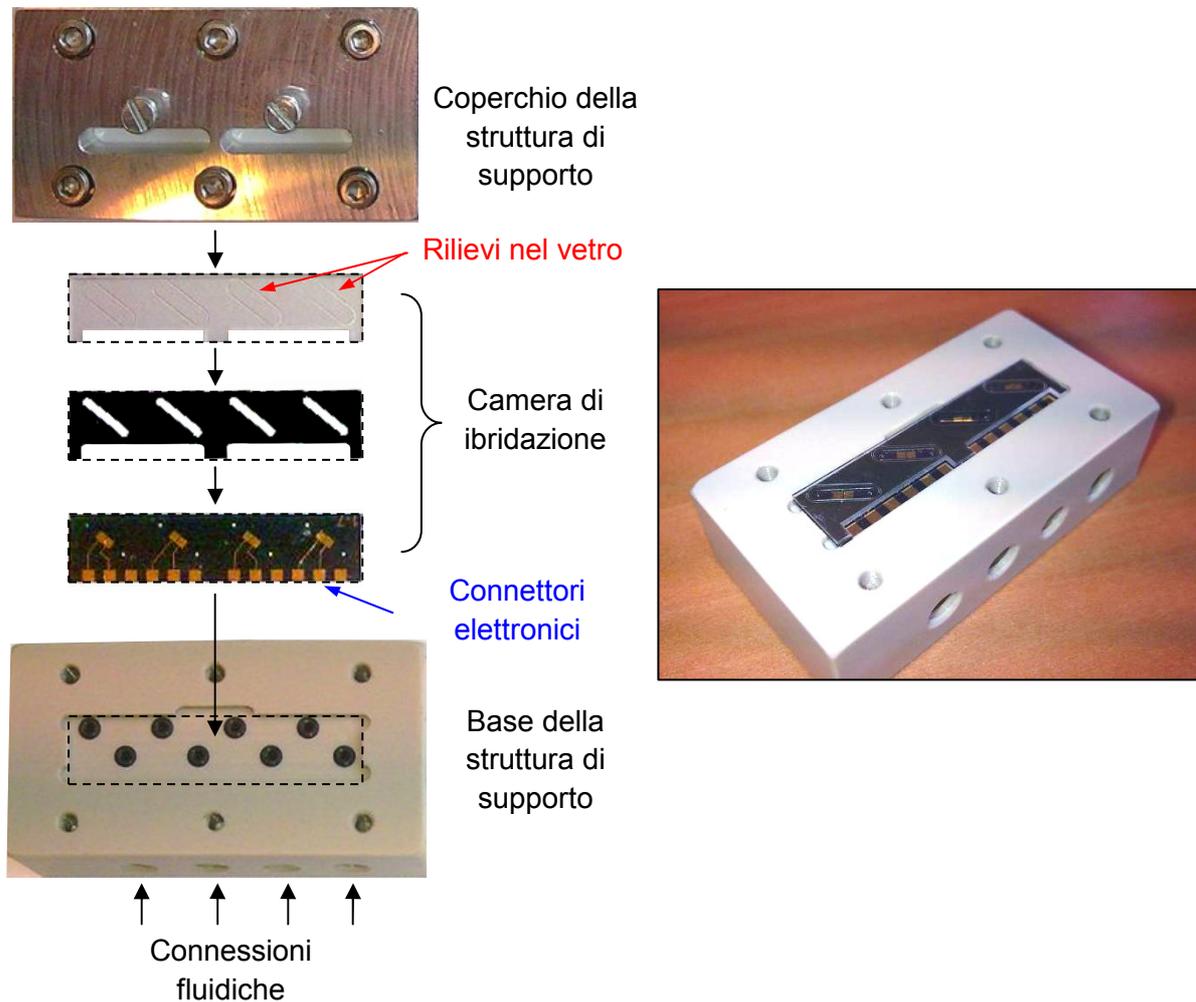


Figura 4.3: A sinistra I 5 strati che compongono il biochip, inclusa la struttura di supporto: coperchio in alluminio, chip di vetro, spaziatore di Viton, chip di silicio, base di peek (dall'alto al basso). Una scanalatura rettangolare nella base di peek è utilizzata per l'allineamento degli strati che compongono la camera di ibridazione, come indicato dalle linee tratteggiate. Le connessioni al sistema elettronico avvengono attraverso un foro passante attraverso il coperchio in alluminio. Le connessioni fluidiche avvengono attraverso la base di peek e i fori nel chip di silicio. La tenuta fluidica è garantita da guarnizioni di tipo O-ring e dallo strato di Viton premuto dai rilievi in vetro. A destra Il biochip assemblato e allineato sulla base della struttura di supporto.

Altri parametri del protocollo di fabbricazione si sono rilevati importanti per il corretto funzionamento del dispositivo, come ad esempio la modifica di un passaggio di annealing a 300°C dopo l'evaporazione dell'oro. Questi dettagli sul protocollo di fabbricazione dei chip sono protetti da vincolo di confidenzialità.

4.2.4 Caratteristiche tecniche della fluidica

Il protocollo per la rilevazione elettrochimica di DNA richiede l'introduzione di una serie di buffer nella camera dove avvengono ibridazione e sensing: pretrattamento della superficie dell'elettrodo, analita, buffer di condizionamento, e buffer di misura. Questo protocollo può essere implementato in un sistema integrato grazie alla presenza di un canale microfluidico sugli elettrodi di misura, dal quale vengono iniettati in sequenza le soluzioni da introdurre nel sistema. I due parametri rilevanti per la geometria della fluidica sono la sezione del canale, che deve essere sufficientemente stretto per evitare contaminazioni tra i diversi buffer, e l'altezza del canale, che deve essere sufficientemente piccola per massimizzare la probabilità che l'analita raggiunga la superficie degli elettrodi di misura per diffusione. I microcanali fabbricati hanno spessore di 1.1 mm, compatibile con la risoluzione di allineamento descritto nella sezione precedente, altezza 250 µm, e lunghezza 1-2 cm. Il volume totale della camera di ibridazione e sensing è circa 2-5 µl.

4.2.5 Pulizia del biochip

Il chip prima di essere funzionalizzato viene lavato con la soluzione chiamata piranha basica (3:1 v/v di soluzione concentrata di idrossido d'ammonio e 30% di perossidasi d'idrogeno) per 10 minuti, mantenendolo inclinato di circa 60° rispetto alla base del beaker. Successivamente viene lavato abbondantemente con H₂O MilliQ e lasciato poi a sonicare nella stessa per 10 minuti. Infine viene asciugato tramite flusso d'azoto sulla superficie del sensore. Dopo di che viene sottoposto al plasma in Argon di 1 minuto alla potenza del 99% tramite.

4.2.6 Caratterizzazione della pulizia

Una parte di elettrodo (50 mm^2) microfabbricato appositamente per le prove di pulizia, viene immerso in un beaker contenente $100 \text{ }\mu\text{M}$ di HOECHST 33258 in un buffer fosfato ($50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 100 mM NaCl , pH 7), insieme ad un contro elettrodo di grafite e ad un elettrodo di riferimento integrato di Ag/AgCl (Metrohm, 6.0750.100).

Le voltammetrie cicliche sono state eseguite a 100 mV/s tra $-0,3$ e $0,7 \text{ V}$ vs Ag/AgCl usando la stazione elettrochimica μ Autolab (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands) ed il software G-PES.

4.2.7 Immagini AFM

Le immagini AFM sono state effettuate in contact mode tramite l'utilizzo del sistema AFM NanoScope IIIa equipaggiato con una testa Multi Mode ed uno scanner piezoelettrico tipo E (Veeco USA).

4.2.8 Funzionalizzazione dell'oro e trattamento con HOECHST 33258

I chip microfabbricati sono stati derivatizzati con gli oligonucleotidi in accordo con il seguente protocollo. Una soluzione di oligonucleotidi modificati con tioli (probe) ad una concentrazione di $3 \text{ }\mu\text{M}$ ($5'\text{-SH-TTTTAGGTTGAGTTGGAGCA-3}'$) è preparata in $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 500 mM NaCl a pH 6.8. Dopo aver trattato per un'ora a temperatura ambiente tale soluzione con $300 \text{ }\mu\text{M}$ di Tris (2-carbossietil) fosfina, per ridurre i dimeri solfuro, vengono messi circa $10 \text{ }\mu\text{l}$ di tale soluzione sulla superficie d'oro appena scoperta dallo strato di mica; successivamente viene coperta con una Hybrislip™ (Sigma) e lasciata poi per una notte a temperatura ambiente in una cameretta umida. L'elettrodo viene poi risciacquato con 1 ml di H_2O millQ ultrapura (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) molto delicatamente per evitare il distacco dalla superficie del materiale genetico e successivamente viene asciugata sempre prudentemente con un flusso di Azoto gassoso.

L'incubazione con il DNA target viene eseguita dopo aver lasciato in incubazione quest'ultimo per 1 minuto a 90 °C. Viene quindi fatto fluire all'interno dell'apparato microfluidico il DNA target (5'-CCTCCAATGTATACAAACTAGTTCTGCTCCA ACTCAACCT-3') o il target utilizzato come controllo negativo, cioè non specifico alla sequenza probe (5'-AGGAAGAAGATGACGACCAGCTCAACGAGAAGGTCGCAG-3'). Alla fine dell'iniezione, il sistema viene fermato e lasciato a riposo per 30 minuti a temperatura ambiente, per permettere l'eventuale riconoscimento del target da parte del probe.

Successivamente vengono iniettati 200 µl di HOECHST 33258 100 µM in buffer fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7) e lasciato ad incubare per 5 minuti. Lo stesso buffer, senza colorante, viene utilizzato sia per il lavaggio dall'HOECHST 33258 consistente in un passaggio di 400 µl di soluzione, che per le misure.

4.2.9 Flussi utilizzati all'interno della camera

I flussi di soluzione sono stati iniettati all'interno della camera microfluidica tramite l'utilizzo di una pompa a siringa (KDSscientific, KDS-230-CE). Il protocollo consiste nell'iniezione di 200 µl di DNA target ad una velocità di 70 µl/min. Dopo aver lasciato in incubazione tale soluzione sulla superficie attiva del biosensore per 30 minuti vengono fatti fluire 200 µl di HOECHST 33258 ad una velocità di 70 µl/min. Anch'essi vengono lasciati in incubazione per 5 minuti all'interno della camera e successivamente vengono lavati tramite l'iniezione di 400 µl di buffer fosfato (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7) ad una velocità di 100 µl/minuto.

4.2.10 Scheda di misura

La scheda elettronica fabbricata per effettuare le analisi del biochip è uno strumento portatile che sostituisce la stazione elettrochimica Autolab nella realizzazione di misure voltammetriche.

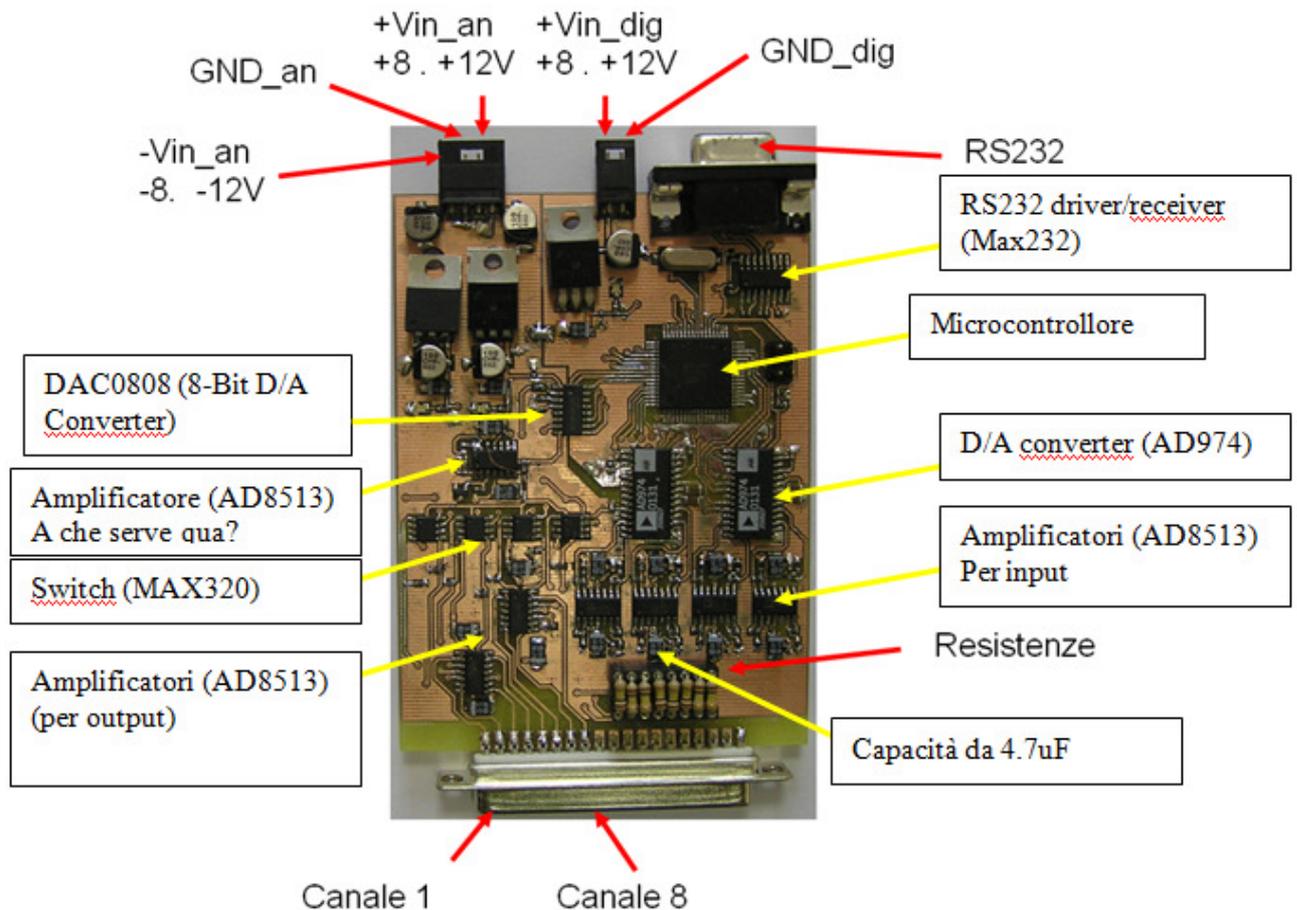


Figura 4.4: Fotografia della scheda elettronica portatile utilizzata per effettuare misure di voltammetria lineare in sostituzione all' stazione elettrochimica Autolab.

La scheda permette di imporre una differenza di potenziale tra i due elettrodi del biochip, e di leggere sull'elettrodo di lavoro la corrente scaturita dall'ossidazione del colorante sulla sua superficie. L'elettronica, progettata in maniera da analizzare fino a 8 siti di misura, è composta da tre parti (Figura 4.4): la generazione del segnale di eccitazione, la selezione del sito di misura, la lettura del segnale di risposta del biochip eccitato:

1-Lo scan lineare di potenziale (voltammetria lineare) viene generato digitalmente da un microcontrollore, convertito in segnale analogico da un convertitore DAC, ed amplificato nel segnale di eccitazione.

2-La selezione del canale da eccitare, e successivamente leggere viene effettuata da switch controllati dal microcontrollore.

3-La lettura avviene attraverso un passaggio di amplificazione e conversione in segnale digitale. Questo segnale viene letto dal microcontrollore ed inviato al computer tramite la porta RS232.

4.2.11 Amplificazione molecolare con il Tetraedro a DNA o con l'HCR (Reazione di ibridizzazione a catena)

Dopo aver incubato la superficie con la sequenza target, sono stati immessi circa 300 µl di buffer di incubazione composto da 30 mM sodio citrato, 300 mM NaCl, a pH 7.0 con all'interno i nucleotidi componenti il tetraedro di DNA (AT1 5'-AGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAATTTATCACCCGCCATAGTAGACGTAT CACC-3', AT2 5'TGCGCCTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTTCGACATGCGAGGAGGAAATGAAGTCCAATACCGACGATTACAGGCCTT-3', AT3 5'-GGTGATAAAACGTGTAGCAAGGCGCAAAGGCCTGTAATCGACTCTACGGGAA GAGCATGCCCATCCGGCTCACTACTATGGCG-3' e AT4 5'-TTCCTCCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGAGCCGGATGGGCATGCTTTCCGTAGAGACGTATTGGACTTCAT-3') o l'HCR (H1 TCAACGAGAAGGTCGCAGTAAGTCCTGCGACCTTCTCGTTGAGCTGGT e H2 GACTTACTGCGACCTTCTCGTTGAACCAGCTCAACGAGAAGGTCGCAG) ad una concentrazione finale di 1µM, scaldati precedentemente a 90 °C per un minuto. Dopo 30 minuti di incubazione viene effettuato il trattamento con il colorante e poi la misura come precedentemente descritto per il target.

4.3 Risultati e discussione

4.3.1 Chip Microfabbricato, pulizia ed analisi superficiale

Il chip microfabbricato studiato per sostituire i TSG come base del biosensore analizzato in precedenza, è rappresentato in figura 4.5. Da come mostrato in questa figura, il chip possiede quattro siti attivi composti da due elettrodi per ognuno, permettendo così di analizzare diverse concentrazioni di target o quattro diversi analiti. Ogni elettrodo d'oro possiede una dimensione di 1 mm^2 e la base del chip stesso è composta da silicio, con un film superficiale composto da ossido di silicio.

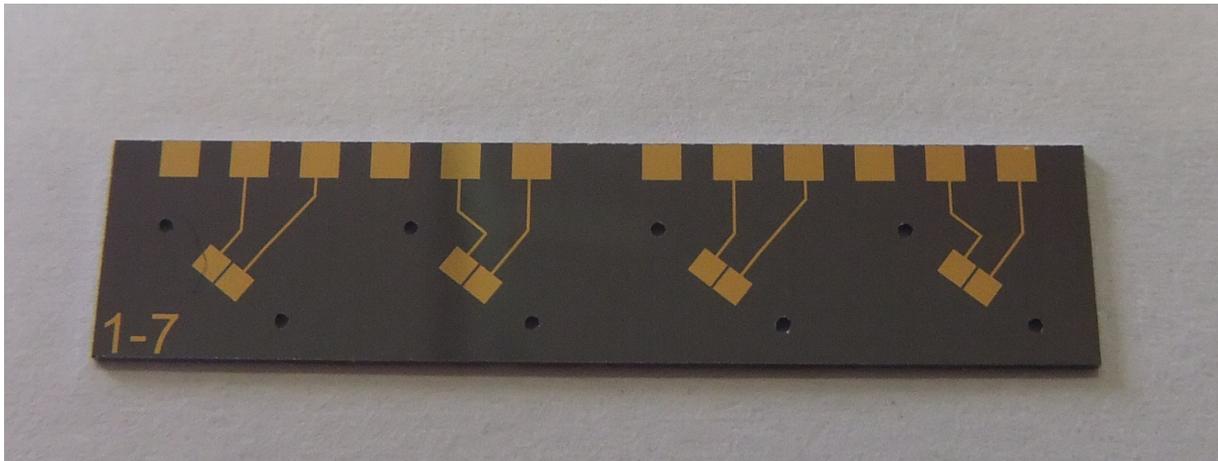


Figura 4.5: Fotografia del chip microfabbricato che sostituisce i dispositivi con superfici in oro ultrapiatto utilizzati nel precedente capitolo.

I processi di micro fabbricazione e la pellicola protettiva che protegge i dispositivi durante la conservazione portano alla formazione di residui superficiali che sporcano la superficie in oro dell'elettrodo. Questo porta alla formazione di uno strato resistivo tra l'elettrodo e la soluzione (Figura 4.6) che non permette il passaggio di corrente faradica tra i due ed ostacola la formazione del SAM di oligonucleotidi tiolati sulla superficie dell'elettrodo. Per ovviare a

questo problema, sono stati analizzati diversi tipi di pulizia tra cui quella in acetone bollente, l'utilizzo della soluzione piranha acida e basica, il plasma ad argon e la voltammetria ciclica in acido solforico. La scelta della pulizia ottimale di questa tipologia di superficie si è basata sulla capacità di assorbire elettroni dalla molecola di HOECHST 33258, durante una voltammetria lineare, per l'ossidazione dello stesso.

Dopo diversi studi, si è scelta la pulizia combinata di piranha basica con plasma ad argon in quanto porta ad un buon risultato sia a livello macroscopico che a livello microscopico, non danneggia la superficie dell'elettrodo e soprattutto permette uno scambio di corrente faradica tra l'elettrodo e la soluzione, durante una voltammetria lineare in presenza dell'HOECHST 33258.

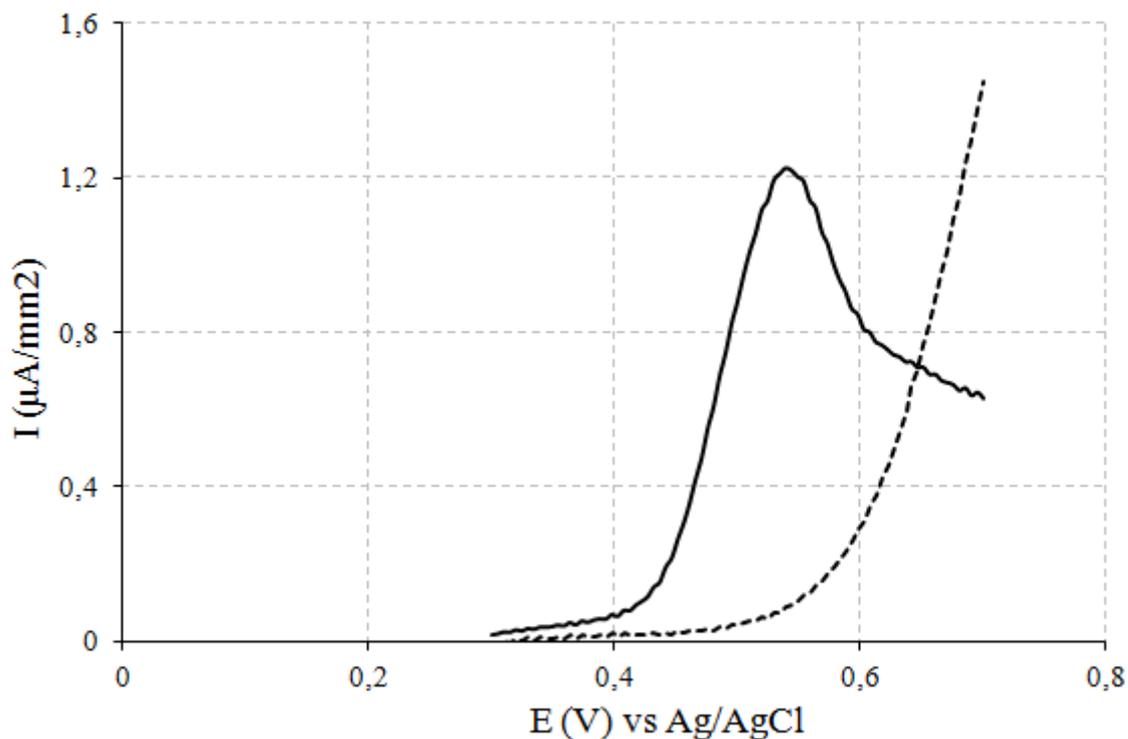


Figura 4.6: Voltammetria a tre elettrodi vs Ag/AgCl in presenza di HOECHST 33258 pre (linea tratteggiata) e post (linea continua) pulizia della superficie in oro dei dispositivi microfabbricati utilizzando la piranha basica e il plasma in argon.

La figura 3 infatti, raffigura due curve pre (linea tratteggiata) e post (linea continua) pulizia della superficie dell'elettrodo d'oro. Tali curve sono il risultato di una voltammetria standard a tre elettrodi in presenza di HOECHST 33258. Da come si nota nella figura, pre pulizia dell'elettrodo non vi è passaggio di corrente faradica tra l'elettrodo e la soluzione, mentre post misura è ben evidenziata la presenza di un picco ricollegabile all'ossidazione dell'HOECHST 33258. Le altre tecniche di pulizia, elencate precedentemente, sono state scartate in quanto, oltre a non pulire sufficientemente la superficie, alcune come la piranha acida e la voltammetria in acido solforico, portano al deterioramento l'elettrodo.

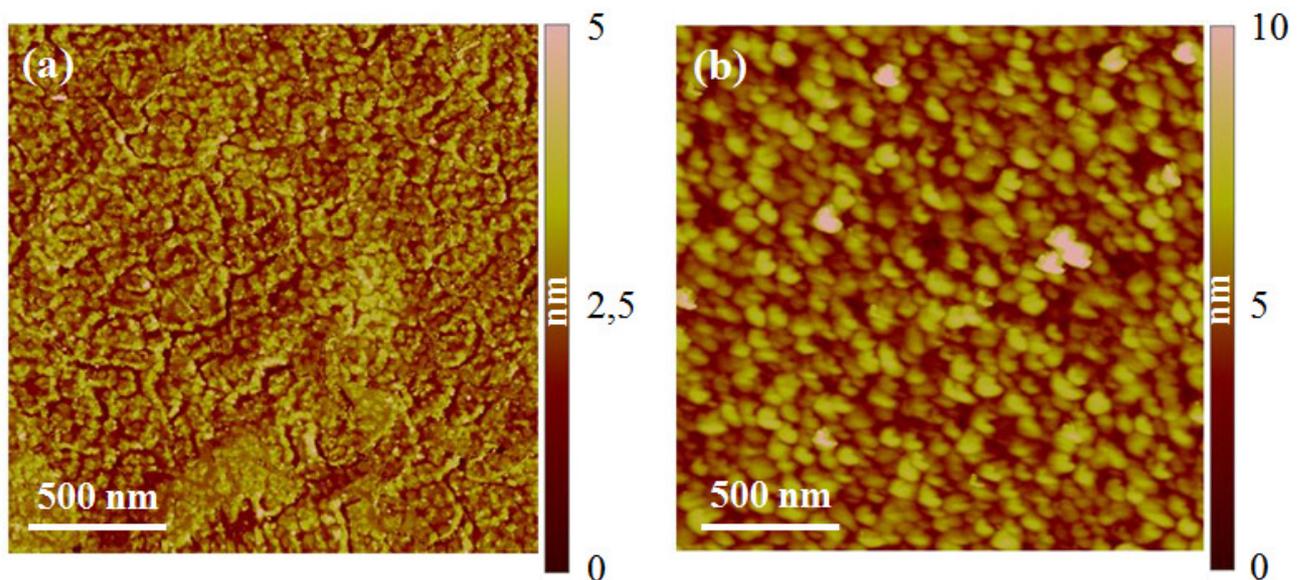


Figura 4.7: Immagine AFM di comparazione tra la superficie ultrapiatta dei TSG appena tolta dalla MICA (a) e quella del chip microfabbricato post processo di pulizia superficiale (b).

Una volta effettuata la scelta della pulizia superficiale, è stata fatta un'indagine morfologica degli elettrodi utilizzando il microscopio a forza atomica (AFM), andando a comparare la superficie ultrapiatta del TSG con quella micro fabbricata e pulita del chip.

Questo studio è stato eseguito per verificare la rugosità superficiale dell'oro che compone gli elettrodi, in quanto tale parametro è fondamentale per avere una corretta e buona funzionalizzazione degli elettrodi da parte del SAM di oligonucleotidi.

La figura 5.8 mostra le immagini AFM della superficie in oro del TSG (Fig. 4.7a) e quella del chip microfabbricato (Fig. 4.7b). Le due superfici sono morfologicamente differenti, la prima possiede delle leggere increspature e può considerarsi piatta a livello nanometrico avendo una rugosità media di circa 2,3 nm, mentre la seconda possiede differenti e numerosi motivi sferici in superficie ed una rugosità media di 8,5 nm.

Tali differenze sono molto probabilmente dovute alla differente tipologia di fabbricazione dei due elettrodi, essendo la prima ottimizzata per lo sviluppo di biosensori e la seconda invece per la produzione a livello industriale.

4.3.2 Ottimizzazione della funzionalizzazione, dei parametri microfluidici e dell'incubazione con il target

Dopo aver analizzato la morfologia e le caratteristiche della superficie metallica degli elettrodi, sono stati studiati diversi aspetti del protocollo di funzionamento del biosensore, sia per renderlo funzionante su superfici microfabbricate, sia per ottimizzarne varie caratteristiche come ad esempio l'efficienza di rilevazione.

