

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Scuola di Scienze
Corso di Laurea in Fisica

Polimeri biocompatibili come substrati per colture cellulari

Relatore:
Prof.ssa Beatrice Fraboni

Presentata da:
Margherita Sola

Sessione II
Anno Accademico 2012/2013

Polimeri biocompatibili come substrati
per colture cellulari

Margherita Sola

Indice

1	Polimeri conduttori e PEDOT:PSS	5
1.1	I polimeri	5
1.2	I polimeri coniugati	7
1.2.1	Drogaggio	7
1.2.2	Dipendenza dalla temperatura	9
1.3	PEDOT	10
1.4	PEDOT:PSS	11
1.5	Proprietà di film sottili di PEDOT:PSS	12
1.5.1	Proprietà termiche e luminose	13
1.5.2	Proprietà meccaniche	13
1.5.3	Conduttività	14
1.6	Applicazioni bioelettroniche del PEDOT:PSS	17
1.6.1	Bioelettronica organica	17
1.6.2	PEDOT:PSS come substrato per colture cellulari	21
2	Apparato sperimentale	23
2.1	Strumenti	23
2.1.1	Spin-coater	23
2.1.2	Sourcemeeter Keithley 2400	25
2