Inizialmente è stato analizzato il protocollo di funzionalizzazione, in quanto utilizzando lo stesso procedimento adoperato con le superfici ultrapiatte, il biosensore microfabbricato portava a degli scarsi e saltuari risultati di rilevazione. Per ottimizzare la formazione del SAM di oligonucleotidi tiolati sulla superficie metallica, e per aumentare il numero di ibridizzazioni superficiali con il target, ci si è focalizzati sul migliorare l'affinità di legame tra il probe e la superficie in oro. Infatti in letteratura è noto come gli oligonucleotidi tiolati tendano a dimerizzare, formando dei ponti disolfuro e diminuendo quindi l'affinità tra gli atomi di zolfo e la superficie in oro. Per evitare che tale fenomeno avvenga, la soluzione contenente gli

oligonucleotidi tiolati è stata trattata con del T-CEP, un agente riducente che scinde il legame disolfuro riducendo entrambi i gruppi solfuro (fig. 4.1) aumentando così la reattività degli oligonucleotidi tiolati con la superficie. Tale molecola è stata scelta in quanto rispetto ad altri agenti riducenti, come il ditione e il 2-mercaptoetanololo, presenta il vantaggio di essere inodore, maggiormente idrofilica e più resistente all'ossidazione in aria [Ruegg, U.T et al., 1977]. Dopo diverse prove di funzionalizzazione del substrato microfabbricato con gli oligonucleotidi tiolati trattati con T-CEP a diverse concentrazioni ed a diverse tempistiche, è stato ottimizzato il protocollo di funzionalizzazione, portando ad un buon funzionamento e ad una buona riproducibilità del biosensore. Da come è possibile osservare in Figura 4.8 dove sono rappresentate due curve inerenti alle elaborazioni delle quattro scansioni per campione in base alla formula A1 (descritta nel precedente capitolo), c'è una notevole differenza tra il bianco e il campione trattato con il target 100 nM.

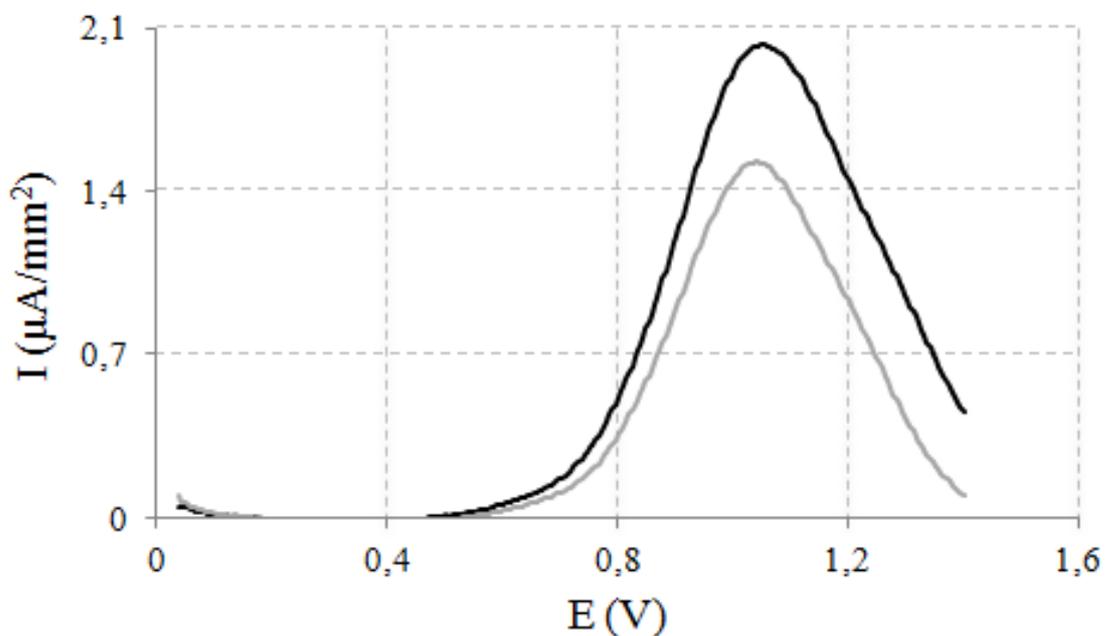


Figura 4.8: Voltammetria a due elettrodi in presenza di HOECHST 33258 su di un campione non trattato con target (riga grigia) e su di uno trattato con 100 nM di target complementare alla sequenza immobilizzata sulla superficie del biosensore.

Infatti il colorante legato al probe, si lega aspecificamente al singolo filamento di DNA ed alla superficie del sensore, mentre con la presenza di target, il colorante lega il solco minore della doppia elica con maggiore affinità [Guan et al., 2007]. Questo comporta un segnale maggiore causato dall'aumento di corrente faradica che passa in presenza di target rispetto a quello dato da solo probe.

Successivamente alle tecniche di funzionalizzazione, sono stati presi in considerazione altri aspetti riguardanti le cinetiche di funzionamento del biosensore tra cui il flusso controllato ed il riscaldamento del target prima di essere introdotto sulla superficie microfluidica. Il flusso controllato è stato implementato tramite l'utilizzo di una pompa a siringa che aspirando, permette il passaggio delle soluzioni di interesse sulla superficie del biosensore ad una velocità controllata. Anche in questo ambito, dopo varie prove di ottimizzazione per ottenere il protocollo volto a migliorare l'ibridizzazione superficiale, ad ottenere una buona colorazione ed a un lavaggio efficace, è stato definito un procedimento per cui, 200 μ l di DNA target o di DNA target non complementare (controllo negativo) alla sequenza immobilizzata sulla superficie vengono immessi ad una velocità di 70 μ l/min. Tale velocità è stata scelta in quanto non danneggia la superficie funzionalizzata del biosensore, mentre a velocità superiori a 300 μ l/min è stato provato che il biosensore perde la sua funzionalità. Tale fenomeno è dato dall'eccessivo flusso laminare sviluppato all'interno della camera microfluidica, che porta al distacco degli oligonucleotidi tiolati immobilizzati sulla superficie in oro. Successivamente la soluzione viene lasciata ferma all'interno della camera di incubazione per 30 minuti. Vengono poi immessi all'interno della camera 200 μ l di soluzione contenente l'HOECHST 33258 sempre ad una velocità di 70 μ l/min. Dopo 5 minuti di incubazione viene effettuato un lavaggio con il buffer utilizzato precedentemente per diluire il colorante di 400 μ l, ad una velocità di 100 μ l/min. Tale velocità è stata scelta in quanto permette maggiormente il distacco delle molecole di colorante legate aspecificamente sulla superficie, rispetto a quelle che legano il solco minore del DNA, preservando l'integrità del SAM di oligonucleotidi immobilizzato sulla superficie.

Infine è stato inserito all'interno del protocollo anche il riscaldamento a 90°C del target prima dell'iniezione all'interno dell'apparato microfluidico, permettendo la rottura delle strutture

secondarie che si formano tra i filamenti di oligonucleotidi da rilevare, diminuendo così la tendenza a combinarsi con il probe. Anche questo passaggio ha permesso un aumento di affinità tra il target e la superficie del biosensore, apportando una maggior funzionalità ed efficacia dello stesso.

4.3.3 Misure diretta ed inversa del biosensore su superfici ultrapiatte e microfabbricate con diverse concentrazioni di target

Una volta ottimizzato il protocollo per l'utilizzo del biosensore studiato, è stata indagata la sua risposta a diverse concentrazioni di target, comparando i risultati dati da superfici ultrapiatte con quelli ottenuti da superfici microfabbricate. Infatti inizialmente, i miglioramenti apportati al sistema son stati studiati su superfici conosciute, e cioè quelle componenti i TSG. Su tali substrati sono state sperimentate le diverse modifiche protocollari riguardanti la funzionalizzazione della superficie (utilizzo del T-cep), l'imposizione di un sistema microfluidico a flussi controllati ed il riscaldamento del target pre incubazione all'interno del sistema microfluidico. Sono stati quindi effettuati esperimenti trattando le superfici con diverse concentrazioni di target, osservando la gradualità della risposta ed anche il mantenimento della significatività della misura inversa rispetto alla diretta, di ogni singolo campione. I risultati sperimentali sono rappresentati nella figura 4.9, dove ogni punto corrisponde alla misura diretta ed inversa di un singolo dispositivo elettrochimico in differenti condizioni: sei diverse concentrazioni di oligonucleotidi target, una di oligonucleotidi non complementare a una concentrazione di 100 nM e un bianco sperimentale utilizzando la soluzione di incubazione in assenza di target. Per questo esperimento, son stati utilizzati tre differenti dispositivi per ogni singola condizione e le misure sono state elaborate come espresso dalla formula A1. La localizzazione dei punti sperimentali lungo la bisettrice del quadrante in figura 4.9 conferma che la misura diretta è quantitativamente comparabile con la corrispondente misura inversa per tutti i campioni analizzati.

Questo permette di generalizzare le considerazioni espresse nel precedente capitolo, e dimostra che le misure dirette ed inverse possono essere utilizzate come un controllo l'una

dell'altra. Inoltre, tali conclusioni permettono di effettuare elaborazioni statistiche più consistenti costituite in quanto il numero di punti elaborati è raddoppiato.

Il prodotto di tale elaborazione è mostrato in figura 4.10, in cui può essere osservata la dipendenza del segnale di rivelazione in funzione di concentrazioni variabili di DNA bersaglio.

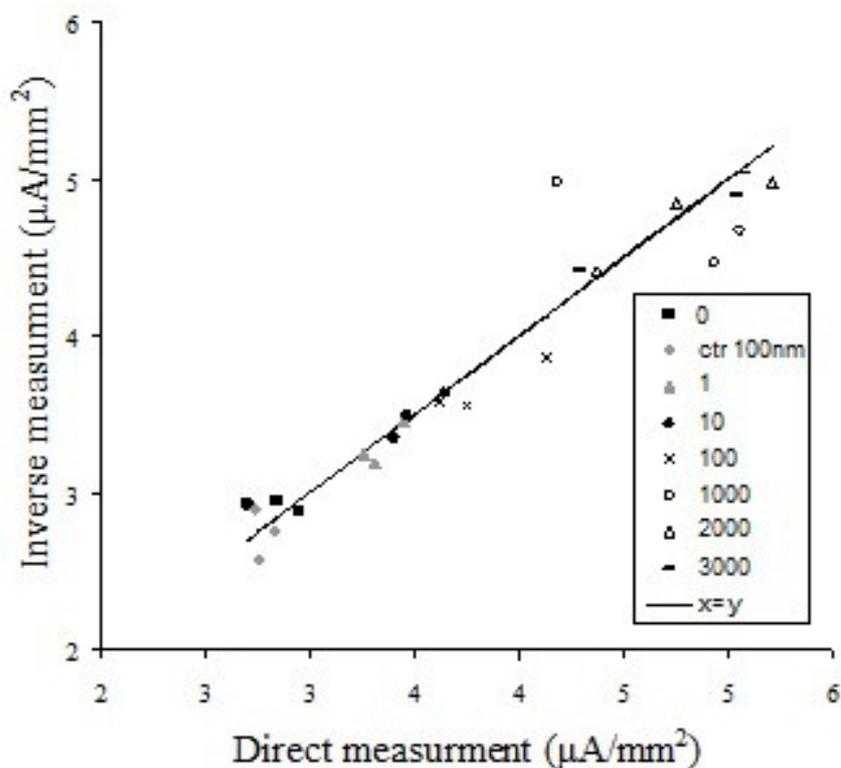


Figura 4.9: In questo grafico ogni dato corrisponde al valore dell'altezza di picco della misura diretta e della misura inversa di un singolo campione. Vengono comparate 6 diverse concentrazioni di target, un controllo negativo con un oligonucleotide non complementare alla sequenza immobilizzata sulla superficie ad una concentrazioni di 100 nM ed un bianco corrispondente all'biosensore non trattato con DNA target.

Da come si può osservare in questa curva di calibrazione, rispetto a quella mostrata nel precedente capitolo, il limite di rilevazione del sensore diminuisce di un ordine di grandezza (1 nM rispetto a 10 nM precedentemente rilevato) e le deviazioni standard per ogni punto sperimentale calcolato uguali ed inferiori ai 100 nM di target, sono minori rispetto alle

precedenti condizioni. Questo risultato è significativo in quanto mostra come le modifiche apportate al sistema abbiano migliorato il suo rendimento, senza danneggiare le caratteristiche dello stesso.

I risultati sono compatibili con le prestazioni di una configurazione standard (tre elettrodi), come presentato da Choi ed i suoi collaboratori (Choi et al. 2005). Come già detto nel precedente capitolo, vi sono altre caratteristiche paragonabili ad una configurazione standard: l'aumento monotono del segnale di risposta con la concentrazione corrispondente e la saturazione del segnale per concentrazioni comprese tra gli 1 μM e i 3 μM di target.

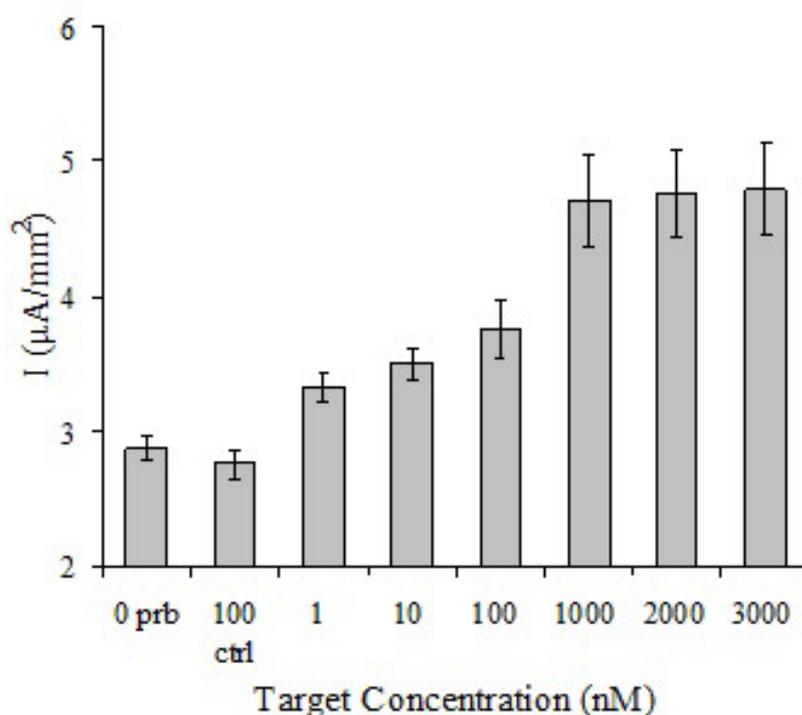


Figura 4.10: Grafico a barre inerente alla risposta del dispositivo sviluppato su superfici ultrapiatte dopo il trattamento con HOECHST 33258 a differenti concentrazioni di DNA target solubile, al controllo negativo ed al bianco. Comparandolo con la curva di risposta vista nel precedente capitolo si può notare come i cambiamenti sperimentali effettuati hanno apportato un aumento del limite di rilevamento ed una diminuzione della deviazione standard tra i punti analizzati.

Come già accennato precedentemente il limite di rivelazione del biosensore è minore o uguale a 1 nM, poiché il segnale di rivelazione in tale condizione si differenzia di circa quattro volte

la deviazione standard calcolata dalle misurazioni dei campioni utilizzati come bianco sperimentale.

Infine, l'analisi dei nostri risultati, nonché i risultati esposti nell'articolo di Choi ed i suoi collaboratori, portano alla luce due fenomeni inaspettati. La prima è la risposta non lineare del biosensore a concentrazioni elevate di target e la seconda è relativa alla deviazione standard, che sembra essere superiore sempre alle stesse concentrazioni. Il primo fenomeno è dovuto al limite di saturazione del dispositivo che può essere dato dall'ingombro di tutti gli oligonucleotidi immobilizzati sulla superficie da parte del target, mentre il secondo può essere dato dall'aumento delle interazioni aspecifiche tra il target e la superficie ed tra il target e il colorante, portando così ad un aumento della deviazione standard tra le misure dei vari campioni.

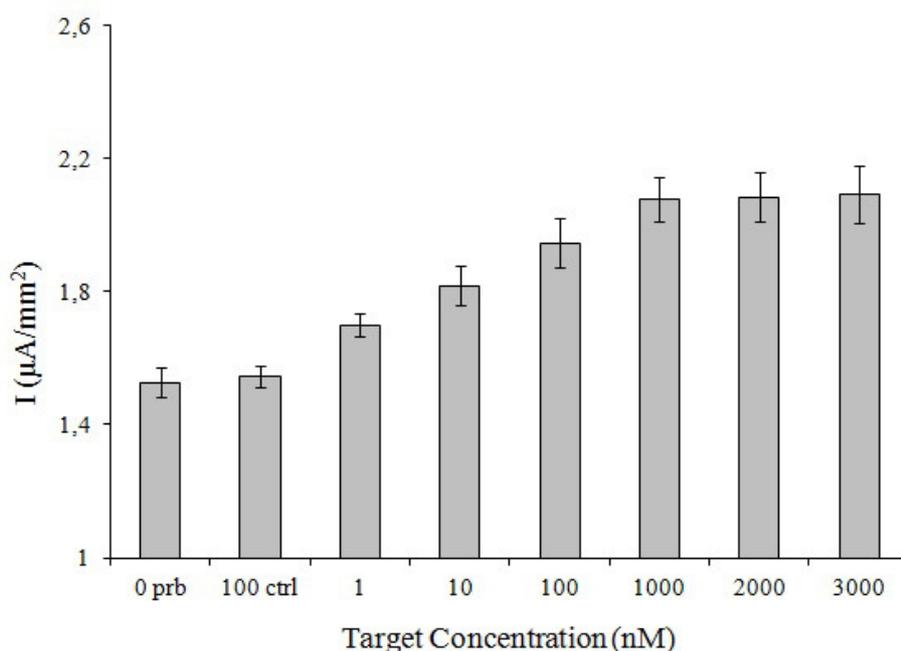


Figura 4.11: Grafico a barre inerente alla risposta del dispositivo sviluppato su superfici microfabbricate dopo il trattamento con HOECHST 33258 a differenti concentrazioni di DNA target solubile, al controllo negativo ed al bianco. Comparandolo con la curva di risposta vista sulle superfici ultrapiatte è evidente come il limite di rilevazione sia il medesimo (1 nM) ma come l'intensità di corrente anodica passante tra elettrodo e soluzione sia all'incirca dimezzata per tutti i campioni rilevati.

È stato poi indagato se i miglioramenti apportati al protocollo di funzionalizzazione, di microfluidica e di trattamento del target potessero rendere funzionale e paragonabile al precedente biosensore, quello sviluppato su superfici microfabbricate e misurato tramite una scheda elettronica portatile. Per far ciò è stata trattata la superficie con quattro differenti concentrazioni di target, una di oligonucleotidi non complementari a 100 nM e una con solo soluzione di incubazione, da utilizzare come bianco sperimentale.

I risultati sperimentali sono mostrati in figura 4.11 ed anche in questo caso sono dati dalla media delle misure dirette ed inverse per ogni singolo campione elaborate tramite la formula A1. Ogni punto sperimentale è rappresentato da 5 differenti dispositivi trattati con il medesimo campione da rilevare. Da come rappresentato in figura 4.11 anche utilizzando i dispositivi microfabbricati, il limite di rilevazione è di 1 nM come visto precedentemente con i TSG, ma la quantità di corrente letta per ogni punto rilevato è all'incirca la metà di quella rilevata dal dispositivo su superfici ultrapiatte. Questo fenomeno può essere dato da diversi fattori, tra cui la minor purezza superficiale o la difficoltà del colorante a raggiungere la superficie e quindi anche gli oligonucleotidi celati all'interno degli avvallamenti superficiali. Tali fenomeni appunto possono portare ad un minor passaggio di corrente faradica tra elettrodo e soluzione, ma da come si può osservare comparando le due curve di risposta precedentemente rappresentate, non vi è una significativa differenza tra le due se non una riduzione di amperaggio.

4.3.4 Metodi di amplificazione molecolare sulla superficie del biosensore: tetraedro e HCR

Dopo aver sviluppato il biosensore precedentemente descritto e dopo aver confermato una possibile produzione a livello industriale, sono stati studiati metodi per amplificare il segnale. Per far ciò sono stati indagati e poi adoperati metodi di amplificazione molecolare consistenti nell'utilizzo di strutture di DNA auto assemblanti sulla superficie, permettendo così un aumento

di materiale genetico sull'elettrodo una volta avvenuta la reazione di innesco tra probe e target. Negli esperimenti seguenti sono stati utilizzati i probe ed i target usati precedentemente e sono poi state progettate le diverse strutture auto assemblanti. Tali strutture sono composte da oligonucleotidi in parte complementari alla porzione finale di target lunga 20 nucleotidi non interagente con il probe (Figura 2.4). Per eseguire questi studi, sono state utilizzate le elaborazioni ed il sistema descritto nei paragrafi precedenti composto dai dispositivi micro fabbricati, dalla scheda di lettura degli stessi e dal sistema micro fluidico apposito.

Inizialmente è stata progettata una struttura composta da tre nucleotidi oltre al target, che permettesse l'autoassemblaggio limitrofo alla superficie di una tetraedro di DNA, una volta avvenuto il riconoscimento tra probe e target (Figura 2.4).

Sono stati eseguiti studi della formazione del tetraedro in soluzione, analizzando poi l'avvenuto assemblaggio tramite elettroforesi. Successivamente si è indagata la funzionalità di tale struttura con concentrazioni di target di 100 nM. Dopo l'incubazione con il target, la superficie del sensore è stata trattata con i quattro diversi nucleotidi componenti il tetraedro ad una concentrazione di 1 μ M. Una volta terminata l'incubazione anche con quest'ultimi, sono state eseguite le misurazioni post colorazione con l'HOECHST 33258. Osservando i risultati in fig. 4.12 (dati dall'elaborazione di 5 diversi campioni per punto) è possibile osservare come l'assemblaggio del tetraedro di DNA sulla superficie dell'elettrodo, porti ad un aumento del segnale rispetto quello dato dal campione trattato solo con target. Inoltre è osservabile come il controllo negativo (target non complementare trattato di i 4 filamenti componenti il tetraedro) sia paragonabile al campione misurato con la presenza solo del probe, evidenziando l'assenza di un interazioni aspecifiche tra gli oligonucleotidi componenti il tetraedro e la superficie del sensore. Analizzando poi il valore raggiunto dal campione di target 100 nM in presenza del tetraedro auto assemblante, è osservabile come tale risultato eguagli il livello di saturazione precedentemente nella curva di calibrazione (Figura 4.12). Questa è un'ulteriore conferma di come tale struttura amplifichi la risposta del biosensore studiato a basse concentrazioni di target.

Oltre all'utilizzo del tetraedro è stata ispezionata un'ulteriore metodica chiamata HCR (Reazione di Ibridizzazione a Catena). Tale metodica consiste nell'utilizzo di due oligonucleotidi (H1 e H2) che formano una struttura a forcina (Figura 2.5) composta da una parte rigida a doppio filamento ed una parte centrale a singolo filamento che forma un'ansa. Una parte di H1 è complementare alla parte finale di target, mentre H2 è complementare alla sequenza sporgente di H1 nella prima porzione e identico alla parte della molecola target nella seconda, così da aver una successione di ibridizzazioni ed un aumento di materiale genetico superficiale dato dal riconoscimento di una sola molecola di analita (Figura 4.12). Utilizzando quindi il medesimo sistema adoperato per il tetraedro abbiamo indagato la possibilità di avere un'amplificazione del segnale di rilevazione da parte dell'HCR.

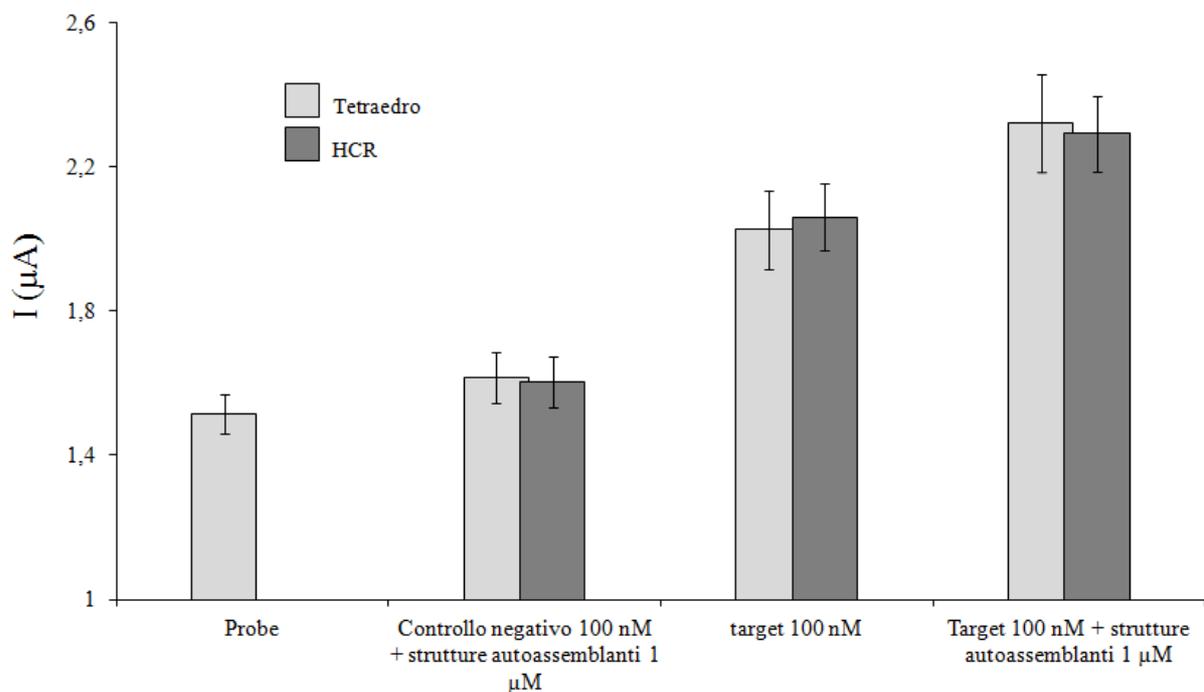


Figura 4.12: Comparazione tra l'amplificazione molecolare data dalla struttura auto assemblante di DNA a tetraedro e quella componente l'HCR. Entrambi i processi portano ad un'amplificazione superficiale del segnale dato dal campione trattato con 100 nM di target e con gli oligonucleotidi componenti le strutture autoassemblanti, rispetto al campione trattato solo con target ed al controllo negativo trattato anch'esso con gli oligonucleotidi componenti le strutture fungenti da amplificatori molecolari e con DNA non complementare al probe.

Da come viene mostrato in figura 4.12, l'aggiunta di 1 μM di oligonucleotidi componenti l'HCR ad un campione trattato con 100 nM di target, ne aumenta il segnale fino ad arrivare ai livelli di saturazione visti precedentemente a concentrazioni elevate di target e tramite l'utilizzo del tetraedro. Nemmeno l'HCR interagisce aspecificamente con la superficie del biosensore, in quanto trattando il controllo negativo con H1 e H2, il segnale di quest'ultimo è simile a quello dato dai campioni con presente solo il probe.

Comparando invece i diversi sistemi di amplificazione molecolare, possiamo osservare un apporto amplificativo paragonabile delle due strutture, leggermente minore nell'HCR ma praticamente irrilevante nella valutazione delle due metodiche.

Tali sistemi saranno poi esaminati in futuro con concentrazioni minori di DNA target per osservare se oltre ad apportare ad una soddisfacente amplificazione con concentrazioni intermedie di analita, vi è anche a concentrazioni più basse permettendo di aumentare la sensibilità del sistema.

4.3.5 Conclusioni

Osservando generalmente gli studi e lo sviluppo del biosensore fino ad ora descritto si può affermare che i risultati ottenuti sono: la paragonabilità dello stesso con i sensori standard a tre elettrodi basati sulla medesima metodica, la possibilità di effettuare due misure in parallelo di uno stesso campione o di 2 diversi campioni su di uno stesso di dispositivo e la buona applicabilità della chimica superficiale anche su superfici create con tecnologie industriali.

CAPITOLO 5 - Studio e sviluppo di un dispositivo organico ad effetto campo per la stimolazione e la rilevazione di segnali cellulari bioelettrici neuronali

5.1 Introduzione

Il terzo anno di dottorato è stato focalizzato sullo studio di biosensori fabbricati con materiali organici. In particolare, ho partecipato ad un programma di lavoro che prevedeva la realizzazione di un dispositivo avente un'architettura a transistor organico ad effetto di campo a film sottile (OTFT), che fosse in grado di interfacciare ed integrare cellule neuronali con la finalità di modularne e registrarne l'attività bioelettrica in tempo reale.

L'utilizzo di materiali organici offre innumerevoli vantaggi rispetto alla tecnologia inorganica. I materiali semiconduttori organici sono a basso costo di sintesi e quindi economici, altamente performanti, di facile preparazione e lavorabili a basse temperature o in soluzione. Le proprietà meccaniche intrinseche dei materiali organici, legate alla bassa energia di interazione ed alla leggerezza relativa rispetto ai corrispettivi di silicio, consente la realizzazione di dispositivi flessibili, leggeri e "portabili" ben si adattano ad una vasta gamma di applicazioni, inclusa l'elettronica di consumo, la fotovoltaica, la biotecnologia [Kelley et al., 2004] ed in particolare la biosensoristica.

I progressi recenti concernenti quest'ultimo campo applicativo hanno portato allo sviluppo di sistemi in grado di interfacciare efficacemente molecole biologiche con dispositivi elettronici [Willner and Willner, 2001] e conseguentemente alla continua implementazione di biosensori "organici" con diverse potenziali applicazioni, tra cui lo screening rapido di campioni biologici e la diagnostica point-of-care.

Il progresso simultaneo avvenuto nell'ambito dello studio dei biomateriali da una parte, e dei dispositivi organici dall'altra, hanno permesso di fabbricare dispositivi con materiali scelti per la migliore interazione con le biomolecole. Di particolare interesse è la possibilità di

sviluppare dei dispositivi organici elettronici composti in parte o totalmente da biomateriali scelti: è possibile infatti fabbricare interi transistor organici (Figura 5.3) utilizzando biomateriali [Vladu et al., 2010].

5.1.1 I semiconduttori organici

I materiali organici sono composti di carbonio in cui l'elettrone è localizzato all'interno di un orbitale molecolare e non è libero di muoversi lungo la macromolecola. Tuttavia esistono materiali organici intrinsecamente semiconduttori, nei quali si osserva una delocalizzazione (coniugazione) degli orbitali: polimeri o molecole coniugate. Essi sono formati da doppi e singoli legami covalenti alternati. Ogni unità CH_2 è formata da tre orbitali ibridi sp_2 e un orbitale p_z perpendicolare. Nell'interazione con i carboni adiacenti, gli orbitali ibridi formano i legami che garantiscono una struttura planare allo scheletro molecolare, mentre gli orbitali p_z generano uno stato di legame e uno di anti-legame di energia superiore. Da un punto di vista fisico, si può descrivere il sistema utilizzando il modello tight binding: quando degli atomi singoli sono avvicinati per formare un cristallo, si osserva una sovrapposizione degli orbitali molecolari. La funzione d'onda dei due atomi, 1 e 2, si combina in due modi: $\Psi_1 + \Psi_2$ e $\Psi_1 - \Psi_2$ [Kittel P., Introduction to Solid State Physics]. Il primo rappresenta l'orbitale di legame e possiede una minor energia rispetto a quello di antilegame. All'aumentare del numero di atomi coinvolti, aumentano il numero di orbitali sovrapposti. In altre parole aumentano i doppi legami coniugati, ovvero aumenta la lunghezza di coniugazione, i livelli energetici di legame e antilegame si avvicinano, formando un insieme continuo di stati elettronici, dando origine così a una banda di energia. Anche la separazione energetica diminuisce, rimane, tuttavia, una banda che definisce l'energy gap.

In analogia con i semiconduttori inorganici è possibile quindi definire una struttura a bande. Il più alto orbitale molecolare occupato, HOMO (Higher Occupied Molecular Orbital), corrisponde al limite superiore della banda di valenza. Il più basso orbitale molecolare non occupato, LUMO (Lower Un-occupied Molecular Orbital), corrisponde al limite inferiore della banda di conduzione. Proprio grazie a questa struttura a bande, i polimeri e le molecole coniugate possono essere considerate un'alternativa valida ai semiconduttori inorganici. La

loro peculiarità sta nella possibilità di variare le caratteristiche elettroniche, introducendo dei gruppi funzionali nella struttura principale. Il processo di sintesi di questi materiali risulta semplice e soprattutto poco costoso.

5.1.2 La teoria del trasporto di carica

Il problema fondamentale che i numerosi gruppi di ricerca stanno cercando di risolvere è quello di spiegare il metodo di trasporto di carica all'interno dei semiconduttori organici, cercando di mettere in relazione la struttura molecolare con le proprietà chimico fisiche di questi materiali. Prima di tutto, va osservato che il silicio e il germanio sono cristalli formati da atomi dello stesso tipo; l'interazione che li tiene uniti è basata su legami covalenti che hanno energia intorno ai 76 Kcal/mol. I materiali organici sono invece molecole legate tra loro da legami π . Le catene molecolari, a loro volta, si impacchettano in semi-cristalli e le interazioni in gioco sono di tipo Van der Waals o di dipolo dipolo, con energie minori di 10 Kcal/mol. Queste basse energie permettono una maggiore deformazione strutturale e quindi la possibilità di formazione di polaroni. Per comprendere cosa sia un polaron, consideriamo cosa accade quando viene sottratto al polimero un elettrone dell'orbitale π . In questo caso, rimane una lacuna e si forma quindi un radical-catione.

Questa è una struttura instabile che provoca una redistribuzione della carica e una deformazione strutturale delocalizzata. Tale deformazione si chiama polaron (Figura 5.1).

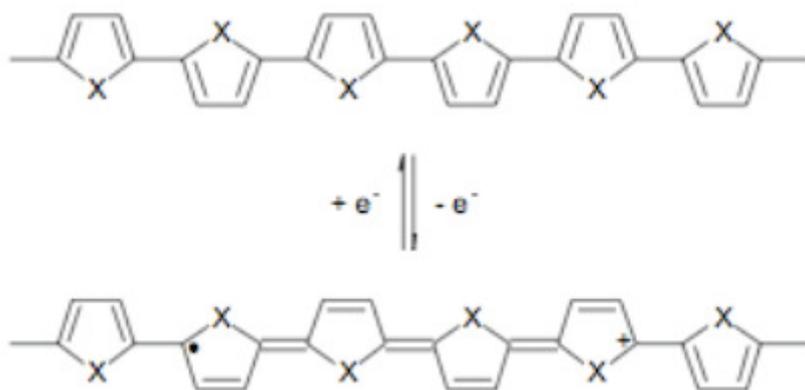


Figura 5.1: Formazione di un polaron

Come conseguenza, l'orbitale molecolare π acquista maggiore energia, causando una variazione nella struttura a bande e la comparsa di stati elettronici localizzati all'interno del gap. La formazione dei polaroni è energeticamente favorita nei semiconduttori organici. Questo si manifesta con l'apparizione di nuove transizioni ottiche nello spettro di assorbimento a energie intermedie tra le principali transizioni π - π [Brown, P.J., et al., 2001]. A loro volta i radical-cationi, quando il numero di cariche in eccesso è sufficientemente elevato, possono interagire fra loro formando dei bipolaroni (Figura 5.2).

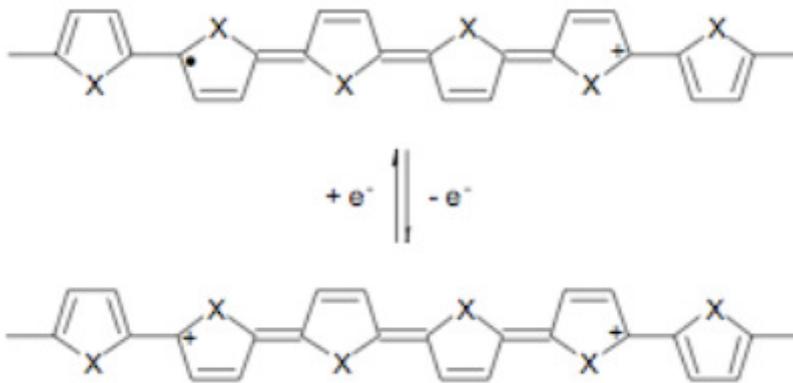


Figura 5.2: Formazione di un dipolarone

Per capire come queste cariche si muovano all'interno di un materiale organico è prima di tutto necessario distinguere il trasporto che avviene in un campione perfettamente ordinato, come il caso dei monocristalli SC (Single Crystal), e quello in un materiale policristallino, caratterizzato da zone ordinate, grani, separati tra loro da zone altamente disordinate. La teoria proposta per descrivere il trasporto all'interno di un materiale ordinato parte da un modello in cui si considera un materiale infinito caratterizzato da un impacchettamento monodimensionale formato da molecole esattamente identiche, disposte in modo ordinato una sopra l'altra. La mobilità della carica lungo l'asse di impacchettamento dipende dall'accoppiamento elettronico dei livelli di HOMO (per il trasporto con lacune, trasporto di tipo p) e LUMO (per il trasporto con elettroni, trasporto di tipo n) delle molecole adiacenti. Utilizzando il modello

tight binding nell' approssimazione monodimensionale, la larghezza delle bande (E) è proporzionale all'integrale di sovrapposizione tra due atomi vicini (t) [Conil A., et al., 2001]. A causa delle deboli forze di legame che tengono unito un cristallo organico, le bande risultano strette. Nei semiconduttori organici, l'integrale di sovrapposizione ha un valore dell'ordine di 10-100 meV [Conil A., et al., 2001]. Perciò a basse temperature e in materiali altamente ordinati, ci si aspetta che il trasporto sia di tipo band-like. In questo regime la carica è delocalizzata su diverse catene. La mobilità dei portatori dipende dalla larghezza delle bande di HOMO o LUMO ed è limitata solo da difetti intrinseci o impurità. Quando la temperatura aumenta, i modi di vibrazione a bassa energia impediscono la mobilità dei portatori. A temperatura ambiente ci si aspetta che i portatori di carica siano in grado di muoversi non solo lungo l'asse di coniugazione, ma possano anche saltare da una catena all'altra [Conil A., et al., 2001].

Tuttavia, se consideriamo i materiali policristallini (tramite cui vengono fabbricati gli OTFT in quanto i semiconduttori organici formano strutture piuttosto disordinate), essi sono caratterizzati da una corta lunghezza di coniugazione delle catene che li compongono e da un disordine intrinseco. Non è più possibile utilizzare il modello precedente di un cristallo coniugato infinito. Per risolvere questo limite, bisogna includere effetti d'interazione intercatena. Ciò che si prevede, e che viene osservato sperimentalmente da Ziemelis et al. e Brown et al. [Brown, P.J., et al., 2001] è che il disordine tende a localizzare i portatori di carica su catene singole. Questi esperimenti suggeriscono che le catene polimeriche siano rappresentate da sequenze di brevi e singoli segmenti coniugati separati da difetti di coniugazione indotti dal disordine. Le diverse lunghezze di coniugazione delle catene polimeriche generano diversi livelli di HOMO e LUMO. In questi casi, non è più possibile parlare di trasporto a bande. Esistono, invece, degli stati localizzati associati alle trappole a energie più basse (p più alte) dei livelli localizzati che costituiscono le bande di conduzione (di valenza) [Conil A., et al., 2001]. Il meccanismo principale di trasporto non è più di tipo band-like, ma si basa su una serie di eventi in cui le trappole catturano e rilasciano le cariche. La carica si sposta per effetto tunnel tra gli stati localizzati, questo fenomeno si chiama hopping [Conil A., et al., 2001].

5.2.3 Transistor organici ad effetto di campo a film sottile

I transistor organici ad effetto di campo sono dispositivi che permettono ai semiconduttori organici di trasportare cariche tra due elettrodi, sotto l'imposizione di un effetto di campo originato da un terzo elettrodo. Infatti sono composti da un elettrodo di gate, un dielettrico che separa quest'ultimo da un film di semiconduttore organico ed infine due elettrodi metallici (drain e source) (Figura 5.3).

La superficie del Gate, insieme al dielettrico, costituiscono un condensatore a facce piane parallele. Una tensione positiva del Gate provoca un campo elettrico diretto perpendicolarmente alla superficie dell'isolante. Questo campo viene compensato da cariche positive presenti nel Gate e da egual numero di cariche negative indotte in prossimità della superficie tra semiconduttore e dielettrico. Si viene a formare così un canale di conduzione che collega Source e Drain. Al crescere, in valore assoluto, del potenziale tra Gate e Source (V_{gs}), il numero delle cariche indotte cresce e la conducibilità del canale aumenta. Se ora viene applicata una differenza di potenziale tra Source e Drain (V_{ds}), sarà possibile il passaggio di corrente tra i due.

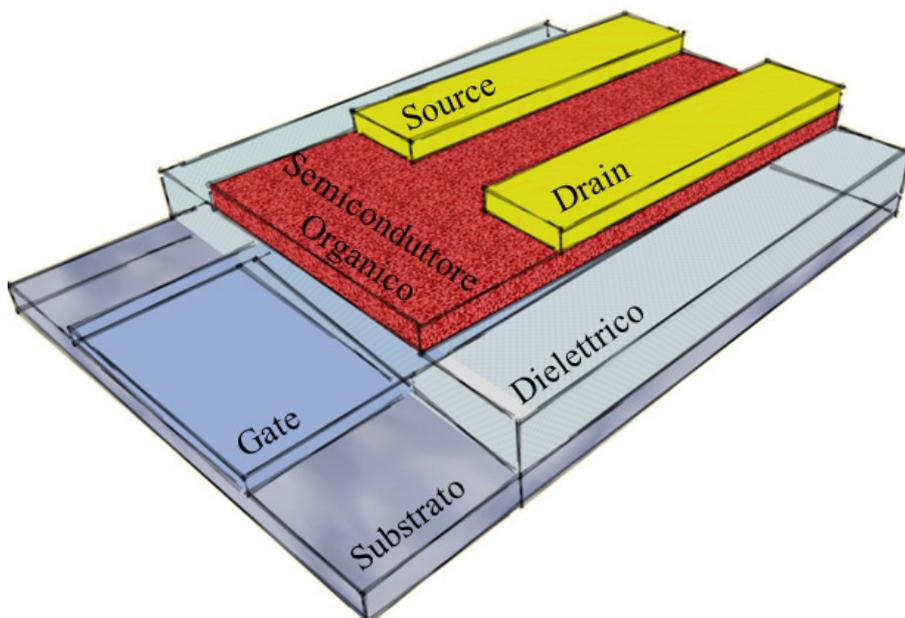


Figura 5.3: Schema di un transistor organico ad effetto di campo in configurazione top contact e bottom gate.

Gli studi fatti sui transistori a effetto di campo basati su materiali organici mostrano che il trasporto avviene in un canale di pochi nanometri, posto all'interfaccia tra semiconduttore e dielettrico [Reese, C., et al., 2007].

Quando il valore del potenziale di gate supera quello di drain, il trasporto di carica può essere considerato Ohmico con una resistenza proporzionale al numero di cariche accumulate localmente dal gate. Quando invece i campi di gate e drain si equivalgono, o si invertono, in corrispondenza del drain, il potenziale di gate non è in grado di assicurare il campo locale necessario per l'accumulo di carica. L'effetto di contrasto del drain si estende solo su una regione nanometrica vicino ad esso, in tutta la restante regione del canale il gate svolge normalmente la sua funzione. La limitazione all'accumulo di cariche in prossimità del drain genera una condizione non-ohmica per cui la corrente non aumenta all'aumentare del campo drain-source: condizione di saturazione.

Su tali dispositivi, si effettuano varie misure grazie alle quali si possono ottenere gli indici di funzionalità del dispositivo: il voltaggio di soglia (V_T) e la mobilità di carica (μ). Il V_T è il voltaggio a cui il transistor passa dalla condizione Ohmica a quella di saturazione mentre la μ è la capacità di particelle cariche di muoversi in un materiale in risposta ad un campo elettrico. Le misure da cui vengono estrapolati tali valori sono chiamate: locus ($V_{DS} = V_{GS}$), transfer (V_{DS} fisso e V_{GS} crescente) ed output multipli (V_{DS} crescente e V_{GS} fisso, a diversi potenziali). Tali misurazioni ed i valori ottenuti da esse sono importanti per osservare la conservazione o la diminuzione delle caratteristiche elettriche del dispositivo che possono essere causate dal danneggiamento del materiale organico, dalla rottura del dielettrico o dall'usura dell'interfaccia tra metallo e organico.

5.2.4 Fabbricazione di OTFT con materiali biocompatibili e biodegradabili

In letteratura si possono trovare molti studi riguardanti l'utilizzo di substrati sempre più particolari, utilizzati come supporto per la fabbricazione di transistor. Tra questi si possono

trovare l'uso della carta in quanto è un substrato pieghevole, flessibile, capace di piccoli raggi di curvatura ed è un materiale onnipresente nella società moderna. Inoltre, tale substrato è facilmente eliminabile e biodegradabile. Un altro substrato che presenta tali caratteristiche è la seta.

Oltre ai differenti materiali per il substrato, vi è una vasta gamma di biomateriali che possiedono diverse caratteristiche che gli permettono di essere utilizzati come parti funzionali all'interno dei transistor stessi.

La stragrande maggioranza dei biomateriali naturali e sintetici polimerici sono isolanti e pertanto possiedono ottime caratteristiche per essere utilizzati come dielettrici tra il gate e lo strato di semiconduttore. Ad esempio il poli (vinil alcool) è un polimero altamente polare, solubile in acqua e possiede una costante dielettrica alta [Singh et al, 2005]. Sono stati ottenuti anche degli ottimi risultati sulla sua capacità di essere biodegradato o bioescreto [Jiang et al., 2010], rendendo tale materiale un buon candidato per essere utilizzato all'interno di dispositivi impiantabili. Anche il poli metil metacrilato (PMMA) è un polimero che ha dato buonissimi risultati come dielettrico. Infatti anch'esso è lavorabile in acqua e possiede una capacità dielettrica elevata [Capelli et al., 2010]. Il PMMA inoltre ha un buon grado di biocompatibilità con i tessuti umani ed ha già trovato in campo medico svariati utilizzi, tra cui come protesi delle lenti intraoculari post rimozione della cataratta. Come cemento osseo utilizzato negli impianti per il rimodellamento dell'osso, come materiale per le protesi dentali ed anche in chirurgia estetica per ridurre le rughe o per colmare vuoti lasciati da cicatrici.

Le capacità isolanti della maggior parte di biopolimeri naturali suggeriscono che anche altri materiali possono essere utilizzati come interfacce dielettriche. Ad esempio un lavoro recente ha dimostrato che le molecole di DNA possono essere utilizzate come dielettrico funzionante [Yumusak et al., 2009]. Infatti in base a diversi trattamenti effettuati su tali molecole con alto peso molecolare (M_w 8000000 Da) si possono ottenere strati con diverse capacità dielettriche ma comunque tutti utilizzabili per lo sviluppo di transistor. Un altro biopolimero già menzionato precedentemente è stato utilizzato come materiale dielettrico: la seta. Infatti in letteratura è stato indagato l'utilizzo di tale materiale come parte integrante ed isolante di un

transistor [Capelli et al., 2009] e ne è stata riscontrata la buona funzionalità e stabilità anche in condizioni di lavoro ad alti voltaggi.

Mentre la maggior parte dei biomateriali naturali sono isolanti, vi sono alcuni esempi importanti di biomolecole semiconduttrici con proprietà elettroniche potenzialmente intriganti.

Forse, il più studiato tra la classe dei semiconduttori naturali è la melanina, un pigmento onnipresente all'interno dei corpi dei mammiferi. Dal momento che tale molecola è stata studiata sia come agente biochimico che come molecola di interesse ingegneristico, lavori recenti hanno studiato il meccanismo di conduzione elettrica, la capacità di processazione e il suo potenziale come materiale applicato alla medicina rigenerativa [Bettinger et al. 2009].

Altre molecole invece maggiormente impiegabili nella fabbricazione di transistor organici sono i carotenoidi, piccoli polieni che servono come precursori di molte biomolecole fondamentali tra cui la vitamina A. Bixin e β -carotene processati in soluzione e depositati su substrati appositi per formare un transistor organico a film sottile (OTFT), mostrano rispettivamente una mobilità dell'ordine di 10^{-6} e 10^{-7} $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Esistono anche altre piccole molecole utilizzate massivamente come semiconduttori organici, che possiedono un buon grado di biocompatibilità. Tra queste troviamo il pentacene, un semiconduttore organico di tipo p. Questa molecola è utilizzata anche per lo sviluppo di biosensori basati su transistor organici e su di essa sono stati effettuati diversi studi di biocompatibilità che sembrano riportare risultati discrepanti l'uno dall'altro. Un altro semiconduttore organico di alto interesse per l'utilizzo in dispositivi impiantabili è il perilene diimide, un colorante intensamente impiegato nell'industria cosmetica, che ha riportato un alto tasso di tollerabilità, circa 8000 mg kg^{-1} tramite esperimenti con cavie di laboratorio [Medelnick et al., 2003].

Quella qui presentata non è che una breve lista non esaustiva di materiali utilizzabili per lo sviluppo di biosensori impiantabili funzionalmente stabili; oltre a quelli citati ve ne sono infatti potenzialmente molti altri, che potranno migliorare sia il monitoraggio di malattie croniche che lo sviluppo di dispositivi bidirezionali capaci di localizzare ed agire sul problema rilevato.

5.2.5 Biosensori OFET per la rivelazione di analiti

Una delle applicazioni più studiate dell'elettronica organica/biologica ovvero la bioelettronica [Bergreen et al., 2007], in particolare dei transistor organici ad effetto di campo (OFET), è rappresentata dal loro utilizzo nel rilevamento di sostanze chimiche o di molecole biologiche. A questo proposito, recenti studi dimostrano come i dispositivi OFET sono una nuova classe di sensori in grado, in principio, di superare alcuni degli inconvenienti dei sensori attualmente presenti sul mercato.

Quando gli analiti di interesse sono volatili, i sistemi di rilevamento disponibili in commercio come gli ossidi metallici basati sulla "chimico-resistenza" offrono grande stabilità ma scarsa selettività. Nonostante la selettività migliorata dall'utilizzo di resistori organici l'affidabilità di tali dispositivi non è stata ancora provata. D'altra parte, il riconoscimento complesso degli odori, esplosivi, batteri patogeni e altre molecole ad interesse biologico è attualmente in esame tramite l'utilizzo di sensori ad array, chiamati "e-nose", che cercano di imitare il sistema olfattivo dei mammiferi. Anche se potenzialmente molto efficace, questa tecnologia non ha ancora raggiunto il livello delle prestazioni richieste dal mercato soprattutto perché è difficilmente miniaturizzabile e molto costosa. I sensori OFET invece, oltre ad avere i vantaggi elencati precedentemente, offrono la possibilità di funzionare a temperatura ambiente e ottenere dei risultati esaustivi, ripetibili e selettivi. Queste caratteristiche sono date dall'utilizzo di diversi strati organici attivi, che modificano le loro proprietà funzionali una volta venuti in contatto con l'analita. In aggiunta a questo, gli OFET sono in grado di fornire risposte multiparametriche ed hanno una maggiore sensibilità data dalla possibile polarizzazione del gate. Inoltre, la migliore biocompatibilità rispetto ai semiconduttori inorganici di piccole molecole organiche e di polimeri semiconduttori/conduttori ne aumentano le prospettive all'interno della ricerca biosensoristica.

Vi sono vari esempi di biosensori sviluppati tramite la tecnologia OFET ed una delle caratteristiche più affascinanti è che molti di essi utilizzano differenti principi di funzionamento per la rilevazione dell'analita. Questo aspetto è prevalentemente ottenuto dalla possibilità di cambiare l'architettura del dispositivo a proprio piacimento, mantenendone le

caratteristiche elettroniche e strutturali. Prendendo in considerazione, ad esempio, i biosensori per il rilevamento di DNA basati su dispositivi OFET, sono stati indagati diversi approcci per adempire al medesimo scopo. Infatti Stoliar e collaboratori [Stoliar et al., 2009] hanno osservato il cambiamento delle caratteristiche elettriche dell'OFET, date dall'assorbimento aspecifico del DNA sulla superficie dell'organico del transistor in configurazione bottom contact, mentre Lai e collaboratori [Lai et al., 2013] hanno rilevato la presenza di ibridizzazione di DNA tramite la funzionalizzazione dell'elettrodo di gate lasciato flottante. Il cambiamento di carica superficiale dato dalla formazione del doppio filamento di DNA, attira le cariche positive verso la parte esposta di gate, facendo accumulare invece quelle negative al di sotto dell'OFET, polarizzandolo.

La ricerca in questo campo ha ampliato il suo interesse anche verso lo sviluppo di biosensori in grado di analizzare meccanismi più complessi, formati da molteplici eventi biologici, che possano inoltre agire su di essi modificandoli in base alle scelte operazionali.

5.3 Tecnologie esistenti per la rivelazione di segnali bioelettrici cellulari

5.3.1 I segnali bioelettrici cellulari

Il potenziale d'azione (AP) è il potenziale elettrico raggiunto il quale avviene una rapida inversione della polarità elettrica della membrana delle cellule nervose; esso si verifica a seguito ad una stimolazione. La propagazione del AP lungo la membrana della fibra nervosa (ossia il trasferimento delle cariche ioniche) dà origine all'impulso nervoso. In condizioni di riposo le cellule presentano, a livello della membrana plasmatica, una separazione di cariche elettriche, costituita da un'eccedenza di cariche positive sulla superficie esterna. Questa differenza di carica è responsabile di un potenziale di membrana a riposo (ca. -70 mV, in quanto convenzionalmente rappresentato come negativo). Questo valore di potenziale è generato da una diseguale distribuzione (gradiente di concentrazione) degli ioni K^+ e Na^+ tra l'interno e l'esterno della cellula. In particolare, la $[K^+]$ è più alta all'interno della cellula (circa 140 mM) e bassa all'esterno circa 4 mM. D'altra parte, la concentrazione degli ioni Na^+ è elevata nell'ambiente extracellulare e (circa 144 mM) e bassa all'interno della cellula

(3-4 mM). La membrana cellulare è inoltre dotata di proteine transmembrana dette canali ionici che sono in grado di formare un poro idrofilico altamente selettivo che consente il passaggio degli ioni attraverso il doppio strato lipidico. La capacità di questi ioni di attraversare la membrana plasmatica determina la permeabilità selettiva della membrana plasmatica in condizioni di riposo.

Ciò che è importante sottolineare che il gradiente di concentrazione (o gradiente di diffusione) è la forza elettromotrice che consente il flusso di ioni attraverso la membrana. Mentre il canale ionico è il mezzo attraverso cui questo flusso avviene. Tuttavia in condizioni di riposo i canali che permeano gli ioni Na⁺ sono chiusi, mentre i canali che permeano gli ioni K⁺ sono sempre aperti. Pertanto, oltre al gradiente di diffusione nella determinazione del potenziale di membrana di una cellula a riposo, la permeabilità al singolo ione gioca un ruolo fondamentale. Queste considerazioni sono state riassunte dall'equazione di Hodgking-Katz:

$$V_{rest} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{out} + P_{Na} [Na^+]_{out} + P_{Cl} [Cl^-]_{in}}{P_K [K^+]_{in} + P_{Na} [Na^+]_{in} + P_{Cl} [Cl^-]_{out}}$$

dove V_{rest} = potenziale di membrana della cellula a riposo, R = costante dei gas, T = temperatura in Kelvin, F = costante di Faraday, P = permeabilità, [] = concentrazione e in e out stanno a significare rispettivamente intra ed extracellulare.

Ciò che è importante sottolineare è che in risposta a uno stimolo la fibra nervosa modifica la permeabilità della membrana agli ioni Na⁺ con conseguente variazione del potenziale di membrana. Quando il potenziale di membrana raggiunge un valore soglia (ca. -55 mV), attraverso l'apertura di speciali canali ionici a dipendenza di voltaggio per il Na⁺ si verifica un drammatico e rapidissimo influsso di ioni Na⁺ verso l'interno, che provoca un'inversione della polarità di membrana (con il potenziale che muta di segno da negativo a positivo) e la formazione di un potenziale d'azione: ovvero una rapida variazione di polarità di membrana. La differenza di potenziale crea una corrente ionica che stimola le altre parti della membrana, avviando così la propagazione del AP lungo la membrana della fibra nervosa, fino alle

terminazioni sinaptiche, dove causa il rilascio del neurotrasmettitore. Il AP ha differente durata a seconda del tipo di cellula 1÷2 ms: subito dopo i canali per il sodio si chiudono e si verifica l'apertura di canali per il potassio (voltage e tempo dipendenti) che provoca un flusso di ioni K^+ verso l'esterno riportando il potenziale di membrana; in questo modo vi è un rapido ritorno verso i valori del potenziale di membrana a riposo (ripolarizzazione). Una volta terminato il AP, la cellula può restare refrattaria ad altri stimoli per un lasso temporale che va dagli 0,5 all' 1,5 secondi iperpolarizzando la membrana fino a -90 mV.

5.3.2 La tecnica del patch clamp

La tecnica del patch-clamp recording [Hamill et al., 1981; Sackmann e Neher, 1983] è nata come evoluzione della classica tecnica elettrofisiologica del voltage-clamp (blocco del voltage) sviluppata per misurare gli eventi elettrici che regolano il funzionamento delle cellule eccitabili. Le principali limitazioni del voltage-clamp classico vengono eliminate dal momento che questa tecnica utilizza un solo elettrodo sia per stimolare che per registrare, consentendo quindi di studiare cellule anche di piccole dimensioni (diametro $<10 \mu m$). Inoltre, l'utilizzo di un solo microelettrodo, nella fattispecie di una micropipetta con diametro della punta relativamente grande (1-2 μm), permette una dialisi quasi perfetta dello spazio intracellulare, il che consente di separare correnti con diversa selettività ionica mediante il controllo della composizione delle soluzioni che bagnano i due lati della membrana plasmatica. Inoltre, il miglioramento delle componenti elettroniche ha consentito di costruire un amplificatore con una buona risposta temporale e basso rumore intrinseco (rumore bianco). Questa tecnica, infine, ha consentito di risolvere direttamente le correnti elementari di singolo canale. Per fare ciò infatti, devono essere soddisfatti due requisiti teorici fondamentali: 1) la presenza di un numero limitato di canali sull'area di membrana da cui si registra in modo che sia possibile ottenere un intervallo di tempo durante il quale solo uno o al massimo alcuni canali siano attivi; 2) il rumore elettrico, durante la misura di queste piccole correnti, deve essere solo una frazione di pA (10-12 pA).

La tecnica del patch-recording soddisfa questi due requisiti in quanto vengono utilizzate pipette, riempite di soluzione salina, di diametro relativamente piccolo appoggiate sulla superficie della cellula, in modo da isolare elettricamente con un sigillo (seal) una piccola area di membrana sulla quale sono presenti solo pochi canali; ed inoltre, come già detto, viene utilizzato un amplificatore con un basso rumore di fondo. Tuttavia le prime registrazioni (Neher e Sackmann, 1976) presentavano due maggiori restrizioni (basso rapporto segnale-rumore e non accuratezza dei potenziali di stimolo) dovute all'imperfetto sigillo tra la pipetta e la membrana, che determinava una resistenza elettrica di sigillo non superiore ai 150 Ohm. Infatti, definendo come resistenza di sigillo quella che si viene a formare tra la soluzione interna della pipetta, appoggiata sulla cellula, e quella del bagno nel quale si trova immersa la cellula al momento in cui si applica un impulso elettrico, attraverso questa resistenza circola una corrente di perdita denominata di "leakage" che compromette la veridicità del potenziale applicato e determina un basso rapporto segnale-rumore. Per prevenire questa corrente, la resistenza del sigillo doveva essere aumentata di 2-3 ordini di grandezza. Mediante l'accorgimento di applicare una piccola pressione negativa all'interno della micropipetta si è potuto soddisfare questa condizione (Neher, 1981); infatti, la pressione negativa che si instaura sulla punta dell'elettrodo provoca una invaginazione della membrana al suo interno che permette di ottenere quello che da allora è definito "giga-seal" avendo una resistenza intorno ai GΩ. Esso è meccanicamente stabile e determina un aumento del rapporto segnale rumore. La prima caratteristica permette, allontanando la pipetta dalla membrana, la formazione, sulla punta dell'elettrodo, di una vescicola che, dopo varie manipolazioni, può essere parzialmente distrutta senza compromettere il giga-seal; il buon rapporto segnale rumore consente invece di misurare, dalla microarea di membrana rimasta sulla punta della pipetta, gli eventi elettrici di singolo canale che per definizione sono caratterizzati da correnti di piccole dimensioni (Hamill et al., 1981; Neher, 1981). Alternativamente dopo la formazione del giga-seal applicando un'ulteriore pressione negativa l'invaginazione della membrana può essere rotta e la soluzione della pipetta perfora nel giro di pochi secondi all'interno della cellula, consentendo quindi di misurare le variazioni di potenziale o di corrente dall'intera cellula in condizioni di soluzioni intra- ed extracellulari controllate (Fig. 5.4).

Quanto appena descritto dimostra l'enorme importanza della formazione di un buon giga-seal quale punto di partenza per le quattro possibili configurazioni sperimentali che possono essere utilizzate a seconda del tipo di informazione che si intende ottenere.

La configurazione "whole cell" (cellula intera) si ottiene dopo la rottura del lembo di membrana sottostante la pipetta partendo dalla configurazione di cell-attached. E' usata per registrazioni di correnti macroscopiche dalla membrana plasmatica di cellule intere, consentendo di ottenere una bassa resistenza tra la soluzione della pipetta e l'interno della cellula. Dopo la rottura della membrana la soluzione della pipetta e quella citoplasmatica tendono ad equilibrarsi in un tempo che a seconda delle dimensioni dei soluti varia da 5 sec a 3 min permettendo quindi un totale controllo sulla soluzione intracellulare ed extracellulare. In questa ricerca è stata utilizzata la configurazione Whole-cell.

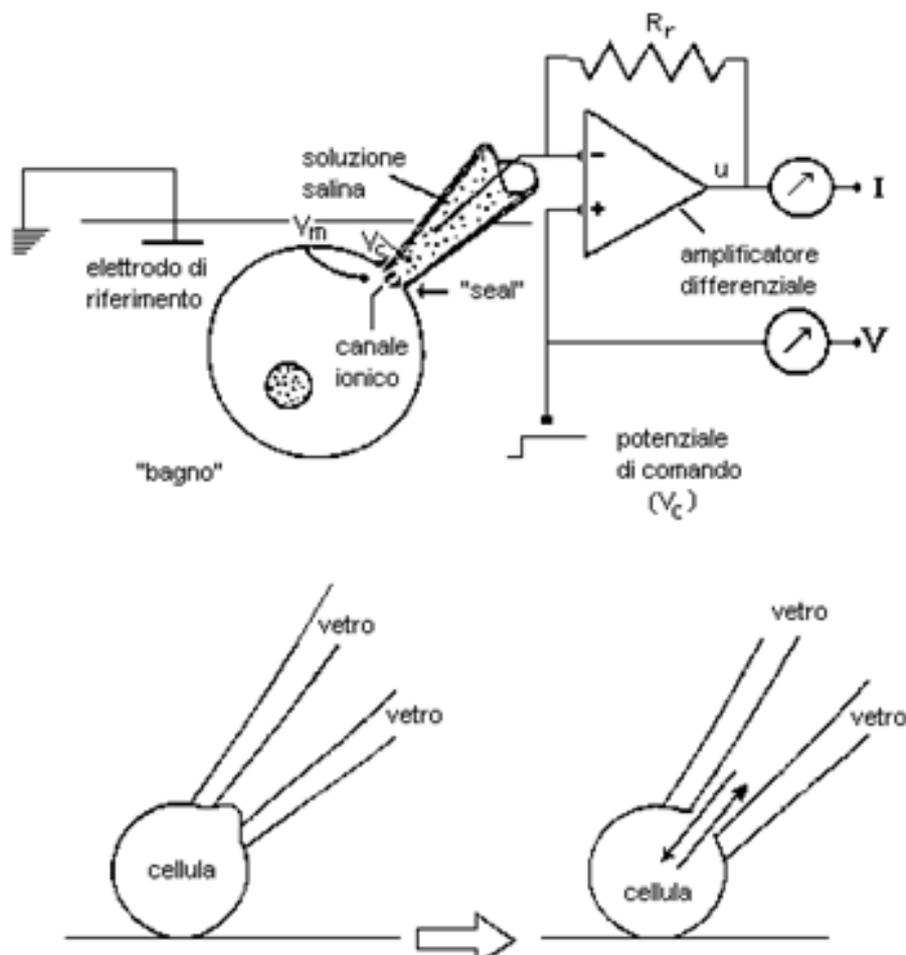


Figura 5.4 : del principio del patch clamp. La cellula dalla quale si vuole registrare è immersa in una vaschetta contenente una soluzione fisiologica in cui è posto anche l'elettrodo di riferimento. Sopra: il microelettrodo (costituito da una pipetta di vetro riempita con soluzione

salina e da un elettrodo Ag/AgCl) viene avvicinato e quindi fatto aderire alla superficie esterna della membrana plasmatica in modo da creare un sigillo che, in seguito all'applicazione di una debole pressione negativa all'interno della pipetta, raggiunge una resistenza elettrica dell'ordine dei GΩ. Viene così resa minima la perdita (leakage) di corrente dal microelettrodo verso il liquido extracellulare. La corrente misurata dal microelettrodo viene inviata all'ingresso invertente (-) di un amplificatore differenziale con funzione di convertitore corrente-tensione che invia all'uscita (u) una differenza di potenziale proporzionale all'intensità della corrente raccolta all'ingresso invertente (-). Al suo secondo ingresso (+, non invertente) può essere applicato un potenziale di comando (V_c), ottenuto da un generatore esterno, con il quale si blocca il potenziale di membrana a valori relativi all'elettrodo di riferimento.

Da configurazione di "cell-attached", in cui il microelettrodo è appoggiato sulla membrana plasmatica della cellula, è possibile ottenere, applicando una ulteriore pressione negativa, la configurazione di "whole cell" (cellula intera), in cui c'è continuità tra il liquido citoplasmatico e la soluzione della pipetta. Nella prima configurazione si possono studiare i canali compresi nell'area di membrana circoscritta dalla punta della pipetta; nella seconda si possono registrare le correnti da tutta la membrana della cellula.

Come si evince da quanto illustrato sinora la tecnica del patch clamp è un metodo alquanto invasivo, elaborato e che richiede una esperienza consolidata nell'interpretazione dei risultati. Pertanto questa tecnica non è adatta ad analisi ad alta resa in termini quantitativi. In quest'ottica numerosi studi sono stati rivolti ad approcci alternativi per monitorare e modulare i segnali bioelettrici cellulari.

5.3.3 Metodi ottici e fluorimetrici

L'analisi delle variazioni di emissione e/o di assorbimento di molecole fluorescenti attraverso determinazioni spettrofluorimetriche o altresì dette microfluorimetriche, è una degli approcci maggiormente impiegate in alternativa rispetto alla laboriosa tecnica del patch-clamp, per monitorare le variazioni dell'attività bioelettrica cellulare.

Queste tecniche si basano sul principio che molecole di sintesi variano il loro status in funzione in funzione all'ubicazione delle stesse intra o extracellulare..

Queste ultime molecole sono dette voltage sensitive dyes. Tra queste il DisBAC₂(3) bis-(1,3-acido dibutilbarbiturico)-trimetino oxonolo è un colorante voltaggio-sensibile utilizzato per studiare i cambiamenti del potenziale di membrana cellulare duraturi. Infatti, non è utilizzabile per la rilevazione di eventi come potenziali d'azione o eventi rapidi in quanto non possiede una cinetica abbastanza veloce. Più la cellula si depolarizza, più questo colorante, essendo anionico, entra all'interno di essa. Qui interagisce con le proteine cellulari esibendo un aumento della fluorescenza ed uno spostamento del suo spettro verso il rosso. Quindi nell'incremento della depolarizzazione cellulare, vi è anche un incremento di fluorescenza avendo maggiore presenza di colorate anionico all'interno della stessa. Conseguentemente quando vi è un'iperpolarizzazione cellulare la fluorescenza decresce in quanto il colorante anionico fuoriesce dalla cellula [González et al., 1997]

5.3.4 Matrici di Micro elettrodi per la registrazione extracellulare

I Micro electrode arrays, (MEA) sono dispositivi che permettono di leggere il segnale extracellulare di cellule bioelettricamente attive (elettrogeniche) e di imporre stimolazioni elettriche alle stesse per studiarne il comportamento o per modificarne l'attività biologica.

Esistono due classi generali di MEA: quelli impiantabili e quindi utilizzabili in vivo e quelli non impiantabili, utilizzati in vitro.

I MEA standard utilizzati in vitro possiedono diverse matrici aventi 8x8 o 10x16 elettrodi ciascuna, composti tipicamente da ITO o da titanio di un diametro che oscilla tra i 10 ed i 30 µm, mentre la superficie resistiva è composta da SiO₂ o materiali plastici isolanti.

I dispositivi MEA utilizzati in vivo come impianti sono di tre categorie: a microfilari (in tungsteno), in silicio o a microelettrodi flessibili in poliimide o parilene.

I Neuroni e le cellule muscolari quando si eccitano creano correnti ioniche attraverso le loro membrane, causando una variazione di tensione sia all'interno che all'esterno della cellula. Il MEA registra la variazione di tensione data dallo spostamento di ioni tra i due compartimenti cellulari. Inoltre con esso è possibile stimolare eventi bioelettrici cellulari tramite l'applicazione di un potenziale agli elettrodi, che si trasduce in correnti ioniche tramite la

soluzione. Ciò attiva i canali ionici voltaggio-dipendenti: ciò provoca una variazione del potenziale di membrana cellulare evocando potenziali d'azione in neuroni o contrazione in cellule muscolari.

La dimensione e la forma del segnale registrato dipenderà da diversi fattori: la natura del mezzo in cui si trovano le cellule (ad esempio conducibilità elettrica del mezzo di coltura, capacitanza, e omogeneità), la natura del contatto tra le cellule e l'elettrodo MEA (superficie di contatto e tenuta), la natura dell'elettrodo MEA stesso (ad esempio la sua geometria, l'impedenza, e il rumore), l'elaborazione del segnale analogico (ad esempio il guadagno del sistema e le frequenze di taglio) e dalle proprietà di campionamento del sistema ed l'elaborazione digitale.

Quando vengono analizzate colture cellulari sul MEA, cellule individuali possono posizionarsi sugli elettrodi componenti quest'ultimo (Figura 5.5). Il corpo cellulare copre parzialmente la superficie dell'elettrodo, la cui restante parte "libera" rimane in contatto con la soluzione esterna connessa a massa. All'elettrodo è collegato un amplificatore che registra la somma dei potenziali sulla superficie dell'elettrodo libera e su quella coperta dalla membrana cellulare. Trascurando la bassa resistenza R_b della soluzione sugli elettrodi "liberi", la relazione tra il voltaggio sul pad di contatto (V_{pad}) e quello tra la membrana cellulare e l'elettrodo (V_j) è data dalla relazione (indipendente dalla frequenza):

$$\frac{V_{pad}}{V_j} = \frac{C_{JE}}{C_E + C_{sh}} \approx \frac{a_{JE}}{a_E}$$

dove C_{JE} è la capacità dell'elettrodo coperto di area a_{JE} , C_E è la capacità dell'intero elettrodo di area a_E , e C_{sh} è la capacità tra la linea di conduzione e massa. Dato che $C_{sh} \ll C_E$ l'ampiezza del segnale registrato dipende linearmente dal rapporto tra l'area dell'elettrodo coperto e l'area totale dell'elettrodo (Figura 5.5).

Quindi, grazie a questa immagine seppur semplificata del funzionamento del MEA, si può facilmente dedurre che avendo un isolamento ideale, e quindi un C_{sh} trascurabile, e considerando i filtri passabanda ideali (impedenza di ingresso infinita, bassa frequenza di taglio nel filtro passa basso e alta in quello passa alto), gli elettrodi MEA possono essere

utilizzati come inseguitori di tensione indipendenti dalla frequenza per monitorare segnali cellulari senza corrente [Buitenweg et al., 2003].

Con tale sistema quindi è possibile registrare attività di diverse cellule da più siti su di una stessa matrice, applicare su di essi differenti protocolli di stimolazione e ricevere simultaneamente i dati da tutti gli elettrodi che compongono una stessa matrice.

Il MEA però possiede diversi svantaggi in entrambi le classi di sviluppo: in vitro ed in vivo.

Infatti, in vitro tale sistema è poco adatto alla registrazione ed alla stimolazione di singole cellule avendo una bassa risoluzione spaziale ed un basso rapporto tra segnale e rumore, nelle registrazioni su diverse tipologie di cellule bioelettricamente attive o precocemente piastrate sul substrato.

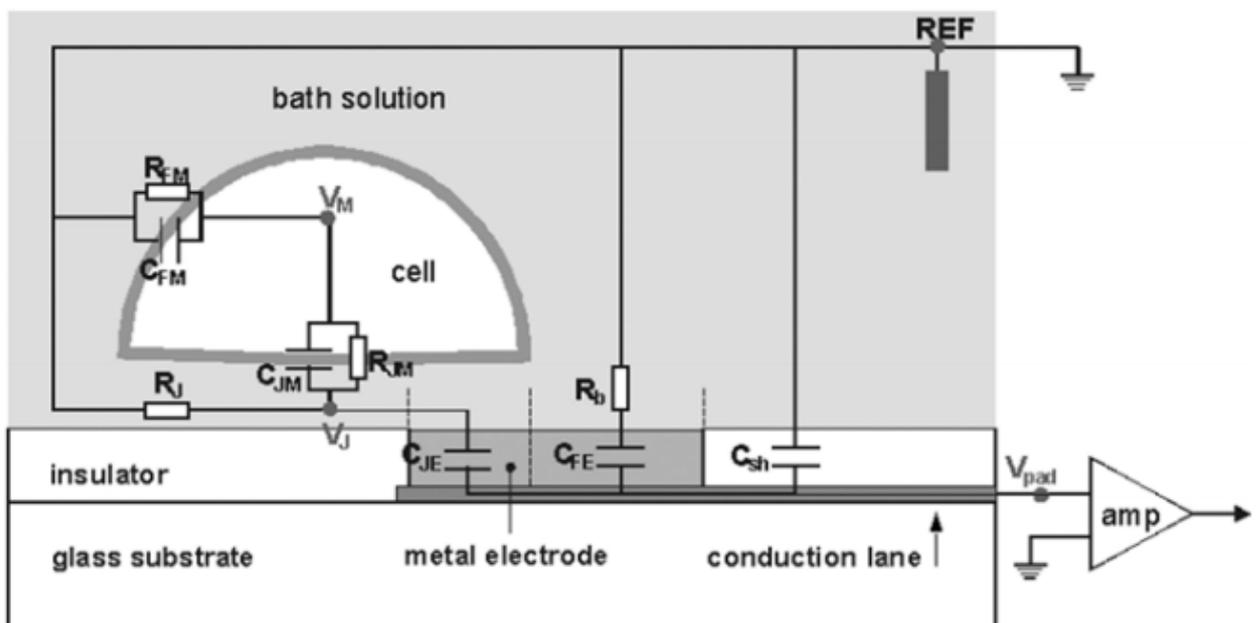


Figura 5.5: Registrazione extracellulare del segnale dell'attività di singola cellula su elettrodi planari. Dato il circuito elettrico la tensione in ingresso (la tensione tra i contatti dell'elettrodo ed l'elettrodo di riferimento) all'amplificatore può essere calcolata come $V_{pad} = V_{overlap} * (A_{overlap} / A_{electrode})$.

In vivo invece vi sono delle risposte biologiche di tipo infiammatorio severe verso gli impianti di multi electrode array, in particolare in quelli cronici. Tra i più considerevoli di

questi effetti è la morte neuronale, la formazione di cicatrici gliali e una diminuzione del numero di elettrodi funzionanti [Birar et al., 2005]. La risposta tissutale dell'impianto dipende da molti fattori tra cui la dimensione degli elettrodi del MEA, la distanza tra di essi ed in particolare il materiale che li costituisce ed il metodo di inserimento. Le risposte dei tessuti si suddividono tipicamente in breve e lungo termine. La risposta a breve termine si verifica in poche ore dall'impianto e inizia con una proliferazione degli astrociti e delle cellule gliali che circondano il dispositivo. La microglia reclutata quindi avvia il processo infiammatorio e di fagocitosi del materiale estraneo. Nel corso del tempo, gli astrociti e la microglia reclutati attorno agli elettrodi cominciano ad accumularsi, formando una guaina che circonda la matrice e che si estende per decine di micrometri intorno al dispositivo. Questo non solo aumenta lo spazio tra le cellule bioelettricamente attive e gli elettrodi, ma isola anche gli elettrodi aumentandone l'impedenza.

5.3.5 Transistor basati su tecnologia inorganica

L'interfacciamento diretto delle cellule nervose e dei semiconduttori è la base fisica per lo sviluppo di dispositivi ibridi neuroelettronici come neurocomputer e neuroprotesi. Sebbene i segnali extracellulari sono significativamente più piccoli delle variazioni di tensione del transmembrana, dispositivi ad effetto di campo consentono delle registrazioni a lungo termine e non invasive dei segnali extracellulari con una buona risoluzione spaziale e la temporale. I segnali possono essere registrati da singoli neuroni, da piccole reti di neuroni e da aree di grandi dimensioni utilizzando porzioni di cervello o di nervi.

Il primo tentativo di applicare un FET in misurazioni neurofisiologiche è stato già segnalato negli anni '70 del secolo scorso [Bergveld, P., et al., 1976]. Più di recente, è stata segnalata la prima registrazione di singoli neuroni di vertebrati [Fromherz P., et al., 1991] ed invertebrati [Vassanelli S., et al., 1998] così come di colture cellulari di cardiomiociti, coltivando quest'ultime sul dielettrico di GATE di un FET.

Il principio di funzionamento di tale dispositivo si basa sul fatto che l'attività bioelettrica di un neurone è basata sullo spostamento di corrente ionica attraverso la membrana cellulare. Tale spostamento porta ad una variazione di tensione nella fessura che si viene a creare tra la membrana cellulare e lo strato dielettrico di gate. Questo mutamento di tensione modula la

corrente di drain e source, avendo quindi un segnale da rilevare correlato all'attività bioelettrica.

Tali dispositivi sono stati utilizzati per molteplici studi tra quelli riguardanti la funzionalità dei canali K^+ [Peitz I, et al., 2007], Na^+ [Schmidtner M., et al., 2006] e Cl^- [Offenhäusser A., et al., 2007], l'attivazione dei recettori della serotonina ricombinanti [Peitz I, et al., 2007], l'attività spontanea delle cellule del miocardio ed altri ancora.

Anch'essi però, essendo composti da materiali inorganici possiedono una bassa affinità con l'ambiente biologico, portando ad una bassa e poco duratura vitalità cellulare sul substrato dielettrico in vitro (solitamente composta da SiO_2) ed a ingenti risposte del sistema immunitario contro gli impianti in vivo. Inoltre, dispositivi transistor inorganici IS-FET consentono di registrare l'attività bioelettrica cellulare ma non di modularla o stimolarla.

5.4 SCOPO DELLA RICERCA

Le questioni aperte sulla comprensione dei meccanismi di funzionamento del Sistema Nervoso e la necessità sviluppare metodi di analisi efficaci di farmaci, hanno stimolato lo sviluppo di tecnologie avanzate in grado di produrre dispositivi biomedici in grado di stimolare e registrare le attività bioelettriche delle cellule in tempo reale.

Molti studi su Multi Electrode Array (MEA) hanno dimostrato la capacità di stimolare e di rilevare segnali elettrici in cellule elettrogeniche [Johnstone et al., 2010; Novellino et al., 2011; Nam et al., 2011]. Tuttavia, è noto che l'accoppiamento elettrodo/cellula e l'impedenza dipendente dalle dimensioni dell'elettrodo sono dei fattori che limitano la rilevazione da parte del MEA [Poghossian et al., 2009; Brüggemann et al., 2011] e che rendono problematica la sua applicabilità nell'analisi di diversi tipi cellulari tra cui quelli in fase precoce di maturazione o piastratura [Nam et al., 2011].

I Transistor ad effetto di campo (FET) basati su semiconduttori inorganici sono stati utilizzati per effettuare registrazioni extracellulari di neuroni e cardiomiociti dato che il contatto metallo-elettrolita e l'effetto dato dalle capacità parassite sono trascurabili [Poghossian et al.,

2009, Fromherz e al., 1991, Besl et al., 2002, Voelker et al., 2005]. Tuttavia, tali gli approcci forniscono non consentono la stimolazione delle cellule dal dispositivo FET e le limitazioni di sensibilità dovute al basso accoppiamento capacitivo possono essere superate solo attraverso lo sviluppo di complesse architetture su scala nanometrica [Cohen-Karni et al., 2009; Patolsky et al., 2006; Duan et al., 2012]. Inoltre, i semiconduttori inorganici non sono ideali per l'interfacciamento con i sistemi viventi a causa della loro limitata biocompatibilità [Voskerician et al., 2003] e della rigidità meccanica.

I materiali organici ed i transistor organici ad effetto di campo a film sottile (OTFT) offrono notevoli vantaggi rispetto ai tradizionali dispositivi a base di silicio tra cui il miglioramento a lungo termine biocompatibilità, la flessibilità meccanica ed il basso costo di fabbricazione [Sirringhaus et al., 2005; Mabeck et al., 2006; Muccini et al., 2006; Bystrenova et al., 2008; Tonazzini et al., 2010; Ghezzi et al., 2011].

Vi sono diversi saggi di biocompatibilità di materiali organici in letteratura che mostrano la crescita e la sopravvivenza di cellule neuronali primarie e secondarie su film sottili di pentacene [Bystrenova et al., 2008; Tonazzini et al., 2010] così come la stimolazione ottica dei neuroni da parte del poli(3-esiltiofene).

I dispositivi elettronici integrati formati da materiali riassorbibili destinati ad impianti medici temporanei sono stati studiati da diversi anni [Bettinger et al., 2010; Kim et al., 2010], e l'effetto dell'immersione in acqua e le condizioni di sterilizzazione mediche degli OTFT formati da semiconduttori di tipo-p sono stati già ispezionati [Roberts et al., 2008; Kuribara et al., 2012; Spijkman et al., 2010]. Tuttavia, l'effetto dato dall'esposizione all'ambiente di coltura cellulare (5% CO₂, 95% di umidità e temperatura di 37 ° C) a lungo termine (giorni e settimane ad esempio) sulle performance dell'OTFT non è mai stato indagato.

Derivati del perilene, sotto forma sia di polimeri che di sistemi molecolari, sono potenziali candidati per l'integrazione nei dispositivi biocompatibili. Infatti, quando vengono impiegati come fluorocromi per la colorazione di cellule viventi hanno mostrato una buona biocompatibilità, anche con i neuroni ippocampali [Margineanu et al., 2007; Zhao et al., 2009]. Inoltre, i derivati perilenici diimide sono stati utilizzati per realizzare OTFTs () [Hak

Oh et al., 2007] unipolari stabili all'aria, nonché transistori ambipolari eterostrutturati a base organica [Dinelli et al., 2007].

Il mio lavoro di tesi dell'ultimo anno stato basato pertanto sullo studio di un dispositivo strutturato come un OFET basato su ditridecilperilene-3,4,9,10-tetracarbossilico diimide (P13), che consentisse sia la stimolazione e la registrazione dei neuroni primari delle radici dei gangli dorsali (DRG) [Benfenati et al., 2013]. Tecniche e competenze complementari di elettrofisiologia elettronica organica e biologia cellulare e molecolare sono state necessarie per sviluppare lo studio.

5.5 Materiali e metodi

5.5.1 Misure spettroscopiche

Le misure di assorbimento sono state effettuate tramite l'utilizzo dello spettrometro JASCO V-550 con una risoluzione spettrale di 0,5 nm. Per ottenere lo spettro di fotoluminescenza il film di perilene del transistor è stato eccitato a 440 nm dal laser He: Cd. La luminescenza risultante è stata filtrata usando un filtro passa-basso con una lunghezza d'onda di cut-off di 480 nm successivamente registrata usando un analizzatore ottico multicanale (Hamamatsu OMA). Le immagini superficiali di fluorescenza sono state ottenute grazie ad un scanner confocale Nikon EZ-1 connesso al microscopio ottico Nikon TE2000. Il film è stato eccitato a 488 nm e la luminescenza registrata dopo 100 μm dal pinhole per incrementare la risoluzione spaziale.

5.5.2 Immagini AFM

Le immagini topografiche AFM sono state ottenute tramite l'utilizzo del NT-MDT scanning probe microscope in modalità tapping con il campione lasciato in aria.

5.5.2 Misure dell'angolo di contatto

L'angolo di contatto di mezzo di coltura cellulare (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) addizionato con v/v siero fetale bovino) su substrati di vetro, vetro trattato con poli-D-lisina (PDL)/lamina, P13 e P13 trattato con PDL /lamina è stato misurato usando il metodo statistico sessile drop usando Digidrop GBX Model DS. Per ogni film sono state misurate 5 gocce. Le gocce di terreno di coltura usate per ogni singola misura ammontavano a 1 μ l.

5.5.3 Fabbricazione dell'OTFT e caratterizzazione elettrica

I dispositivi sono stati fabbricati su un substrato di vetro rivestito con uno strato di ossido di indio e stagno (ITO) di 150 nm di spessore che funge da elettrodo di gate. Il substrato è stato pulito per mezzo di sonicazioni multiple con diclorometano, acetone, etanolo e acqua UHP prima di depositare su di esso un film sottile di 600 nm di PMMA (AllResist) per spin coating. Dopo un trattamento di ricottura durante la notte in atmosfera controllata lo spessore della pellicola di PMMA si riduce a circa 450 nm. La capacità dello strato dielettrico PMMA è 7,08 nF/cm².

15 nm di film sottile di semiconduttore organico P13 (Sigma-Aldrich) vengono cresciuti su vetro / ITO / PMMA tramite sublimazione in alto vuoto ad una pressione di base di 10⁻⁶ mbar in una camera auto Edwards 306. Il tasso di crescita è stato fissato a 0,1 Å / s.

30 nm di spessore elettrodi d'oro sono stati depositati per evaporazione sullo strato di organico in alto vuoto ad una pressione di base di 10⁻⁶ mbar a un tasso di crescita di 1 Å / s. La lunghezza e la larghezza del canale sono di 70 μ m e 15 mm, rispettivamente. Successivamente uno strato di copertura di P13 spesso 50 nm è stato sublimato sotto vuoto sui dispositivi OTFT bottom-gate/top-contact. Connessioni elettriche per polarizzare il dispositivo sono state realizzate sulla regione di ITO graffiando parzialmente il PMMA (connessione di gate) e sulle regioni degli elettrodi d'oro mantenute libere dallo strato di

copertura di P13 (connessione di drain e source). La caratterizzazione elettrica degli OTFT è stata eseguita utilizzando una probe station SUSS accoppiata ad un analizzatore dei dispositivi a semiconduttore B1500A Agilent. VDS è la tensione drain-source, mentre V_{GS} è la tensione gate-source. Le curve locus sono ottenute variando $V_{GS} = VDS$ da 0 a 100 V e viceversa. Le curve di multiple output sono ottenute variando VDS da 0 a 100 V e mantenendo costante per ogni curva V_{GS} (0,20,40,60,80,100 V).

5.5.4 Simulazioni numeriche del campo elettrico e del campo elettrostatico

Le simulazioni numeriche del dispositivo OTFT sono state effettuate utilizzando il simulatore di dispositivi a semiconduttori Sentaurus da Synopsys Inc.1. E' stata creata una struttura 2D costituita da uno strato di semiconduttore organico (P13) sopra di uno strato dielettrico (PMMA) , due elettrodi laterali in oro (drain e gate) e infine un altro strato di P13 su quest'ultimi. Il dominio della simulazione è stato fatto corrispondere ai confini degli elettrodi metallici, inseriti tra due strati di P13. Gli spessori inseriti sono i medesimi di quelli utilizzati per la fabbricazione dei dispositivi precedenti.

Nei modelli fisici utilizzati durante le simulazioni, le proprietà elettriche del dispositivo sono descritte tramite le equazioni di Poisson e di continuità (come per i semiconduttori inorganici). Al fine di avere una migliore comprensione delle proprietà del campo elettrostatico all'interno della struttura del dispositivo, il calcolo vettoriale del campo elettrico è stato attivato con il potenziale scalare elettrostatico usuale. Pertanto, l'analisi 2D del dispositivo è stata condotta tracciando vettori campo elettrico sopra il potenziale elettrostatico rappresentato dalla scala di colore.

5.5.5 Preparazione delle culture di neuroni delle radici dei gangli dorsali

Tutti gli esperimenti di preparazione di colture cellulari di neuroni del nucleo del ganglio dorsale sono state effettuate presso il Dipartimento di Fisiologia Umana e Generale

dell'Università degli Studi di Bologna. Tutte le procedure sono state effettuate secondo protocolli approvati dal comitato etico competente.

I ratti (Sprague-Dawley) vengono anestetizzati tramite alotano e uccisi per decapitazione. Circa 30 gangli sono rimossi dai ratti, le radici vengono tagliate e poi vengono conservati in ghiaccio in PBS freddo. Dopo essere risciacquati in mezzo Dulbecco (DMEM, Gibco), i gangli sono posti in DMEM contenente 5000 U / ml di collagenasi di tipo IV (Wentington) per 60-75 minuti a 37 ° C, 5% CO₂. Le cellule vengono lavate due volte tramite risospensione e centrifugazione e successivamente opportunamente diluite in 1 ml di mezzo DMEM contenente 10% siero fetale bovino (FBS). La sospensione cellulare è stata coltivata su differenti substrati: su vetrini rotondi con un diametro di 19 mm su cui sono stati sublimati 15 nm di P13, sullo strato organico di copertura dell'OTFT ed infine su matrici del Multi electrode array (MEA sistemi multicanale, MCS, Reutlingen, Germania).

Vetrini, film di P13, OTFT e dispositivi MEA sono stati pre-rivestiti con 50 mg / ml di poli-D-lisina, seguita da 10 mg / ml di laminina (Sigma), e poste in incubatore a 37 ° C, 5% CO₂. Le cellule sono state mantenute in terreno Dulbecco Modified Eagle (DMEM, Gibco) addizionato con 10% FBS in presenza di 50 ng / ml di fattore di crescita nervoso (NGF), e di citosina β -D-arabinofuranoside, (AraC, Sigma) (1,5 μ g / ml) per ridurre l'espressione delle cellule non neuronali.

Nell'esperimento di registrazione extracellulare è stata piastrata la medesima quantità di sospensione cellulare di DRG dallo stesso animale su OTFT e sui chip MEA.

5.5.6 Stimolazione extracellulare e misura ottica del voltaggio di membrana

Le misurazioni sono state effettuate dopo 48-72 ore dalla piastra tura della coltura di DRG su OTFT, utilizzando una stazione di misura situata nel medesimo alloggiamento del patch clamp. Per la stimolazione a rampa continua imposta all'OTFT è stato utilizzato un Keithley 2612A SourceMeter a doppio canale. Il protocollo di polarizzazione per la stimolazione delle cellule è descritto nei risultati.

DisBAC4 (3), colorante sensibile al cambiamento di tensione è stato acquistato da Invitrogen. 3 μ M di soluzione madre di colorante è stata preparata seguendo le istruzioni del produttore. Le cellule sulla parte superiore dell'OTFT sono state lavate con soluzione salina e incubate in 3 μ M di colorante in soluzione salina per 30 minuti a temperatura ambiente (22 ° - 25 °C). Dopo aver lavato tre volte con soluzione salina di controllo, l'OTFT contenente cellule è stato montato nella camera ed è stata effettuata una misura imaging utilizzando LSCM (microscopia confocale a scansione laser).

Per monitorare il comportamento di fluorescenza delle cellule prima, durante e dopo il funzionamento del dispositivo, sono state catturate 65 immagini su di un singolo piano ad una frequenza di 1 Hz.

La quantificazione della fluorescenza è stata effettuata per mezzo di un software commerciale (ImageJ). Il bianco è stato considerato come il fit lineare della variazione di fluorescenza delle cellule che non rispondono con attività bioelettrica. La curva di fit lineare è stata sottratta da un punto all'altro di variazione di fluorescenza delle cellule che rispondono.

La variazione di fluorescenza cellulare è stata calcolata come $F_t - F_{t0} / F_{t0}$ ($\Delta F_t / F_t$), dove F_t è la media di fluorescenza sull'area quantificata a diverse tempistiche e F_{t0} è la media di fluorescenza registrata all'inizio dell'esperimento. Come controllo per la lettura ottica del voltaggio di membrana su cellule neuronali, le cellule DRG su OTFT sono state esposte alla soluzione contenente 40 mM K⁺, preparato mediante sostituzione equimolare di NaCl con KCl. È ben noto che alte concentrazioni di potassio extracellulare causano una depolarizzazione forte nei neuroni DRG [Douglas Fields et al., 1990]. Lo spostamento esatto del potenziale di membrana per mezzo del patch-clamp era circa di 40 mV [Everill et al., 1998]. Una curva di variazione di fluorescenza è stata generata come sopra descritto e la massima variazione di fluorescenza è stata correlata a questo valore.

La traccia riportata in Figura 5.16 corrisponde alla variazione media di fluorescenza in funzione del tempo di osservazione in quattro cellule diverse poste su quattro differenti dispositivi.

5.5.7 Misure di fluorescenza su calceina-AM

Le misurazioni sono state effettuate dopo 72 ore di piastratura dei DRG su OTFT utilizzando una stazione di misura situata nel medesimo alloggiamento di quello del patch clamp. Per le stimolazioni elettriche applicate all'OTFT è stato utilizzato un Keithley 2612A SourceMeter a doppio canale. L'impulso di polarizzazione per stimolare le cellule è descritto nei risultati.

Calceina-AM è stata acquistata da Invitrogen. La soluzione stock (5mM) di colorante è stata preparata seguendo le istruzioni della ditta venditrice. Le cellule sulla parte superiore dell'OTFT sono state lavate con soluzione salina e incubate in 1 μ M di colorante diluito in soluzione salina, tenendolo per 30 minuti a temperatura ambiente (22 ° -25 °C). Dopo aver lavato tre volte con soluzione salina di controllo, l'OTFT contenente le cellule è stato montato su un microscopio TE Nikon 2000 dotato di LED di eccitazione a 488 nm e specchio dicroico per la raccolta di segnali a 515 nm. Per monitorare il comportamento di fluorescenza delle cellule prima, durante e dopo il funzionamento del dispositivo, una serie di immagini di fluorescenza sono state catturate da una telecamera CCD a una frequenza di 2 Hz. La quantificazione della fluorescenza nelle regioni di interesse (ROI) è stata eseguita per mezzo del software Meta-fluor. La variazione di fluorescenza cellulare è calcolata come F_t/F_{t0} , dove F_t è la media di fluorescenza sull'area quantificata a tempi differenti e F_{t0} è la media di fluorescenza registrata all'inizio dell'esperimento.

5.5.8 Test di vitalità cellulare

Colture cellulari di DRG piastrate sui diversi substrati (film sottili di P13, vetro e OTFT) trattati da poli-D-lisina + laminina sono state montate sull'apposito portacampioni e lasciate ad incubare per 5 min con fluoresceina diacetato (Sigma Aldrich). Dopo il lavaggio con la soluzione fisiologica una sequenza di immagini sono state raccolte usando un Nikon Eclipse 2000 E LSCM in condizioni di backscattering adoperando obiettivi a 20X, 40X o 60X ad olio e laser 405 nm diodo, 488 nm Ar + e 543 nm He-Ne per l'eccitazione del campione [M.

A. Loi et al., 2003]. Il laser 488 nm Ar + laser è stato utilizzato per eccitare la fluorescenza dei coloranti FDA, DisBAC4 e Alexa Fluor 488. Lo specchio dicroico implementato nella testa di scansione è il Q497LP Chroma. Il segnale di fluorescenza verde (coloranti FDA e Alexa Fluor 488) è stato raccolto nel campo spettrale 515 ± 20 nm e il segnale di fluorescenza rossa (DisBAC4 colorante e P13 a film sottile), sono stati raccolti a lunghezze d'onda > 600 nm.

Per le analisi riguardanti il conteggio delle cellule, quindici immagini sono state catturate per ogni condizione. Tale esperimento è stato eseguito tre volte. La fluorescenza delle cellule piastrate sul'OTFT e il segnale di fotoluminescenza del film P13 sono stati raccolti attraverso il substrato di vetro del dispositivo.

5.5.9 Lunghezza dei neuriti

La lunghezza media dei neuriti è stata determinata misurando la lunghezza di un'immagine catturata a 40X in campo chiaro. La quantificazione è stata effettuata per mezzo di un software commerciale (ImageJ). Sono stati analizzati dieci campi contenenti ognuno almeno tre neuroni DRG. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato.

5.5.10 Immunofluorescenza

Culture di DRG piastrate su substrati di 15 nm di P13 sono fissate con 4% p / v paraformaldeide in 0,1 M tampone fosfato salino (PBS) per 10-15 min a temperatura ambiente (RT, 20-24 ° C). Dopo il bloccaggio con 3% di sieroalbumina bovina (BSA) in PBS per 15 minuti a RT, le cellule sono state incubate con anti-topo NeuN (Millipore) o anti-topo-GAP43 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) purificato per affinità anticorpi e diluito 1:100 in soluzione di blocco di cui è stato aggiunto 0,1% di Triton X100. Il giorno dopo, le cellule sono state incubate con Alexa Fluor 488 coniugato asino anti-topo diluito 1:1000 in soluzione di blocco contenente 0,1% Triton X100. L'indagine di microscopia confocale a scansione laser (LSCM) è stata effettuata utilizzando il microscopio Nikon Eclipse 2000-E.

5.5.11 Patch-clamp

Le pipette per effettuare gli studi di patch sono state preparate da capillari sottili di vetro borosilicato con un buco finale di grandezza tale da avere una resistenza della punta di 2-4 M Ω una volta riempita con la soluzione di standard interna. Le correnti di membrana sono state amplificate (lista EPC-7). Esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente (20-24 ° C). Sono stati scelti per l'analisi elettrofisiologica i neuroni primari DRG, una popolazione eterogenea di neuroni con diametro piccolo (<30 μ m) [Kitamura et al., 2005; Zhang et al., 2011]. Con soluzione salina di controllo intracellulare ed extracellulare, le cellule vengono mantenute a -60 mV e sono stati iniettati al loro interno “treni” di impulsi di corrente con un'ampiezza di 50-350 pA, composti da gradini crescenti di 50 pA e da una durata di 100 ms per stimolare potenziali d'azione e proprietà di lavoro neuronali. Il transiente capacitivo è stato compensato dall'azzeramento del circuito d'amplificatore e di registrazione. Il potenziale di membrana a riposo (V_{MEM}) è stato misurato ed ottenuto dopo 1 minuto di registrazione stabile (Figura 1d, lettera a). La soglia (I_{th}) è stata definita come la corrente minima necessaria per evocare un AP. La soglia di tensione AP (V_{th} , Fig 1d, lettera b) è stata definita come il primo punto di inizio della parte ascendente un AP. L'ampiezza AP (Figura 1d, lettera c) è stata misurata tra il picco (Figura 1d, lettera d), ed il livello di soglia AP. Il tempo AP è stato definito come il tempo per l'aumento del segnale da quello basale al culmine del picco. Dopo l'iperpolarizzazione (AHP) è stata misurata l'ampiezza (Figura 1d, lettera f) tra il massimo dell'iperpolarizzazione ed il voltaggio finale a plateau e la durata AHP è il tempo che intercorre tra i due punti (Figura 1d, lettera e).

5.5.12 Stimolazione con l'OTFT e lettura con il patch-clamp

Per monitorare la variazione del V_{MEM} data dalle stimolazioni con l'OTFT, misure di whole cell current clamp sono state eseguite in continuo durante le stimolazioni. Tutti i sistemi di

analisi sono stati interfacciati e l'elettrodo di riferimento di Ag/AgCl del patch clamp è stato collegato sia al source dell'OTFT che alla massa generale del sistema. Le differenze di potenziale in modalità pulsata e continua applicate al dispositivo sono state imposte dal Keithley 2612A SourceMeter a doppio canale. Il protocollo di polarizzazione per la stimolazione delle cellule è descritto nei risultati. Si noti che l'impulso mancante nel treno di impulsi di tensione riportato in Figura 2, 4, è dovuto al SouceMeter, che aumenta di 1 sec (rispetto alla impostazione standard del ritardo di 500 ms) il ritardo tra gli impulsi numeto 31 e 32.

5.5.13 Registrazione extracellulare dell'OTFT

L'attività dei DRG è registrata dopo 48-72 ore di piastratura tramite un sistema di interfacciamento tra l'OTFT ed il sistema di amplificazione e di rilevamento del MEA. Le stimolazioni pulsata al gate e continua al drain sono applicate per mezzo del Keithley 2612A SourceMeter a doppio canale. Il protocollo di polarizzazione per evocare l'attività bioelettrica neuronale è descritto nei risultati. Il segnale di corrente dall'elettrodo drain viene raccolto e convertito in tensione introducendo una resistenza da un 1 k Ω inserita tra l'elettrodo e l'amplificatore del MEA. I segnali vengono amplificati 1200x, campionati a 25 kHz ed acquisiti attraverso la scheda di acquisizione dati del MEA ed il software MC_Rack (MCS). Un canale dell'amplificatore MEA (cioè il canale 44) è stato utilizzato per acquisire e registrare i segnali provenienti dall'OTFT. La soluzione è stata collegata a massa mediante l'immersione nella stessa di un elettrodo di Ag / AgCl (elettrodo n ° 15) collegato alla massa del circuito integrato MEA. L'elettrodo di riferimento è stato poi collegato al contatto di source dell'OTFT per uniformare la massa dei due sistemi. I cavi utilizzati per l'intero sistema sono schermati biassiali.

Per minimizzare il rumore esterno i campioni sono stati posti in una gabbia di Faraday e gli esperimenti sono stati eseguiti su di un banco antivibrante.

5.5.14 MEA stimolazione e registrazione

Le stimolazioni extracellulari e le registrazioni di cellule DRG sul dispositivo MEA sono state eseguite nello stesso giorno di quelle eseguite sull'OTFT, utilizzando inoltre la medesima preparazione cellulare. Il chip MEA (Multi electrode array, MCS, Reutlingen, Germania) consiste in 60 elettrodi planari rotondi ricoperti di TiN / SiN (diametro di 30 micron, 200 micron da centro a centro di distanza interelettrodo). L'attività elettrica delle colture DRG è stata registrata mediante il sistema MEA60 (MCS). Dopo l'amplificazione 1200x, i segnali sono stati campionati a 25 kHz ed acquisiti attraverso la scheda di acquisizione dati e il software MC_Rack (MCS) (medesimo metodo utilizzato per la rilevazione del segnale bioelettrico delle cellule nell'OTFT).

5.5.15 Soluzioni e prodotti chimici

Tutti i sali e le sostanze chimiche impiegate per le indagini sono di grado elevato di purezza (Sigma). Per gli esperimenti la soluzione elettrofisiologica salina esterna è composta da (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 5 glucosio, pH 7.4 con NaOH e osmolarità rettificata a ~ 315 mOsm con mannitolo. Quella intracellulare invece è composta da (mM): 144 KCl, 2 MgCl₂, 2 mMNaATP, EGTA 5, 10 HEPES, pH 7,2 con KOH ed osmolarità ~ 300 mOsm.

5.5.16 Registrazioni extracellulari, analisi dei dati e statistiche

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando un software personalizzato sviluppato in MATLAB © (The MathWorks, Boston, MA, USA) denominato SPYCODE9 che raccoglie una serie di strumenti per l'elaborazione multi-canale di registrazioni neurali. I dati vengono importati in MATLAB da File mcd (formato MCS) e poi gli eventi vengono rilevati da uno specifico algoritmo: Timing Spike (PTSD) [Maccione et al., 2009]. Brevemente, l'algoritmo utilizza tre parametri principali: 1) una soglia differenziale (DT) calcolata come 8-volte la deviazione standard del rumore basale del segnale; 2) un periodo di durata di picco (PLP)

impostato a 2 msec; 3) un periodo refrattario (RP) impostato a 0, dal momento in cui bisogna eseguire registrazioni extracellulari. L'algoritmo analizza i dati grezzi per discriminare il minimo relativo o il massimo. Una volta che un punto di minimo relativo viene trovato, il punto massimo più vicino viene ricercato all'interno della finestra PLP seguente (o viceversa). Se la differenza tra i due punti è più grande di DT, un picco è identificato e viene salvata la sua ubicazione (tempo). Lo stesso algoritmo è in grado di riconoscere gli artefatti di stimolazione ed anche di quest'ultimi viene salvata l'ubicazione. I flussi di dati risultanti da questa procedura sono stati poi utilizzati per l'analisi statistica e per produrre i grafici presenti in Figura 6.11 del presente capitolo. È stato calcolato il tasso di eventi (cioè il numero di eventi al secondo) e il Post Stimulus Time Histogram (cioè psth), utilizzato per studiare la potenziale attività neuronale evocata dalla stimolazione. Il psth rappresenta la risposta all'impulso di un canale di registrazione alla stimolazione elettrica. I psth sono stati calcolati mediante la registrazione dell'attività elettrofisiologica per un periodo di 400 ms successivi a ciascun stimolo. Quindi, il numero di picchi che si verificano in ciascun periodo di tempo di 400 msec è stato calcolato per generare un istogramma cumulativo successivamente normalizzato per il numero totale di stimoli e per l'intervallo di tempo (Rieke et al., 1997).

Il massimo rapporto segnale rumore riportato nel testo è stato calcolato come rapporto tra il valore massimo tra tutti valori picco-picco ottenuti dalla procedura di rilevamento degli stessi e la linea di base del rumore per ogni processo di registrazione, come riportato in letteratura (Frega et al., 2012).

5.6 Risultati e discussione

Lo studio descritto nelle prossime pagine riguardante lo sviluppo di un dispositivo bidirezionale per la stimolazione e la registrazione di segnali extracellulari si divide in tre diverse sezioni:

- caratterizzazione ottica, morfologica e funzionale del P13 in soluzione ed in film sottile ed effetti dell'esposizione all'ambiente fisiologico
- analisi della resistenza dell'OTFT all'ambiente fisiologico e della biocompatibilità del materiale organico
- studio della funzionalità dell'OTFT come stimolatore e rilevatore di segnali bioelettrici cellulari.

5.6.1 Caratterizzazione del materiale semiconduttore organico

I perileni diimidici sono semiconduttori organici promettenti per lo sviluppo di dispositivi performanti e resistenti.

I sostituti alchilici 3,4,9,10-perilenotetracarbossil diimidici (PTCDI) sono largamente utilizzati come materiali ad alta mobilità di tipo n nei transistor organici ad effetto campo (OTFT) [Malenfant 2002, Chesterfield 2004]. Le insolite caratteristiche di trasporto di tipo n possono essere spiegate da: i) una forte affinità elettronica causata dalla presenza dei gruppi imidici, ii) la planarità del nucleo perilenico che consente un'ampia sovrapposizione degli orbitali π e iii)

la presenza di catene alchiliche che garantiscono un efficace organizzazione supramolecolare nel film sottile.

5.6.1.1 Spettro ottico e livelli di energia

La figura 5.6 mostra l'assorbimento (traccia blu) e la fotoluminescenza (PL) (traccia rossa) del P13 sia in soluzione (linea tratteggiata) che in film sottile (linea intera). Lo spettro della soluzione è stato ottenuto tramite l'utilizzo di una soluzione di diclorobenzene ad una concentrazione 10^{-4} mol/l. L'assorbimento mostra 4 picchi distinti a 2,35 eV, 2,53 eV, 2,69 eV e 2,8 eV i quali vengono attribuiti alla transizione del primo singoletto ($S_0 \rightarrow S_1$) ed alle sue progressioni vibroniche. Lo spettro PL è l'immagine speculare di quello d'assorbimento, con tre picchi distinti 2,3eV, 2,14eV and 1,97eV. Il picco corrispondente al quarto picco di assorbimento è appena visibile, ma potrebbe essere indicato intorno a 1,82 eV. Tra assorbimento ed emissione c'è uno Stokes-shift di circa 0.05eV tra l'origine dello spettro di assorbimento e quello di emissione, inoltre, i picchi di emissione sono leggermente più separati. Lo Stokes-shift e la separazione differente indicano una possibile riorganizzazione della struttura molecolare nello stato eccitato. Tale variazione può essere correlata alla distribuzione dei momenti di dipolo di transizione.

Gli spettri del film sottile sono stati ottenuti dallo strato attivo di un transistor, utilizzando il P13 come semiconduttore organico. Essi differiscono chiaramente da quelli ottenuti in soluzione. L'assorbimento del film sottile mostra 4 picchi. Lo spettro di emissione per energie superiori a 2,34 eV è simile allo spettro in soluzione, anche se con una diversa distribuzione di intensità nei picchi. Pertanto lo spettro di emissione può essere attribuito alla medesima transizione singoletto presente in soluzione. La bassa energia del picco di assorbimento a 2.16eV è una caratteristica tipica dei derivati diimidici del perilene.

Lo spettro di fluorescenza di composti perilenici in stato solido è piuttosto complesso, data la possibile presenza di molteplici e differenti stati emissivi (come ad esempio stati eccimerici e a trasferimento di carica).

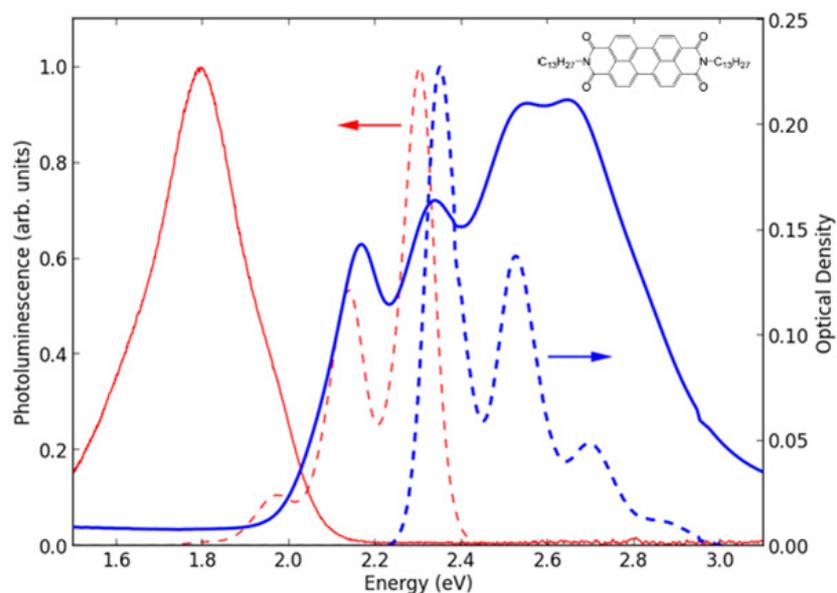


Figura 5.6: Spettro di assorbimento (blu) e di fotoluminescenza (rossa) della soluzione di P13 (linea tratteggiata) e del film sottile (linea intera). Il cambiamento degli spettri tra il film sottile e la soluzione indica un alto grado di compattamento tra i sistemi π in fase condensata.

Tuttavia, la presenza di specie intermolecolari sottolinea la facilità del trasferimento di carica tra molecole adiacenti, prerequisito per avere un'alta mobilità di carica laterale in strutture di dispositivo ad effetto di campo. Va inoltre notato che film sottili di P13 cresciuti su substrati differenti (vetro, quarzo o polimero) presentano il medesimo spettro di emissione, indicando così la probabile assenza di intrappolamento di carica all'interfaccia tra strato attivo e substrato.

5.6.1.2 Morfologia del film

I semiconduttori organici sono altamente sensibili all'ossigeno ed all'esposizione all'umidità e devono quindi essere efficacemente protetti in modo da salvaguardare le loro proprietà elettroniche [Gomes et al., 2005]. Sono state investigate le modifiche morfologiche e

strutturali del film sottile di P13 indotte dal trattamento dello stesso per 10 giorni con del liquido di coltura cellulare. Tali indagini sono state effettuate tramite l'analisi con il microscopio a forza atomica (AFM) [Mihai Irimia-Vladu 2010] (Figure 5.7 a,b) e la microscopia confocale a scansione laser (Figura 5.7 c,d).

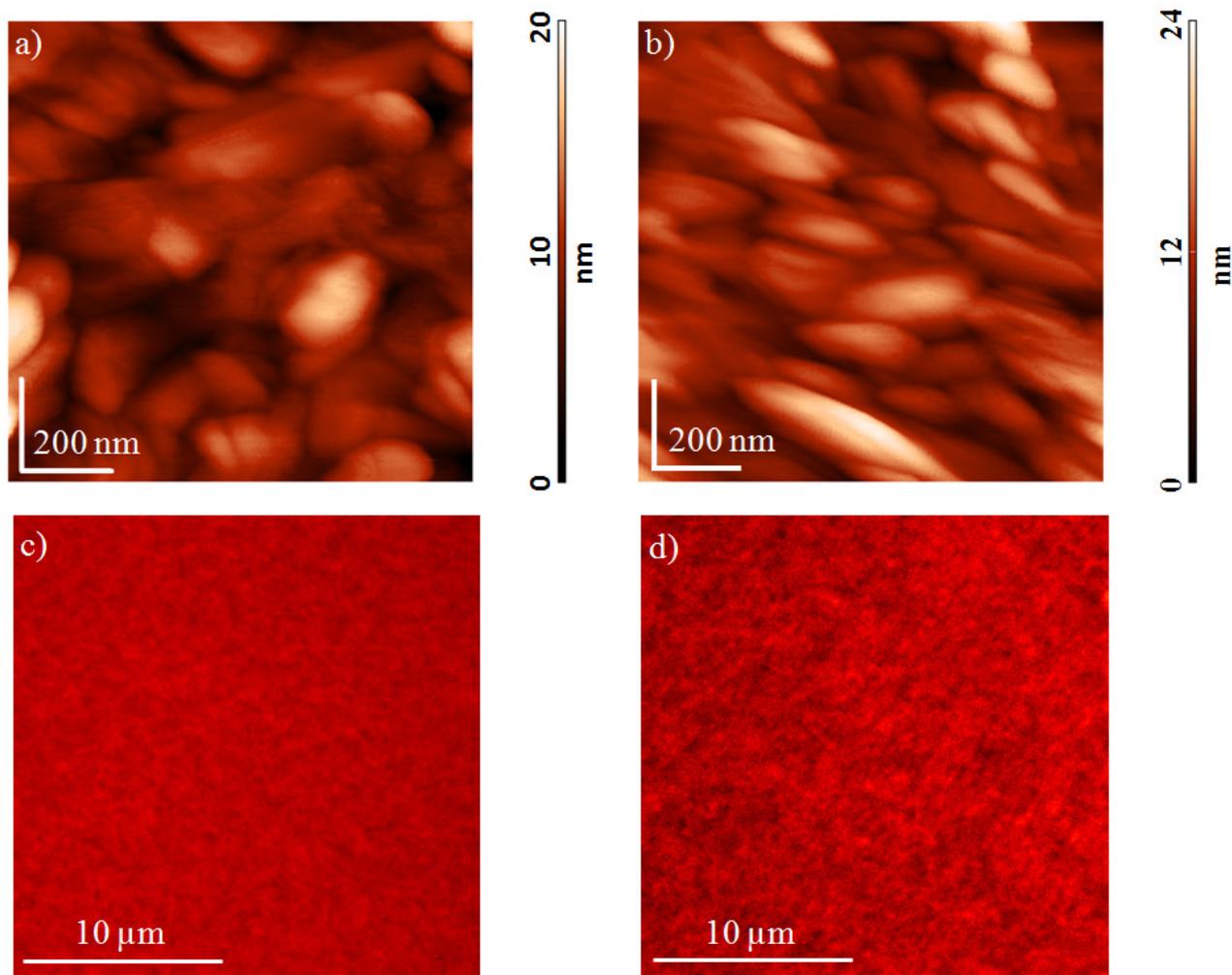


Figura 5.7: Immagini AFM dello strato superficiale di P13 che copre il drain ed il source dell'OTFT, prima (a) e dopo (b) il trattamento con del terreno di coltura cellulare. Immagine confocale a scansione laser dei medesimi campioni prima (c) e dopo (d) il trattamento con la soluzione precedentemente menzionata. Quella post trattamento è stata ottenuta con un'intensità luminosa raddoppiata.

Le immagini topologiche e di fluorescenza sono state ottenute prima (figura 5.7 a,c) dell'esposizione del campione al liquido di coltura e dopo 10 giorni di trattamento con lo stesso (figura 5.7 b,d). Le immagini AFM riguardano lo strato di P13 depositato sugli elettrodi superficiali del dispositivo. Sono osservabili degli aggregati di piccole molecole caratteristici dei film di P13. Dopo il trattamento con la soluzione sono osservabili alcune differenze riguardanti l'aumento della rugosità superficiale che da 4,3 nm pre esposizione aumenta a 6,12 nm post soluzione. La media delle dimensioni degli aggregati molecolari (circa 100 nm) invece rimane invariata ma dopo il trattamento cresce la densità degli stessi e la forma si modifica parzialmente. I cambiamenti notati sono dovuti alla presenza di residui salini e del terreno di coltura cellulare rimasti sulla superficie dell'organico. Le immagini di fluorescenza non possono ispezionare a fondo il substrato fino ad osservare i singoli agglomerati molecolari ma osservando la macrostruttura morfologica del film non si osservano cambiamenti pre e post trattamento (Figura 5.7 c, d). Inoltre, il film esibisce una considerevole diminuzione dell'intensità e dell'omogeneità spaziale della fluorescenza post trattamento (l'immagine raffigurata in figura 5.7 d è stata ottenuta utilizzando il doppio dell'intensità luminosa rispetto a quella ottenuta prima del trattamento con il solvente). Tale comportamento è attribuibile al quenching della luminescenza dato dall'interazione con il solvente, dove alcune parti sono maggiormente suscettibili di altre.

5.6.1.3 Bagnabilità superficiale di differenti substrati cellulari

La bagnabilità superficiale di differenti substrati è stata investigata tramite la misura dell'angolo di contatto (Figura 5.8). Per ogni esperimento mostrato in questo paragrafo è stato utilizzato come solvente del liquido di coltura cellulare. Le figure 5.8a e 5.8b mostrano rispettivamente un substrato di vetro trattato senza e con PDL/laminina. L'angolo di contatto calcolato sul vetro modificato è circa di $53,4^\circ$, rivelando che il trattamento con PDL/laminina non influenza drasticamente la bagnabilità e quindi l'idrofilicità del vetro ($58,3^\circ$). Analizzando invece l'inclinazione dell'angolo di contatto dato dalla goccia di solvente su di

un substrato di vetro ricoperto di 50 nm di P13, è stata rilevata una bassa bagnabilità del campione (Figura 5.8c), avendo infatti un angolo di contatto circa di 97,9°.

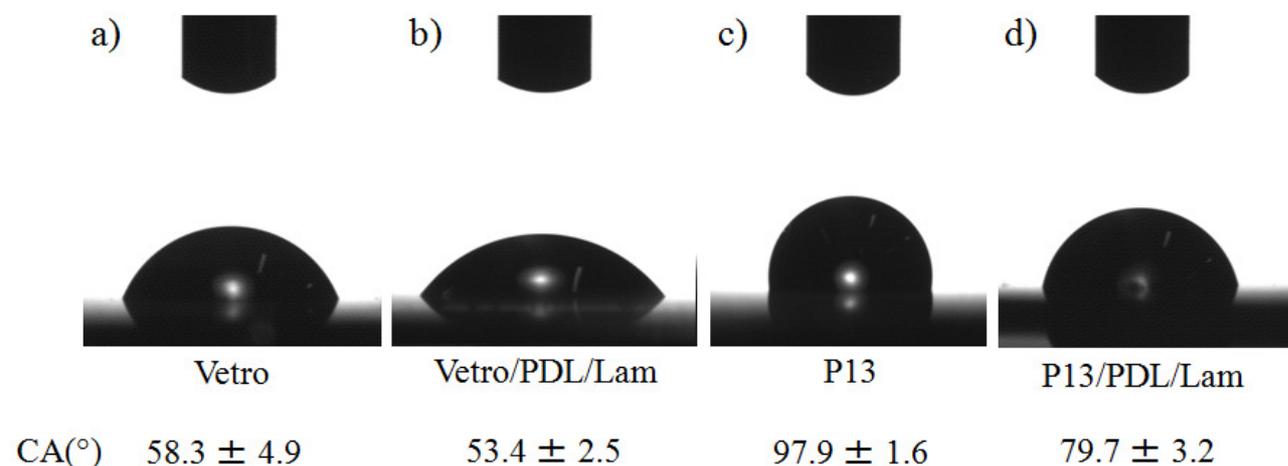


Figura 5.8: Forma di una goccia (1 µl) di terreno di coltura cellulare e calcolo dell'angolo di contatto (sottostante alle figura) su vetro (a), su vetro coperto con PDL/laminina (b), su P13 (c) e su P13 coperto con PDL/Laminia (d)

L'addizione invece di PDL/laminina sulla superficie del film di semiconduttore organico diminuisce il grado di idrofobicità del substrato da 97,9° a 79,7°. Il differente valore dell'angolo di contatto tra il vetro modificato con PDL/laminina ed il P13 trattato con le medesime molecole (53,4° e 79,7°, rispettivamente) suggerisce che la copertura di P13 influenza la bagnabilità dello strato superficiale di PDL/laminina (Figure 6.3b e 6.3d).

5.6.2 Caratterizzazione elettriche dell'OTFT di P13 in differenti condizioni

Dopo aver studiato la resistenza e la conservazione strutturale del film di perilene in condizioni fisiologiche e la sua affinità con la soluzione, è stato studiato l'uso ed il mantenimento del transistor ad effetto di campo in ambiente biologico.

La struttura del dispositivo deve garantire una forte adesione interstrato tra substrato e dielettrico, tra semiconduttore organico e dielettrico così come tra contatto metallico e semiconduttore organico per fornire una struttura robusta del dispositivo con funzionalità affidabili garantendo il funzionamento in soluzione fisiologica o in mezzo di coltura. Questi requisiti non sono banali da trovare in un OTFT. Dopo molti tentativi sono stati selezionati dispositivi realizzati su vetro su cui è depositato uno strato di ITO utilizzato come elettrodo di gate, polimetilmetacrilato (PMMA) come dielettrico, P13 come semiconduttore organico, un sottile strato di oro come contatti source e drain ed un ulteriore film sottile di P13 come strato di copertura dei precedenti elettrodi. Lo strato di copertura evita l'esposizione diretta degli elettrodi metallici alla soluzione salina che limita la stabilità ed altera le caratteristiche elettriche del dispositivo a causa di fenomeni ossidoriduttivi che si vengono a creare tra gli elettrodi e la soluzione [Roberts et al., 2008; Kuribara et al., 2012].

Inoltre, sulla superficie del dispositivo viene aggiunto un “cestino” formato da resina epossidica. Questa viene depositata lungo i bordi del dispositivo per confinare la soluzione salina e prevenire l'interazione tra di essa e i contatti degli elettrodi non coperti dal sottile strato di P13.

Sono stati quindi indagati possibili cambiamenti nell'attività elettrica del transistor dati dall'addizione dello strato superficiale di perilene a copertura degli elettrodi, misurando le caratteristiche elettriche prima (Figura 5.9a) e dopo l'evaporazione dello strato di P13 sopra il drain ed il source (Figura 5.9d). Le caratteristiche elettriche, cioè il voltaggio di soglia (V_T) ed il valore di mobilità elettronica (μ_N) sono state calcolate dalla curva locus ($V_{DS}=V_{GS}$ con la variazione di V_{DS} da 0 a 100 V) e riportate in figure 5.9b e 5.9e, rispettivamente per la condizione pre e post strato protettivo. L'addizione del P13 sugli elettrodi superficiali non condiziona le proprietà di conduzione del dispositivo, il livello di corrente ed la μ_N rimangono paragonabili in entrambe le condizioni. Anche il V_T non cambia pre e post evaporazione dello strato protettivo. Ciò significa che tale strato di materiale organico non influenza le caratteristiche elettriche del dispositivo.

Successivamente a questo esperimento è stato doveroso verificare il mantenimento di funzionalità dell'OTFT dopo il trattamento in ambiente fisiologico per 10 giorni (Figura 5.9g). Tale prova è stata effettuata per osservare e provare l'affidabilità e la stabilità del dispositivo sotto condizioni di stress.

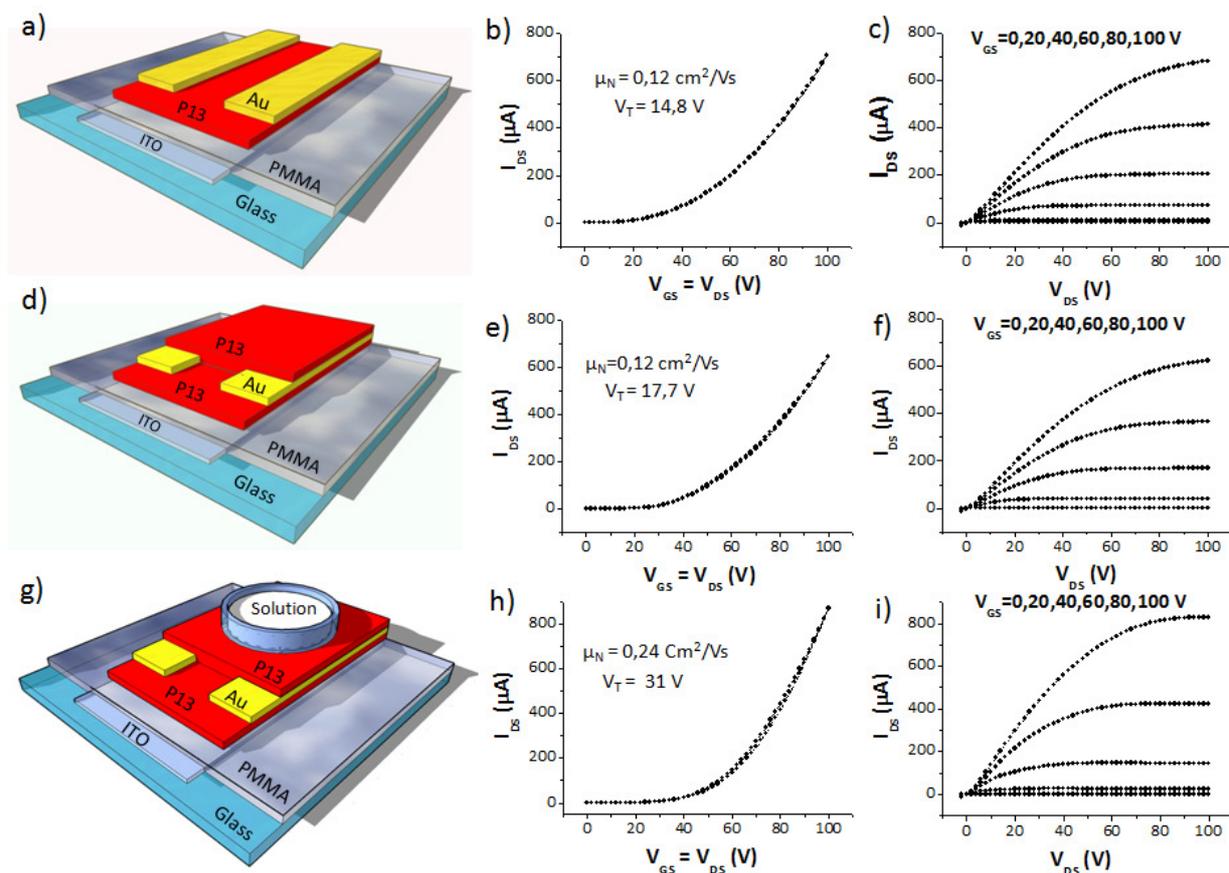


Figura 5.9: Comparazione delle caratteristiche elettriche dell'OTFT di P13 con e senza strato di copertura dell'organico e post trattamento con il terreno di coltura cellulare. (a) Rappresentazione schematica dell'OTFT di P13 top contact e bottom gate, (b) curva locus e (c) output multipla misurata dallo stesso dispositivo. (d) Rappresentazione schematica dell'OTFT di P13 con lo strato protettivo di organico sugli elettrodi drain e source e le rispettive curve locus (e) e output multipla (f) di caratterizzazione elettrica. (g) Rappresentazione schematica dell'OTFT di P13 con lo strato di copertura e la soluzione sulla sua superficie, (h) curva locus e (i) curva output multipla post trattamento dello stesso con la soluzione.

Dopo il trattamento con la soluzione fisiologica tipicamente utilizzata per la crescita di colture cellulari, sono stati eseguiti lavaggi ripetuti con acqua deionizzata per escludere qualsiasi disturbo di funzionamento del transistor dato dalla presenza di ioni sulla superficie. Le misure mostrano che l'OTFT composto da P13 possiede ancora le sue caratteristiche funzionali anche dopo 10 giorni di trattamento con il mezzo di coltura cellulare. La μ_N non è stata modificata dal trattamento con la soluzione (figura 5.9 h,i) ed è comparabile con il valore riportato dall'OTFT misurato prima del trattamento superficiale. L'isteresi delle curve elettriche è assente pre e post trattamento, mentre il V_T è cresciuto dopo i 10 giorni di soluzione.

Data l'assenza dello stress operativo e l'invariata mobilità dei portatori di carica dell'OTFT, l'aumento del V_T è correlabile alla degradazione dell'interfaccia metallo organico responsabile dell'iniezione di carica.

5.6.3 Capacità del semiconduttore di mantenere le caratteristiche funzionali e di vitalità delle cellule

Come primo passo quindi è stato valutato l'effetto del semiconduttore organico P13 sulla vitalità e successivamente sulla capacità di mantenere le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni sensoriali primari di gangli delle radici dorsali (DRG). Sono stati quindi coltivati DRG su film sottili di 50 nm di P13, cresciuti su vetrini. Per garantire la corretta adesione del preparato cellulare alla superficie lo strato di P13 è stato trattato con poli-D-lisina (PDL) e laminina, che come osservato nei precedenti esperimenti di bagnabilità, diminuisce l'idrofobicità del substrato.

Come esperimento di controllo, sono state preparate colture cellulari dallo stesso animale su substrati di vetro rivestito con PDL e laminina. Osservazioni morfologiche a differenti tempi rivelano la presenza di neuroni differenziati con corpi cellulari di diverso diametro ed estensione neuritiche sia sullo strato P13 di semiconduttore (freccie in Figura 6.5b,d,f) che sui substrati di vetro (freccie in Figura 6.5a,c,e), entrambi rivestiti con PDL + laminina.

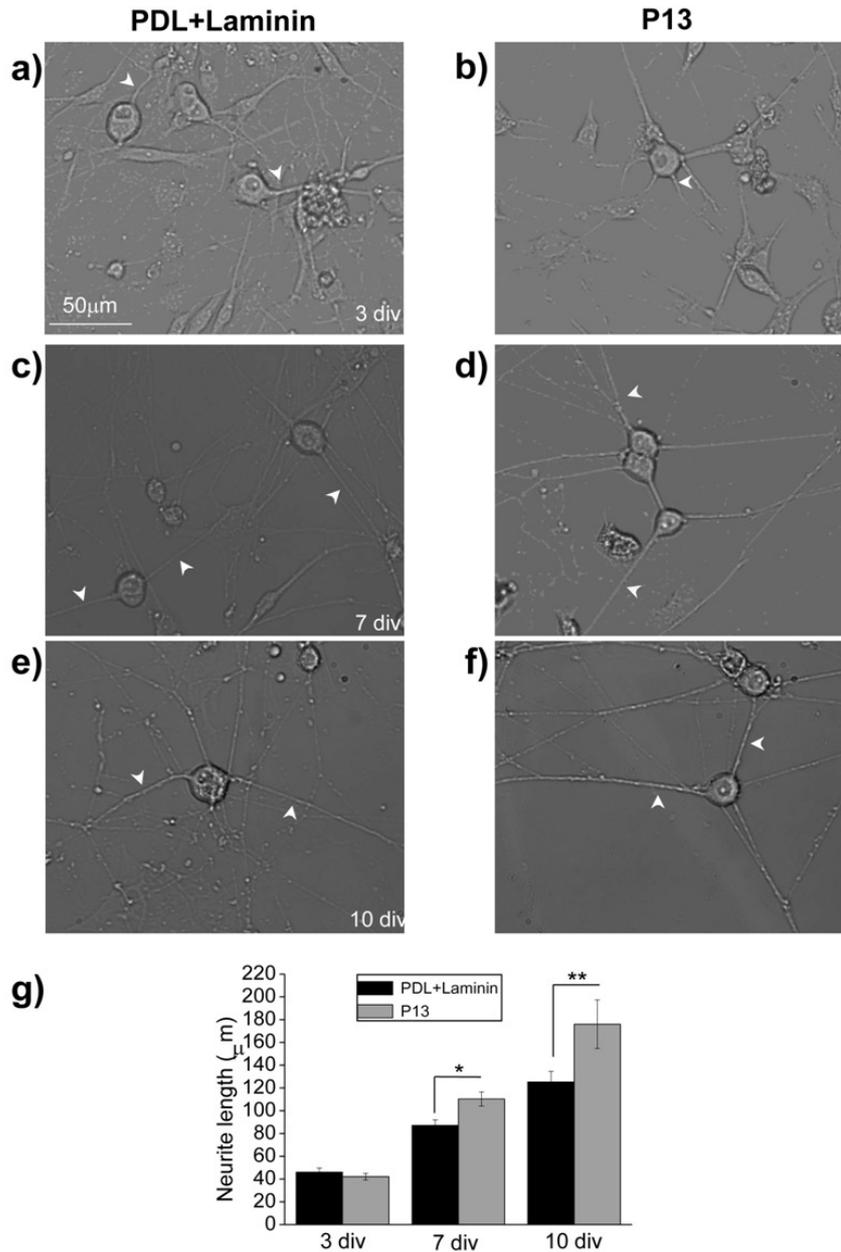


Figura 5.10: Analisi su vetro e su P13 trattato con PDL/laminina della crescita neuritica a diversi giorni in vitro (div). Osservazione morfologica a sinistra dei DRG sul substrato di vetro ed a destra sul substrato di P13 rispettivamente dopo 3 giorni (a,b), 7 giorni (c,d) e 10 giorni (e,f). Il grafico a barre raffigura l'analisi della crescita neuritica, significativamente alta verso i 7 giorni fino a 10, in particolare sul materiale organico.

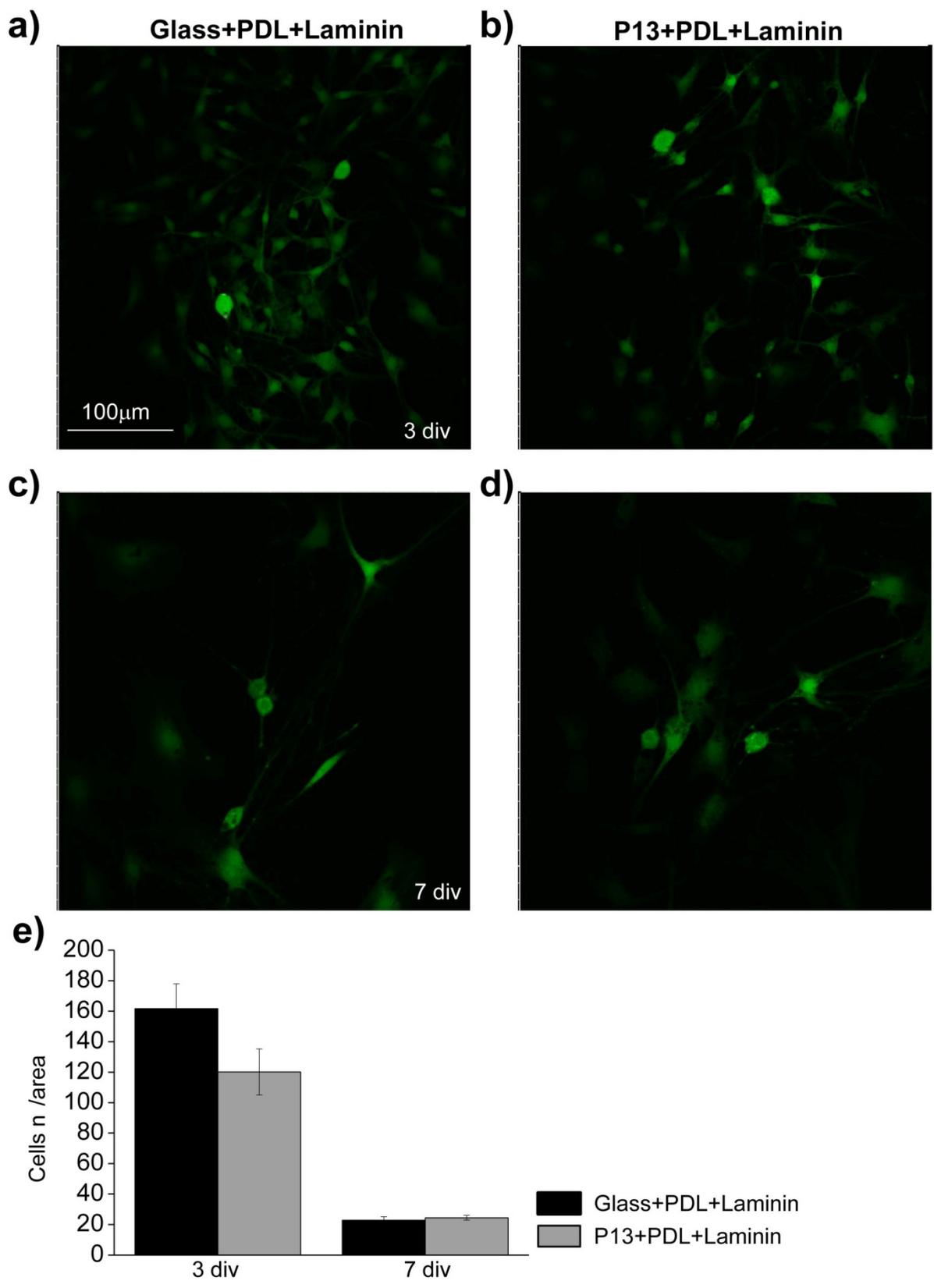


Figura 5.11: Vitalità cellulare dei DRG piastrati su vetro e su P13 entrambi trattati con PDL/Laminina. (a-d) Immagine di singolo piano confocale di DRG piastrati sui due diversi

substrati a 3 (a,b) e 7 (c,d) giorni dalla piastratura. (f) Istogramma rappresentante la conta delle cellule vive. Non si nota molta differenza tra i due substrati.

Le immagini e le analisi delle espressioni di immunofluorescenza delle proteine neuronali nucleari (NeuN) (Figura 1b) e della proteina GAP43, ottenute grazie all'utilizzo della microscopia confocale a scansione laser (LSCM), confermano la presenza di neuroni con fasci assonali, e quindi con processi di rigenerazione attivi, sui film di P13 rivestiti con PDL + laminina. La crescita neuritica è stato osservato dopo 3,7 e 10 giorni in vitro (div) (Figura 5.10) ed è osservabile come la rete neuronale si infittisca in funzione del tempo. Da notare, inoltre, come la crescita neuritica a 7 ed a 10 giorni è risultata maggiore sui film di organico rispetto a quelli su vetro, entrambi trattati con PDL+laminina (Figura 5.10g). Il test di vitalità cellulare effettuato con la fluoresceina diacetato (FDA) ha dimostrato che le colture crescevano in modo comparabile nei due substrati analizzati (Figura 5.11).

Al fine di verificare le proprietà elettrofisiologiche di neuroni sul semiconduttore P13 sono state eseguite analisi di patch-clamp. Le cellule utilizzate sono DRG coltivati su vetrino + PDL + laminina (come controllo) e sullo strato di copertura di P13 dell'OTFT, anch'esso trattato con PDL + laminina. In particolare abbiamo selezionato neuroni il cui corpo si posa nel canale dell'OTFT. La depolarizzazione neuronale e la generazione di potenziali di azione (figura 5.12a) in risposta a iniezione di corrente è osservabile in figura 1d. L'analisi delle diverse proprietà bioelettriche registrate in diversi neuroni coltivati su OTFT + PDL + laminina e su vetro + PDL + laminina è riportato in Figura 5.12b. I dati elettrofisiologici indicano senza ambiguità che, nonostante una leggera differenza di potenziale di membrana a riposo (V_{mem}), le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni DRG primari coltivati sull'OTFT + PDL + laminina sono conservate e comparabili con quelle dei neuroni cresciuti su vetro rivestito con PDL + laminina (Figura 5.12b).

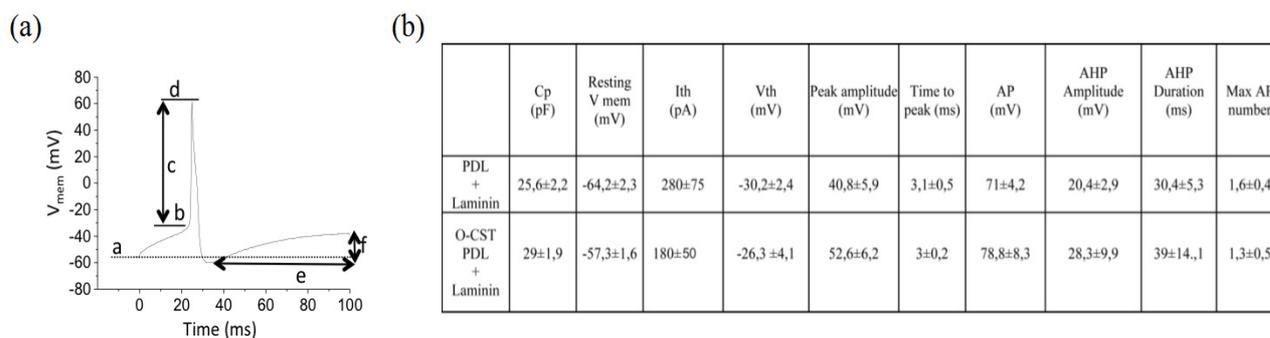


Figura 5.12: (a) Traccia rappresentativa di un potenziale d'azione tratto dall'attività bioelettrica di un neurone DRG coltivato su un substrato di P13 con PDL/laminina. (b) Caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni DRG piastrati su vetro e sullo strato di P13 soprastante l'OTFT. Il grafico (a) riporta le caratteristiche utilizzate per il calcolo dei diversi parametri elencati in (b). Ulteriori informazioni si possono trovare nella sezione di materiali e metodi.

5.6.4 Stimolazione dei potenziali d'azione e la modulazione di V_{MEM} di neuroni DRG da parte dell'OTFT di P13

Al fine di utilizzare l'OTFT per la stimolazione delle cellule neuronali, sono stati eseguiti esperimenti combinando la stimolazione dei neuroni da parte dell'OTFT con la simultanea registrazione della modulazione del potenziale di membrana intracellulare, utilizzando il whole-cell patch-clamp in modalità current-clamp (vedi schema e foto in Figura 5.13a-c). Si sono utilizzati voltaggi inferiori o uguali a 1 V negli esperimenti con la soluzione salina per evitare la formazione di correnti faradiche e di fenomeni di ossidoriduzione dell'organico all'interfaccia capaci di danneggiare il dispositivo.

L'elettrodo di riferimento del patch-clamp di Ag/AgCl è stato immerso all'interno della soluzione salina, collegato all'elettrodo di source del transistor e usato come massa per tutti i protocolli di stimolazione e di polarizzazione.

I neuroni DRG a riposo e sani sono praticamente elettricamente silenziosi, il che rende facilmente distinguibile un'attività elettrica evocata da una stimolazione rispetto all'attività spontanea

cellulare [Xie et al., 2010; Kitamura et al., 2005; Zhang et al., 2011]. Per gli esperimenti di interfaccia tra patch clamp e OTFT sono stati analizzati i neuroni il cui corpo cellulare si trovava interamente al di sopra del canale tra gli elettrodi di drain e source del transistor. Prima di ogni stimolazione effettuata dall'OTFT, la capacità di generare potenziali d'azione delle cellule è stata verificata utilizzando il patch-clamp e le cellule sono state classificate come elettrogenicamente attive o inattive a seconda della loro risposta.

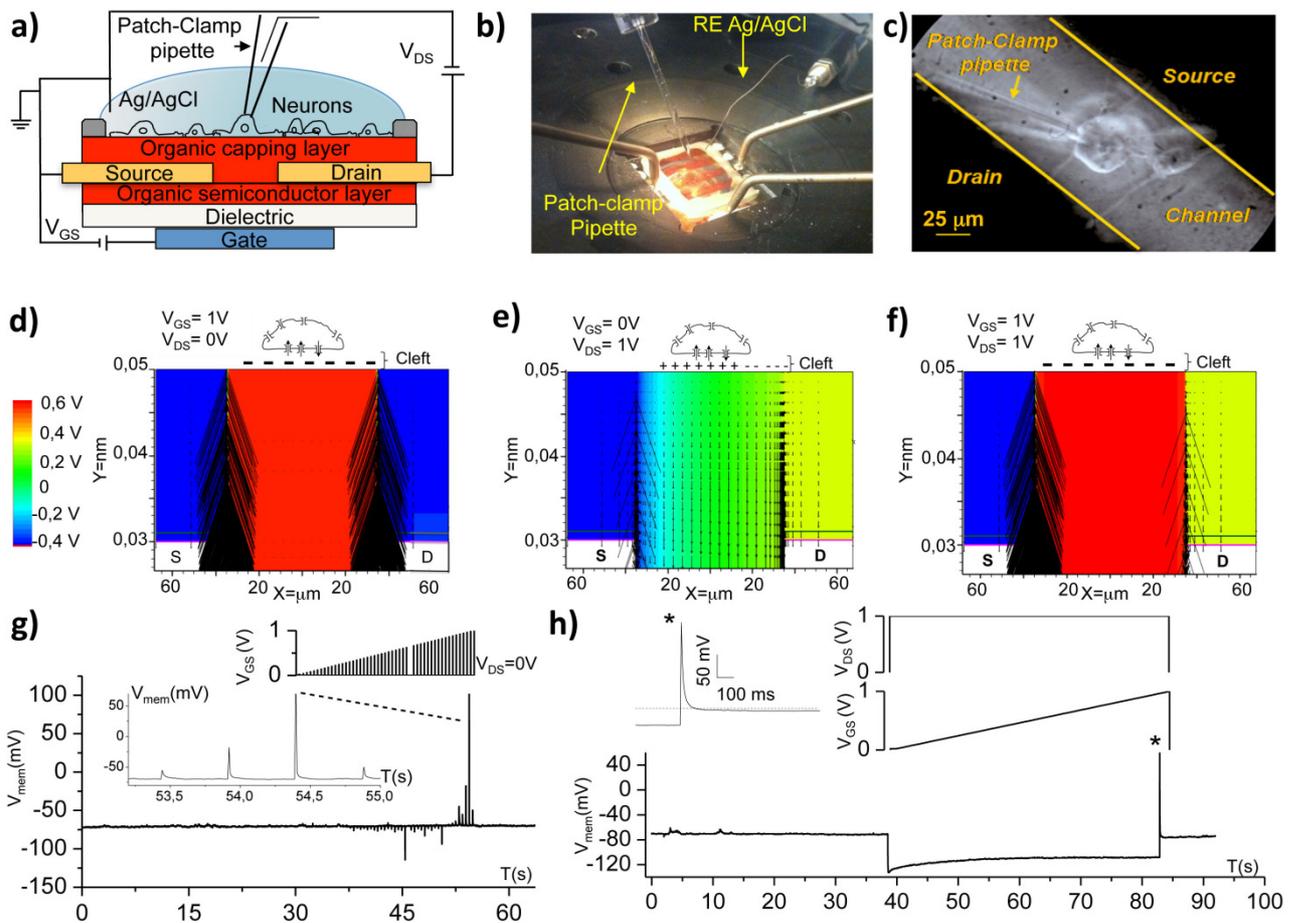


Figura 5.13: Stimolazione applicata dall'OTFT e simultanea lettura dell'attività bioelettrica intracellulare con il patch-clamp. (a) Figura schematica rappresentativa dell'interfaccia delle due strumentazioni. (b) Fotografia del patch clamp interfacciato con l'OTFT. (c) Fotografia di un DRG analizzato tramite patch clamp che si trova all'interno del canale (tra drain e source) del dispositivo. (d-f) Simulazione 2D del campo elettrico (vettori) e del potenziale elettrostatico (scala di colori) vicino allo strato di protezione di P13 del dispositivo : $V_{GS} = 1$ V e $V_{DS} = 0$ V (d), $V_{GS} = 0$ V e $V_{DS} = 1$ V (e) e $V_{GS} = 1$ V e $V_{DS} = 1$ V (f). (g) Traccia di

current clamp registrata tramite un esperimento di patch clamp durante l'applicazione del protocollo di stimolazione a potenziale pulsato all'OTFT. (h) Traccia di current clamp registrata tramite un esperimento di patch clamp durante l'applicazione del protocollo di stimolazione a potenziale continuo all'OTFT.

Al fine di ottenere una panoramica delle caratteristiche elettrostatiche della parte superiore dell'OTFT interfacciata con l'elettrolita, sono state effettuate simulazioni 2D del campo elettrico e del potenziale elettrostatico (vettori e scala colore, rispettivamente, in Figura 6.8d-f) all'interno dello strato di copertura di P13. Le simulazioni, che non considerano l'interazione del dispositivo con l'elettrolita, sono eseguite per condizioni di polarizzazione corrispondenti a punti specifici dei protocolli di stimolazione utilizzati per gli esperimenti OTFT-patch-clamp (Figura 5.13g, h). Quando $V_{DS} = 0$ V e $V_{GS} = 1$ V (Figura 5.13d) il campo elettrico è simmetrico rispetto agli elettrodi di drain e source e possiede il valore massimo in corrispondenza agli spigoli degli elettrodi (effetto punte). Il potenziale elettrostatico è costante e positivo nella regione del canale, mentre è negativo sopra degli elettrodi. All'interfaccia tra lo strato di copertura di P13 e la soluzione il potenziale elettrostatico è previsto essere circa di 600 mV, un valore che dovrebbe essere sufficiente per evocare una depolarizzazione capacitiva delle cellule neuronali [Schoeon et al., 2008].

Quando $V_{DS} = 1$ V e $V_{GS} = 0$ V (Figura 5.13e) si osserva che l'intensità del campo elettrico non è costante lungo il canale, come si può dedurre dalla variazione della lunghezza dei vettori di campo elettrico. In generale, il campo elettrico in questa condizione è molto meno intenso rispetto al caso precedente. All'interfaccia tra lo strato di P13 e l'elettrolita il potenziale elettrostatico varia da negativo a positivo con una conseguente variazione del segno delle cariche ioniche indotte all'interfaccia con l'elettrolita. Pertanto, la cellula che si trova sulla parte superiore del canale è esposta ad una distribuzione di carica che varia lungo la lunghezza del canale con un eccesso di cariche positive in corrispondenza alla parte soprastante il drain. Questa distribuzione di carica dovrebbe promuovere una iperpolarizzazione del potenziale di membrana neuronale (V_{mem}).

Infine, quando $V_{DS} = 1 \text{ V}$ e $V_{GS} = 1 \text{ V}$ (Figura 5.13f), la distribuzione del campo elettrico è ancora asimmetrica, mentre il campo elettrico nella regione del canale è dominato dalla tensione di gate, che induce un potenziale elettrostatico costante e positivo all'interfaccia con lo strato di protezione di P13. Di conseguenza, uno strato di cariche ioniche negative viene indotto nella fessura tra la membrana cellulare e la superficie del dispositivo, che dovrebbe indurre depolarizzazione del voltaggio di membrana neuronale.

Per verificare sperimentalmente queste ipotesi, abbiamo eseguito esperimenti OTFT/patch-clamp applicando al dispositivo i protocolli di stimolazione riportati in Figura 5.13g-h, e rilevando la risposta intracellulare con il whole-cell patch-clamp in modalità current-clamp.

Applicando un treno di impulsi di tensione crescente all'elettrodo di gate rispetto a quello di source (insetto in Figura 2g: da $V_{DS} = 0 \text{ V}$ a $V_{GS} =$ da 0 a 1 V con passaggi lineari crescenti di 20 mV, durata impulso 200 ms, con frequenza 2 Hz), il V_{MEM} intracellulare misurato ha risposto inizialmente con brevi transienti negativi all'inizio della rampa stimolazione. Picchi positivi depolarizzanti simili a potenziali d'azione (Inset in Figura 5.13g) invece sono stati registrati quando la polarizzazione V_{GS} ha raggiunto valori intorno a 800 mV. In alcune cellule picchi positivi depolarizzanti sono stati osservati in risposta a più bassi V_{GS} . È importante sottolineare che sono state effettuate le stesse prove nei neuroni classificati in precedenza come elettrogenicamente silenti con analisi iniziali di patch clamp. In questi neuroni non si osservavano picchi positivi, suggerendone l'origine fisiologica.

Abbiamo poi applicato alle cellule una stimolazione seguendo un diverso protocollo (protocollo rampa continua, Fig 5.13h) in cui è stato mantenuto ad un potenziale costante (1 V) V_{DS} ed al tempo stesso l'elettrodo di gate è stato polarizzato con una rampa lineare crescente da 0 a 1 V in 45 sec (passi crescenti di 20 mV). È stata osservata una iperpolarizzazione immediata del V_{mem} ($\Delta V_{mem} = -49,7 \pm 6,5 \text{ mV}$, $n = 8$) seguita da un leggero aumento depolarizzante, portando infine alla generazione di un potenziale di azione (AP picco = $39,4 \pm 15,9 \text{ mV}$, $n = 7$). Questo comportamento è coerente con la distribuzione del campo simulato all'interfaccia dello strato di protezione del P13. È plausibile che l'iperpolarizzazione prolungata della cellula potrebbe spiegare la depolarizzazione e

l'insorgenza del potenziale d'azione osservata alla fine della stimolazione, quando il campo elettrico è massimizzato. Infatti, è noto che una prolungata iperpolarizzazione promuove un elevato "reclutamento" di canali del sodio voltaggio-dipendenti (Nav). Tale stato elimina la fase di inattivazione dei canali, facilitando la risposta delle cellule con un potenziale d'azione [Ulbricht et al., 2005]. Coerentemente, quando $V_{DS} = 0$ V e a V_{GS} viene imposta una rampa continua da 0 V a 1 V, l'iperpolarizzazione non si verifica ed i potenziali d'azione non sono evocati com'è dimostrato dalla risposta elettrica piatta riportata in Figura 5.14a registrata da una cellula elettrogenicamente attiva (Figura 5.14b).

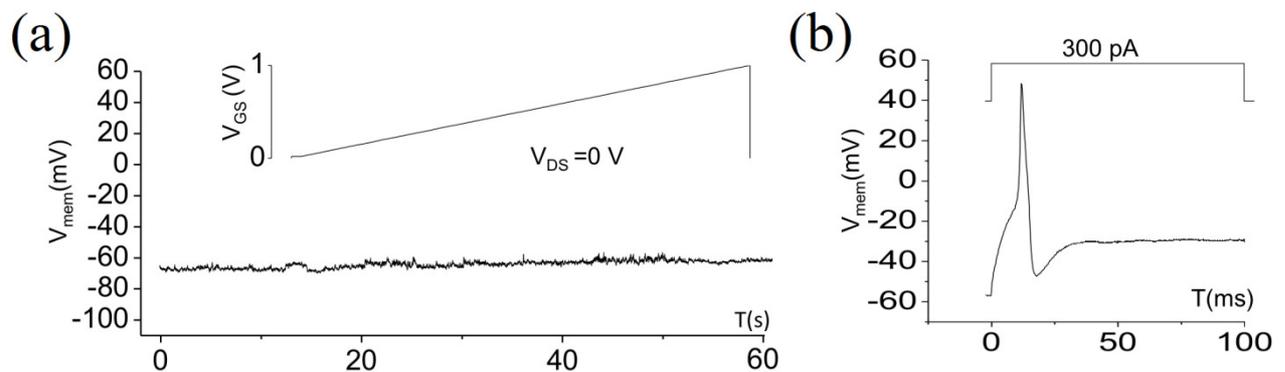


Figura 5.14: (a) Traccia di current clamp di una cellula attiva bioelettricamente sottoposta alla stimolazione con $V_{DS} = 0$ V e V_{GS} da 0 a 1 V tramite rampa continua. (b) Patch clamp di controllo sulla cellula impendo un impulso intracellulare di 300 pA.

Sono stati poi effettuati studi per fornire ulteriori informazioni sul meccanismo che sta all'origine dei potenziali d'azione registrati dal patch-clamp e generati dalla stimolazione imposta all'OTFT. Si è voluto cioè chiarire se i picchi sono dovuti alla risposta dei canali ionici all'interfaccia cellula/dispositivo o all'elettroporazione. Infatti, nei chip di silicio, applicando una tensione di 300 mV, è possibile indurre una elettroporazione transitoria delle membrane [Fromherz et al., 2003].

Per escludere poi il contributo di elettroporazione della membrana cellulare dalla stimolazione indotto dell'OTFT, le cellule piastrate sul dispositivo sono state trattate con calceina-AM ed è

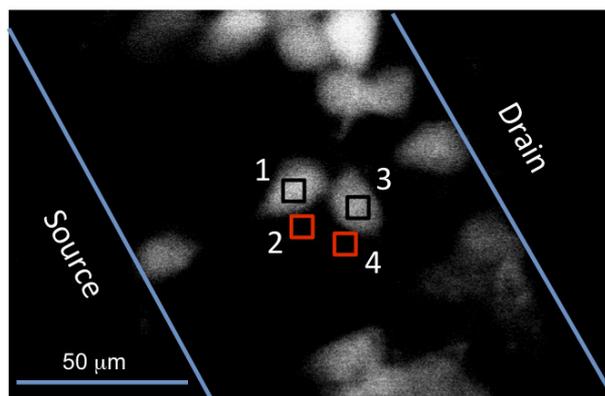
stata monitorata la variazione di fluorescenza in funzione del tempo mediante imaging ottico [Khine et al., 2005]. Misure dinamiche sulla variazione della fluorescenza della calceina acquisite prima e dopo la stimolazione con l'OTFT, sono riportate in Figura 5.15. L'intensità di fluorescenza interna alla cellula ed in prossimità della membrana esterna della cellula rimane costante nel tempo (Figura 5.15b,c). Pertanto, nessuna perdita del colorante attraverso la membrana delle cellule si osserva, il che dimostra che non si verifica una significativa elettroporazione data dalla stimolazione dell'OTFT.

Questi dati confermano che la stimolazione capacitiva delle cellule, e non l'elettroporazione delle stesse, è responsabile dei segnali di risposta ottenuti dal patch clamp durante la stimolazione con l'OTFT.

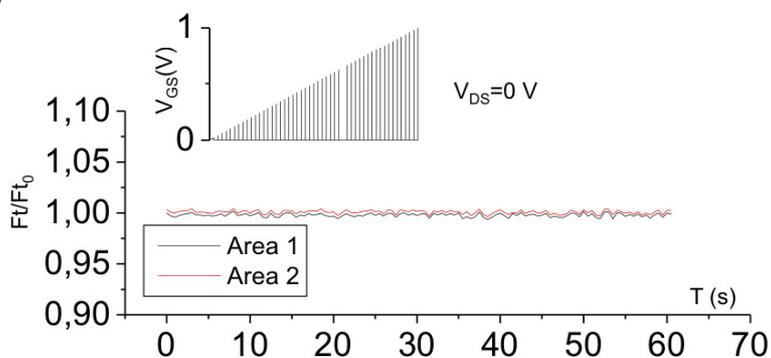
Successivamente abbiamo sfruttato la trasparenza ottica dell'OTFT per monitorare l'effetto della stimolazione data dal dispositivo sui neuroni DRG pre-incubati con il colorante sensibile al voltaggio DisBAC4 (3), (Figura 5.16a). Le cellule trattate con il colorante sono state continuamente riprese prima e durante il funzionamento del dispositivo con LSCM con una frequenza di acquisizione di immagini di 1Hz. Considerando che la risposta dinamica del colorante è molto più lenta della frequenza di ripetizione del protocollo di stimolazione pulsata, solo il protocollo di stimolazione continua è stato applicato al dispositivo (Figura 5.16b riquadro). Anche in questo esperimento, l'Ag/AgCl, mantenuto equipotenziale al source, è stato immerso nella soluzione salina ed ha agito come elettrodo di riferimento e come massa comune. Si noti che la scelta di un piano di rilevamento focale che esclude l'interfaccia tra il P13 e le cellule (per evitare la sovrapposizioni spettrali P13/coloranti) potrebbe contribuire ad aumentare la dinamica della variazione di fluorescenza.

La variazione di fluorescenza normalizzata riportata in figura 6.9b è in accordo qualitativo con i risultati ottenuti dal patch-clamp. La stimolazione (vista nell'inserzione di figura 5.16) del dispositivo inizialmente causa una leggera diminuzione di intensità di fluorescenza che indica un'iperpolarizzazione cellulare [Bräuner et al., 1984; González et al., 1997], seguita da un aumento di fluorescenza alla fine della stimolazione originato da una depolarizzazione del potenziale di membrana.

a)



b)



c)

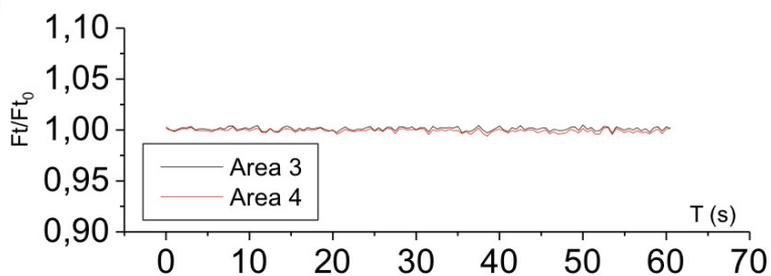


Figura 5.15: Immagini e andamento della fluorescenza dei flussi di calceina delle cellule presenti sul dispositivo. (a) Immagini di fluorescenza di una coltura di cellule DRG caricate con calceina-AM. Il quadrato nero e quello rosso indicano le regioni di interesse (ROI) per indicare l'ambiente intracellulare ed extracellulare delle cellule analizzate. (b-c) Misura della fluorescenza in funzione del tempo nelle regioni indicate in (a). La fluorescenza rimane costante prima, durante e dopo il protocollo di stimolazione pulsata.

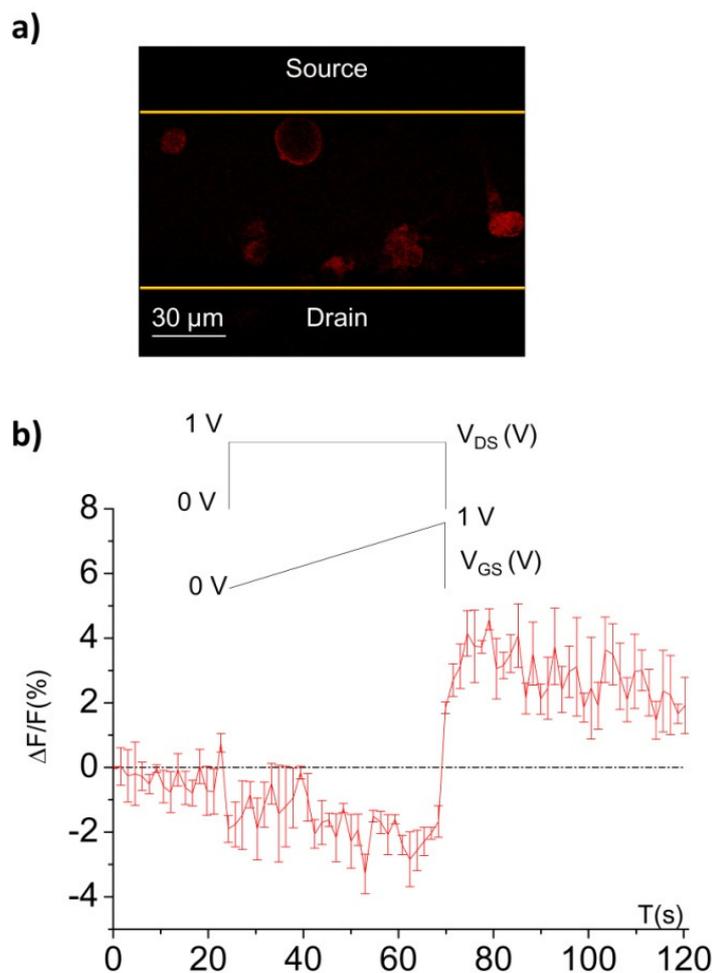


Figura 5.16: (a) Immagine LSCM di neuroni DRG trattati con DisBAC₄(3) sull'OTFT. (b) Media in funzione del tempo della variazione di fluorescenza in risposta all'applicazione della stimolazione a voltaggi continui imposti all'OTFT (vedi profilo di stimolazione nell'inserito all'interno del grafico).

Va sottolineato che studi precedenti riportano che una variazione di fluorescenza dell'1% corrisponde ad un range di variazione del potenziale di membrana di 1-10 mV [Bräuner et al., 1984; González et al., 1997]. Nelle nostre condizioni sperimentali, esponendo le cellule DRG sull'OTFT ad un'alta concentrazione di potassio extracellulare (40 mM K⁺), si può stimare che il rilevamento dell'1% di variazione di fluorescenza corrisponde ad una variazione del potenziale di membrana di circa 15 mV. Pertanto, la variazione di V_{mem} in risposta al

protocollo rampa continua assomiglia a quella osservata con il patch-clamp. Si può quindi concludere che l'OTFT è inequivocabilmente in grado di modulare direttamente il V_{MEM} delle cellule neuronali.

5.6.5 Stimolazione e registrazione dell'attività elettrica dei DRG da parte dell'OTFT di P13

La validazione completa del dispositivo richiede la prova della comunicazione bidirezionale tra il dispositivo e i neuroni dimostrando che quest'ultimo è in grado di stimolare e di registrare contemporaneamente l'attività elettrica neuronale. Il metodo di riferimento e l'approccio ben consolidato per la registrazione extracellulare è il MEA (multi electrode array). La registrazione dell'attività elettrica dei neuroni DRG con matrici MEA è ben documentata in letteratura [Nam et al., 2011; Bove et al., 1995; Heal et al., 2001]

Per un confronto diretto della sensibilità di rilevamento del dispositivo OTFT e del MEA, l'elettrodo di drain del dispositivo OTFT è stato collegato all'amplificatore del sistema MEA (vedi materiale e metodi).

La figura 5.17 riporta i valori di tensione corrispondenti alla variazione della corrente di drain-source (ΔI_{DS}) indotta dai treni ripetuti e crescenti di impulsi di tensione applicato all'elettrodo di gate, rispettivamente in OTFT a contatto con soluzione salina (Figura 5.17 a, d), in OTFT + Salina + Cellule primarie DRG (Figura 5.17 b, e), e dopo il trattamento con la tetrodotossina (TTX) 1 μ M (Figura 5.17 c,f), all'interno della soluzione fisiologica.

Transienti con periodicità di 2Hz, segnali di grande ampiezza, corrispondenti ad uno stimolo artefatto sono chiaramente riconoscibili in tutte le tracce. Oltre a questi stimoli, picchi ed eventi di forma d'onda ed ampiezza diversa sono stati osservati solo quando le cellule DRG sono state coltivate sull'OTFT (Figura 5.17b,e).

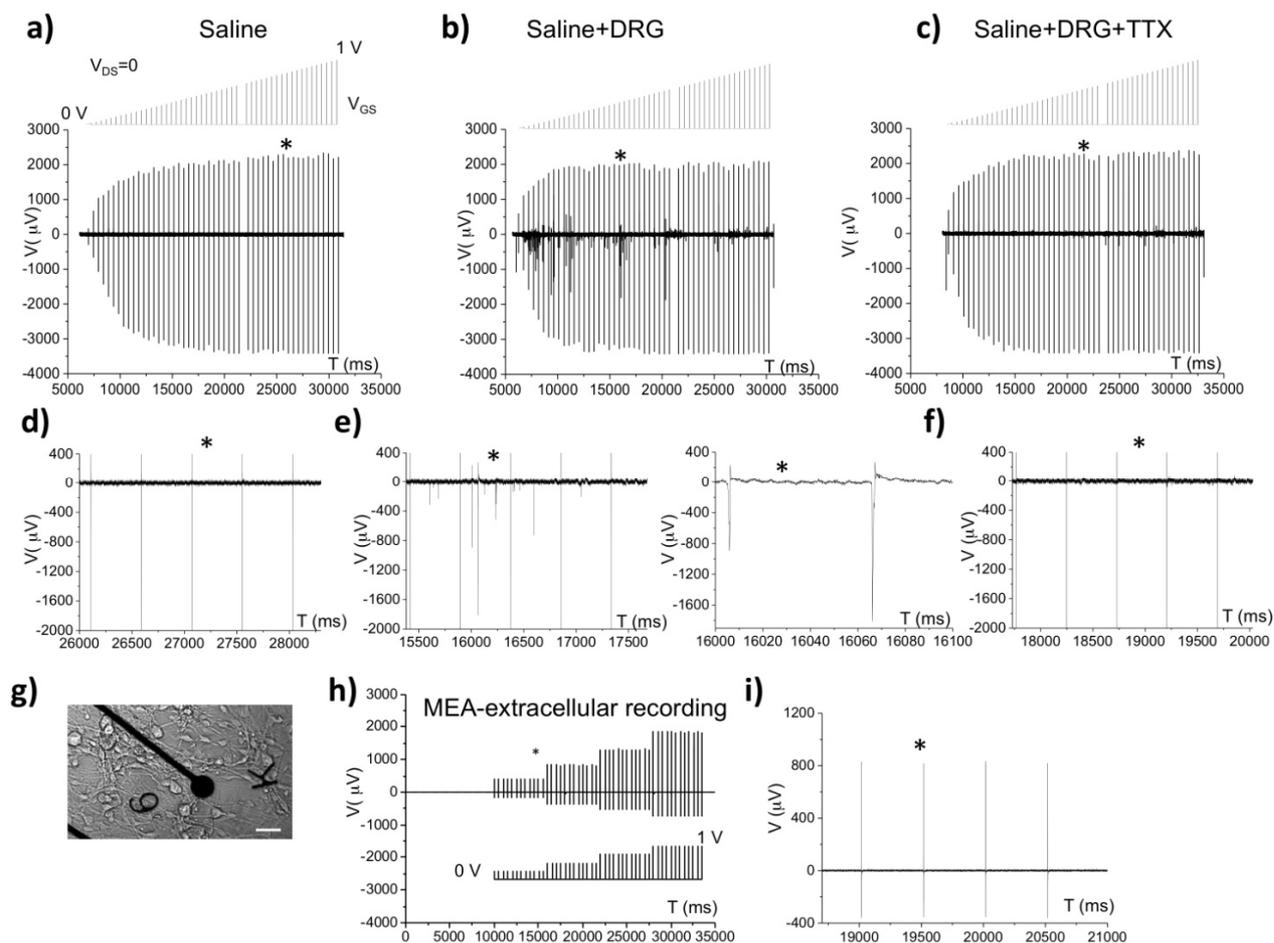


Figura 5.17: Stimolazione dell'OTFT e registrazione del segnale bioelettrico extracellulare in comparazione con il MEA. (a-c) Segnale extracellulare registrato durante l'applicazione del segnale pulsato al dispositivo OTFT (la forma della stimolazione si trova sopra ogni traccia: $V_{DS}=0$ V, da $V_{GS}=0$ V a $V_{GS}=1$ V con incrementi lineari di 20 mV, durata impulsi 200 μs , frequenza 2 Hz) in differenti condizioni sperimentali (salina, salina/DRG, salina/DRG/tetradotossina). Gli zoom delle tracce corrispondenti sono riportati in (d-f) e indicati da un asterisco *. (g) Immagine di DRG piastrati su un dispositivo MEA, la barra bianca di corrisponde a 30 μm . In figura (h) sono riportare le tracce ottenute dalla registrazione con il MEA, e in (i) uno zoom della stessa.

Per dimostrare l'origine fisiologica dei picchi registrati è stata aggiunta 1 μM TTX per bloccare i canali del sodio voltaggio dipendenti e quindi la conseguente insorgenza di

potenziali d'azione. Il numero di eventi si riduce drasticamente dopo l'applicazione di TTX, anche se alcuni picchi "TTX-resistenti" sono stati ancora registrati (Figura 5.17c). Ciò non è sorprendente in quanto è ben noto che per i neuroni DRG il potenziale d'azione può essere mediato da canali Nav TTX sensibili e TTX resistenti [Tripathi et al., 2006]. La maggior parte degli eventi che abbiamo osservato sono stati caratterizzati da una polarità negativa, con ampiezza variabile da 100 μ V a 2 mV. Come previsto per i DRG l'attività spontanea era quasi assente in condizioni di riposo. È importante sottolineare che le cellule erano ancora vive dopo la stimolazione e la registrazione con il dispositivo OTFT. Inoltre, dopo l'utilizzo con le cellule e ripetuti lavaggi in acqua deionizzata, è stata provata ulteriormente la robustezza e la compatibilità del dispositivo con l'ambiente fisiologico misurando le sue caratteristiche elettriche e osservando che quest'ultime mantenevano un comportamento paragonabile a quello dell'OTFT misurato post fabbricazione. Quando le cellule DRG della stessa preparazione sono state coltivate sul chip MEA (Figura 5.17g,i), utilizzando la medesima tecnica di stimolazione, si è osservato che tale sistema non è in grado ne di evocare potenziali d'azione ne di registrare una significativa attività elettrogenica.

5.6.6 Analisi statistiche dei segnali bioelettrici extracellulari

L'elaborazione e l'analisi statistica dei dati riportati in Figura 5.17 sono riportati in Figura 5.18. La figura 5.18a (a sinistra) mostra gli eventi rilevati dall'OTFT interfacciato alla soluzione salina. I due eventi identificati sono chiaramente causati da artefatti sperimentali. Il raster plot dell'attività subito dopo lo stimolo è praticamente vuoto ed il relativo istogramma PSTH è vicino allo zero per tutto il periodo di tempo valutato (vale a dire 400 msec dopo ogni stimolo, Figura 5.18a, a destra). Quando le cellule DRG sono piastrate sul dispositivo OTFT ed esso viene stimolato operato con la stimolazione a pulso i neuroni cominciano ad avere un'attività elettrogenica, come evidenziato dal raster plot della Figura 5.18b (a sinistra). Il profilo PSTH mostra picchi corrispondenti alla presenza di attività elettrogenica dopo 400 msec dalla terminazione dello stimolo (Figura 5.18b, a destra). La forma ottenuta del PSTH potrebbe indicare che sono cellule diverse a rispondere agli stimoli e che quindi la coltura non

ha raggiunto un grado di maturazione tale da produrre risposte a rete (attivazioni consequenziali delle cellule), come si è visto in preparazioni neuronali di altri mammiferi [Maccione et al., 2009; Shahaf et al., 2001]. Come previsto, aggiungendo TTX ai neuroni, il numero di eventi rilevati decresce, come chiaramente mostrato nei due pannelli di Figura 5.18c. L'analisi del tasso di eventi (cioè il numero di eventi rilevati per secondo) indica che solo quando i DRG sono accoppiati all'OTFT si ottiene un valore statisticamente significativo (Figura 5.18d). Inoltre, il test di Bonferroni per il confronto della media mostra che la frequenza di scarica calcolata nella condizione di Salina + DRG è statisticamente diversa sia dal caso con solo salina che da quello con l'aggiunta di TTX. Infine, quando i DRG della medesima coltura sono accoppiati al MEA, il sistema non è in grado di registrare potenziali d'azione. Questo è dimostrato dai PSTHs riportati in Figura 5.18e, i cui profili sono vicino a zero, indicando un livello molto basso di eventi rilevati.

Diversi studi di simulazione e di calcolo sono stati effettuati nel corso degli anni sul modello di interfaccia neurone / elettrodo così come sulla giunzione d'interfaccia neurone / silicio. Questi studi hanno contribuito a chiarire il ruolo dell'accoppiamento cellula / elettrodo permettendo di predire la forma dei potenziali rilevati in base alle cellule utilizzate [Fromherz et al., 2003; Nam et al., 2011]. In questa prospettiva, sono necessari ulteriori studi sia sulla modellizzazione delle interfacce costituenti il dispositivo, sia sul comportamento del materiale organico accoppiato con il neurone, per capire i particolari del funzionamento di questo dispositivo e per ottimizzarlo.

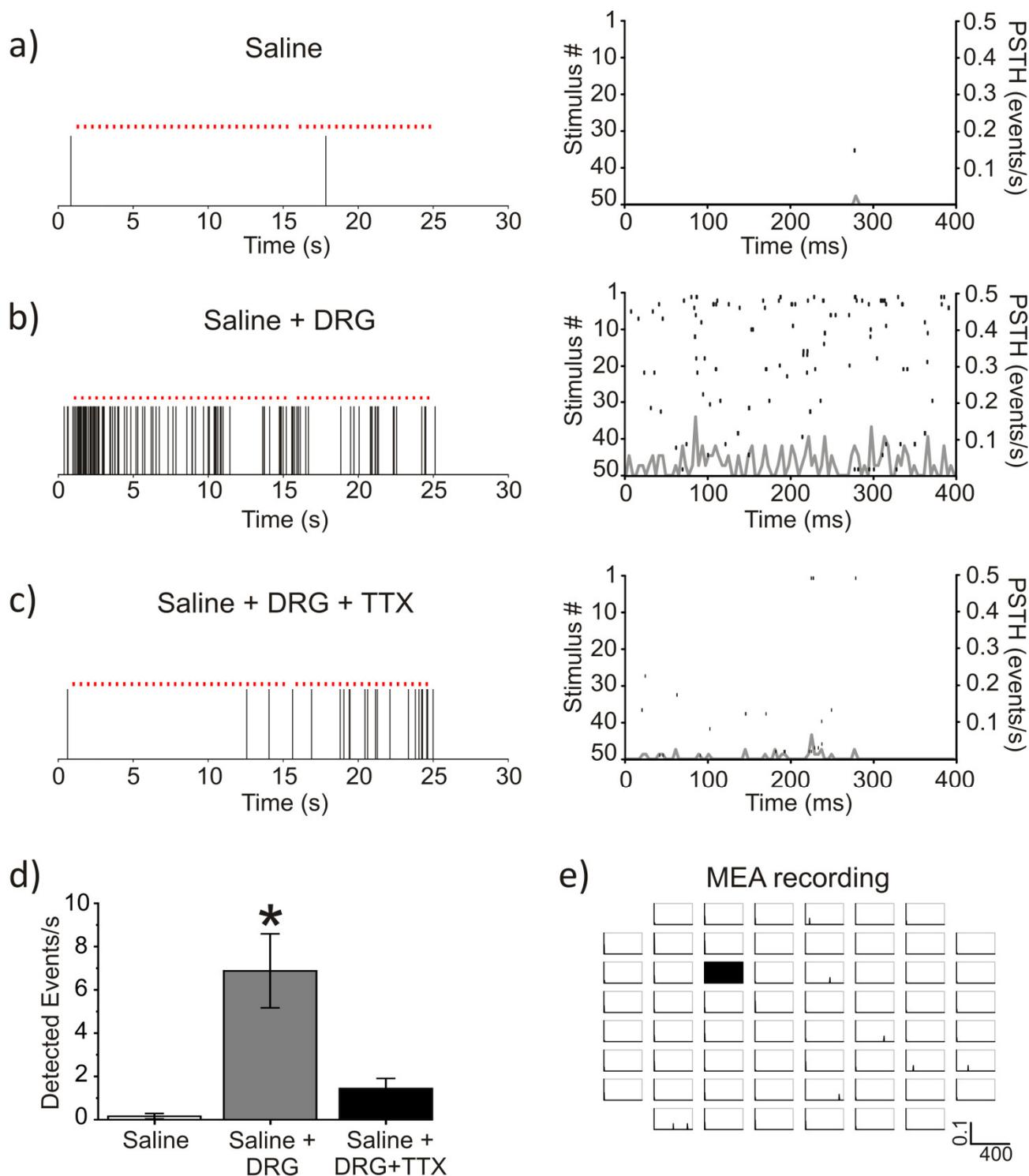


Figura 5.18: Analisi computazionale dei risultati, raster plot e PSTH delle registrazioni dell'OTFT in comparazione con quelle del MEA. (a) OTFT interfacciato con la soluzione salina, (b) OTFT interfacciato con soluzione salina e con sulla sua superficie i DRG e (c) OTFT con salina e DRG trattati con 1 μM di tetratodotossina. A sinistra il raster plot per rilevare gli eventi bioelettrici: ogni barra verticale rappresenta un evento rilevato. La linea di punti rossi sopra i grafici rappresenta la sequenza di stimoli imposti alla soluzione attraverso

l'OTFT. Raster plot dell'attività rilevata in un intervallo di tempo di 400 msec dopo ogni stimolo sovrapposto al profilo del PSTH calcolato (linea grigia). d) Istogramma della frequenza di eventi rilevati durante un periodo di 30 secondi per le tre condizioni sperimentali descritte in (a), (b) e (c). * $p < 0.05$. Le medie sono state calcolate considerando 30 intervalli di attività della durata di 1 secondo ognuno. e) Mappa PSTH 8x8 (i quattro angoli sono esclusi) riportate i 59 profili di PSTH dei canali di registrazione del MEA interfacciato con la soluzione salina contenente i neuroni DRG. Il rettangolo nero rappresenta l'elettrodo stimolato. Da notare che la scala è diversa da quella utilizzata in (a), (b) e (c): ascissa, ms; ordinata, eventi/s. Il calcolo riguardante la comparazione segnale-rumore è stato effettuato seguendo un protocollo di misura prestabilito [Shahaf et al., 2001] ed ha evinto un valore di circa 22. È interessante notare che il valore corrispondente al MEA accoppiato alla stessa coltura neuronale è 1,4, mentre quello del MEA accoppiato con i neuroni della corteccia è di circa 4. Questi dati mostrano che l'OTFT ha migliorato il rapporto segnale-rumore rispetto al sistema MEA, probabilmente a causa del efficiente accoppiamento tra semiconduttore organico e le cellule.

5.6.7 Conclusioni

In conclusione, è stato studiato un dispositivo organico ad effetto di campo che permette la stimolazione e la trasduzione di attività bioelettrica di neuroni primari. Possono essere indotti diversi comportamenti cellulari tra cui l'iperpolarizzazione e la depolarizzazione della membrana cellulare, a seconda delle condizioni di polarizzazione del dispositivo. La modulazione dell'attività bioelettrica cellulare può essere anche analizzata otticamente, sfruttando la trasparenza della piattaforma del dispositivo. L'OTFT fornisce inoltre la registrazione extracellulare con un buon rapporto tra segnale e rumore, che supera quello del sistema MEA accoppiato alla stessa preparazione neuronale. Tale dispositivo che permette di stimolare e di registrare il segnale bioelettrico potrebbe consentire migliori indagini del

sistema nervoso e potrebbe essere inoltre molto efficace per il controllo dei farmaci in vitro a concentrazioni basse di analita.

8 - Bibliografia

- Adhikary, A., et al., Radiation Research 1997, 148, 493.
- Ahmed, M.U., et al., Analyst 2009, 134(5), 966-972.
- Ahmed, M.U., et al., Food Control 2010, 21(5), 599-605.
- Benfenati, V., et al., Advanced Functional Materials 2012, 22, 1871-1884.
- Benfenati, V., Toffanin, S., Bonetti, S., et al., Nature Materials, *accepted*, 2013.
- Besl, B., and Fromherz, P., European Journal of Neuroscience 2002, 15, 999-1005.
- Bettinger, C.J., et al., Advanced Materials 2010, 22, 651-655.
- Bettinger, C.J., et al., Biomaterials 2009, 30, 3050.
- Biran R., et al., Experimental Neurology 2005, 195, 115-26
- Blanco, L., A. et al., Journal of Biological Chemistry 1989, 264(15), 8935-8940.
- Bontemps, J., et al., Nucleic Acid Reserch 1975, 2(6), 971-84.
- Bove, M., et al., Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1995, 38, 255-265.
- Bräuner, T., et al., Biochemical Biophysics Acta 1984, 771, 208-16.
- Brown, P.J., et al., Physical Review B, 2001, 63, 125204.
- Brüggemann, D. et al., Nanotechnology. 2011, 22, 265104.
- Bystrenova, E., et al., Advanced Functional Materials 2008, 18, 1751-1756.
- Cagnin, S., et al., Sensors 2009, 9(4), 3122-3148.
- Cesarone, C.F., et al., Analytical Biochemistry 1979, 100, 438.
- Chidsey, C.E.D., et al., Journal of American Chemical Society 1990, 112(11), 4301-4306.
- Choi, Y.S., et al., Journal of Micromechanics and Microengineering 2005, 15(10), 1938-1946.
- Cohen-Karni, T., et al., Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106, 7309-7313.
- Cornil, A., et al., Advanced Materials, 2001, 13, 14.
- Corcoran, J., et al., Nature Neuroscience 1999, 2, 307-308.
- Denison, L., et al., Internation Journal of Radiation Biology 1992, 61, 69.
- Dinelli, F., et al., Advanced Materials 2006, 18, 1416-1420.

Dirks, R.M., and N.A. Pierce, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(43), 15275-15278.

Douglas Fields, R., et al., *Journal of Neuroscience* 1990, 10, 2950-2964.

Downs, T.R., and Wilfinger, W.W., *Analytical Biochemistry* 1983, 131, 538.

Duan, X. et al., *Nature Nanotechnology* 2012, 7, 174-179.

Duchardt F., et al., *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284, 36099-108.

Eickenscheidt, M., et al., *Journal of Neurophysiology* 2012, 107, 2742-55.

Ellwart, J.W., and Dormer, P., *Cytometry* 1990, 11, 239.

Everill, B., et al., *Journal of Neurophysiology* 1998, 79, 1814-24.

Finklea, H.O., *Electroanalytical Chemistry* 1996, 19, 109-335.

Finklea, H.O., et al., *Langmuir* 1987, 3(3), 409-413.

Frega, M., et al., *Neurotoxicology Teratology* 2012, 34, 116–127.

Fromherz, P., In: *Nanoelectronics and Information Technology*, 2003, 781-810, Wiley-VCH, Berlin.

Fromherz, P., *Science* 1991, 252, 1290-1293.

Gabl, R., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 2004, 19(6), 615-620.

Ge, C., et al., *Biosensors & bioelectronics* 2003, 18(1), 53-58.

Ghezzi, D., et al., *Nature Communication* 2011, 166, 1-7.

Gingeras, T.R., et al., *Nucleic Acids Research* 1987, 15(13), 5373-5390.

González, J.E. et al., *Chemical Biology* 1997, 4, 269-77.

Grieshaber, D. et al., *Sensors* 2008, 8, 1440-1168.

Guan, Y., et al, *Journal of Physical Chemistry B* 2007, 111(25), 7336-7344.

Hak Oh, J., et al., *Applied Physics Letters* 2007, 91, 21211071-21211073.

Hamil, O.P., et al., *Pflugers Arch.* 1981, 391, 85-100.

Hasan, Q., and Tamiya, E., *Electrochemical Communication* 2004, 6, 337.

Hashimoto, K., et al., *Analytical Chemistry* 1994, 66(21), 3830-3833.

Hashimoto, K., et al., *Sensors and Actuators B-Chemical* 1998, 46(3), 220-225.

Heal, R. D., et.al., *Biosensors & Bioelectronics* 2001, 16, 905–909.

Heaton, R.J., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, 98(7), 3701-3704.

Hegner, M., et al., *Surface Science* 1994, 291(1-2), 39-46.

Herne, T.M., and M.J. Tarlov. *Journal of American Chemical Society* 1997, 119(38), 8916-8920.

Hodgkinson, G.N., et al., *Biomaterials*. 2012 33, 4288-4297.

Hong, S.R., et al., *Talanta* 2010, 82(3), 899-903.

Huang, E., et al., *Langmuir* 2000, 16(7), 3272-3280.

Jiang Y., et al., *Journal of Biomedical Materials and Research B* 2010, 93,275.

Johnstone, A.F.M., et al., *NeuroToxicology* 2010, 31, 331-350.

Kelley TW, et al., *Chemical Materials* 2004, 16, 4413.

Khie, M., et al., *Lab on a Chip* 2005, 5(1), 38-43.

Kim, D.-H., et al., *Nature Materials* 2010, 9, 511-517.

Kitamura, N., et al., *Biomedical Research* 2005, 26, 123-30.

Kitamura, N., et al., *Biomedical Research* 2005, 26, 123-30.

Kittel, *Introduction to Solid State Physics*.

Kobayashi, M.; Kusakawa, T.; Saito, M.; Kaji, S.; Oomura, M.;Iwabuchi, S.; Morita, Y.;

Kuribara, K., et al., *Nature Communication* 2012, 3, 723-738.

Lao, R., et al., *Analytical chemistry* 2005, 77(19), 6475-6480.

Latt, A.A., and Wohlleb, J.C., *Chromosoma* 1975, 52, 297.

Latt, S.S., and Wohlled, J.C., *Chromosoma* 1975, 52, 297.

Leff, D.V., et al., *Langmuir* 1996, 12(20), 4723-4730.

Loi, M.A., et al., *Synthetic Metals* 2003, 139, 687-690.

Ma, F., and R.B. Lennox. *Langmuir* 2000, 16(15), 6188-6190.

Mabeck, J.T., and Malliaras, G.G., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, 384, 343-353.

Maccione, A., et al., *Journal of Neuroscience Methods* 2009, 177, 241-249.

Maccione, A., et al., *Journal of Neuroscience Methods*, 2009, 177, 241-249.

Maiti, S., et al., *Biochemical and Biophysics Research Communication* 2003, 310, 505.

Margineanu, A., et al., *Biophysics Journal* 2007, 93, 2877-2891.

McDonnel B., et al., *Clinical Biochemistry* 2009,45, 549-561.

Medelnick, M., et al., *United States Patent No. 6541032* , 2003.

Melli, G., et al., *Expert Opinions Drug Discovery* 2009, 4, 1035-1045.

Muccini, M., *Nature Materials* 2006, 5, 605-613.

Muller, W., and Gautier, F., *European Journal of Biochemistry* 1975, 54, 385.

Nam, Y., and Wheeler, B.C., *Critical Review in Biomedical Engineering* 2011, 39, 45-61.

Nirchl, M., et al., *Analysis Biosensors* 2011, 1(3), 70-92.

Nossal N.G., et al., *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282, 1098-108.

Novellino, A., et al., *Frontier in Neuroengineering* 2011, 4, 1-14.

Nuzzo, R.G., et al., *Journal of American Chemical Society* 1987, 109(3), 733-740.

O'Donnell, M.J., et al., *Analytical Chemistry* 1997, 69(13), 2438-2443.

Offenhäusser, A., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 1997, 12, 819-826.

Parab, H.J., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 2010, 26(2), 667-673.

Patolsky, F. et al., *Science* 2006, 313, 1100-1104.

Pease, A.C., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, 91(11), 5022-5026.

Peterson, A.W., *Journal of American Chemical Society* 2000, 122(32), 7837-7838.

Petrovykh, D.Y., et al., *Journal of American Chemical Society* 2003, 125(17), 5219-5226.

Poghossian, A., et al., *Seminar in Cell and Developmental Biology* 2009, 20, 41-48.

Goodman R.P., et al., *Science* 2005, 310(9), 1661-1665.

Reese C., et al., *Materials today*, 2007, 10, 3.

Rieke, F., et al., *The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA*, 1997.

Roberts, M.E., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105, 12134-12139.

Ruegg, U.T., and Rudinger, J., *Methods in Enzymology* 1977, 47, 111-116.

S. Lai , *Advanced Materials* 2013, 25, 103-107.

Saito, M., et al., *Journal of Biochemistry* 2004, 136(6), 813-823.

Sam, M., *Langmuir* 2001, 17(19), 5727-5730.

Sanvicens, N., et al, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2009, 28(11), 1243-1252.

Sapse, A. M., et al., *Journal of Molecular Structure* 1997, 393, 25.

Schoen, I., and Fromherz, P., *Journal of Neurophysiology* 2008, 100, 346-57.

Shahaf, G., et al., *Journal of Neuroscience* 2001, 21, 8782-8788.

Singh T.B., et al., *Advanced Materials* 2005, 17, 2315.

Singh, R.P., et al., *Cell Transplant* 2009, 18, 55-68.

Sirringhaus, H. Et al., *Advanced Materials* 2005, 17, 2411-2425.

Someya, T., et al., *Langmuir* 2002, 18, 5299-5302.

Southern, E.M., et al., *Nucleic Acids Research* 1994, 22(8), 1368-1373.

Spijkman, M.J., et al., *Advanced Functional Materials* 2010, 20, 898–905.

Steel, A.B., et al., *Biophysics Journal* 2000, 79(2), 975-981.

Stoliar, P., *Biosensors and Bioelectronics* 2009, 24, 2935–2938.

Sufen, W., et al, *Electroanalysis* 2002, 14(23), 1648-1653.

Tonazzini, I., et al., *Biophysics Journal* 2010, 98, 2804-2812.

Tripathi, P.K., et al., *Neuroscience* 2006, 143, 923-938.

Turner, A., et al., Oxford University Press 1987, 770.

Ulbricht, W., *Physiological Review* 2005, 85, 1271-301.

Ulman, A., *Chemical Review* 1996, 96(4):1533-1554.

van der Zee, C.E.E.M., et al., *Journal of Neuroscience* 1989, 9, 3505-3512.

Vericat, A.C., et al.. *Journal of Physics: Condensed Matter* , 48, R867.

Voelker, M., and Fromherz, P. *Small* 2005, 1, 206-210.

Voskerician, G. et al., *Biomaterials* 2003, 24, 1959-1967.

Wackerbarth, H., et al., *Angewandte Chemie International Edition* 2004, 43(2), 198-203.

Wagner, P., et al., *Langmuir* 1995, 11(10), 3867-3875.

Wan, Y., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 2009, 24(5), 1209-1212.

Wang, J., E. et al., *Journal of American Chemical Society* 1996, 118(33), 7667-7670.

Wang, J., et al., *Talanta* 1997, 44(11), 2003-2010.

Weisblum, B., et al., *Chromosoma* 1974, 46, 255.

Whitesides, G.M., and Laibinis P.E., *Langmuir* 1990, 6(1), 87-96.

Willner I and Willner B, *Trends Biotechnol* 2001, 19, 222.

Wirtz, R., et al., *Langmuir* 2004, 20(4), 1527-1530.

Wood, M.D., et al., *Journal of Neural Engineering* 2009, 6, 046003-046011.

Xie, W., et al., *Pain* 2010, 151, 447-59.

Yoshimura, T., et al., *Nucleic acids symposium series* 2006 50,303-304.

Yuan Guan, et al., *Journal of Physics Chemistry B* 2007, 111, 7336-7344

Yumusak C, Singh TB, Sariciftci NS and Grote JG, *Applied Physics Letters* 2009, 95, 263304.

Zhang, D., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 2010, 26(4), 1736-1742.

Zhang, Q., and Tan, Y., *Neuroscience* 2011, 193, 72-9.

Zhang, Q., et al., *Neuroscience* 2011, 193, 72-9.

Zhao, Y., et al., *Luminescence* 2009, 24, 140-143.

Bergveld, P., et al., *IEEE Biomedical engineering*, 1976 23,136–44.

Fromherz, P, et al., *Science* 1991, 252, 1290–3.

Vassanelli, S, et al., *Apply Physics A* 1998, 66, 459–63.

Peitz, I, et al., *Angewandte Chemie* 2007, 46, 5787–90.

Pabst, M, et al., *European Physics Journal Edition* 2007, 24, 1–8.

Schmidtner, M, et al., *Biophysics Journal* 2006, 90, 183–9.

Offenhäusser A, et al., *2nd Strategic Polymer Symposium*; 2007.

Hamill, O.P., et al., *Pflüger Archiv.*, 391, 85-100, 1981.

Neher, E., et al., *Nature*, 260, 799-802, 1976.

Neher, E., 1981, Ed. Baker Elsevier, North-Holland, Amsterdam.

Ringrazimenti

Vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno sorretto e mi hanno accompagnato in questi tre anni di ricerca, partendo dai miei colleghi sia di università che del CNR, arrivando ovviamente alle persone che amo.

Ringrazio quindi Daniele Gazzola, per aver condiviso con me i primi due anni di università, per avermi trasmesso una visione scientificamente più ampia degli approcci sperimentali e per avermi dato tanti sorrisi e tanta tenacia per affrontare i momenti più arrannevoli. Vorrei inoltre ringraziare Manu, per aver resistito per quei due anni con me in quello stanzino 2*1 e Giampaolo Zuccheri per avermi osservato con la sua proverbiale accuratezza.

Michele Muccini che mi ha accolto nel suo gruppo di ricerca durante la mia attività di dottorato, permettendomi di studiare e sperimentare approcci innovativi nell'ambito della biosensoristica e dell'elettronica organica. Valentina Benfenati per avermi condotto in tali studi con semplicità e con tenacia e Stefano Toffanin per aver condiviso con me parte di essi.

Le mie colleghe Tamara, Assunta e Anna per essersi divertite con me a lavorare, osservare e ragionare multidisciplinarmente sulle cose più bizzarre. Riccardi, la Tessa (per te è doppio) e la Susi e tutti gli altri squinternati all'interno del nostro gruppo di ricerca che anch'essi mi hanno fatto passare degli ottimi momenti all'interno del nostro ambiente di lavoro e Tania, che non si scompone mai, manco con rumori temporaleschi misto a vulcaneggianti.

I miei amici, non vi ringrazio uno ad uno perché siete veramente troppi ma sappiate che ognuno di voi mi rende sempre più grato a questo mondo per avervi incontrato.

Ovviamente alla mia famiglia, che oltre ad essere la terza volta che la ringrazio formalmente alla fine dei miei percorsi di studio mi ha sempre supportato, amato. Ma che inoltre ultimamente abbiamo reso felice con ben altro, rispetto a ciò!!!

Ma adesso mi sposterò sui ringraziamenti più importanti, quelli che non avrei mai pensato di fare all'inizio di questo percorso e che invece fortunatamente faccio:

GRAZIE ANNA!!!! Tu mi hai fatto capire che la felicità non è semplicemente sentimento bello e necessario, ma anche che è sempre in crescendo, che non ha limiti e che con te e la nostra Ceci viaggeremo in essa senza stancarci mai di scoprire quel che riusciremo a creare.

Ovviamente lo sai!!!!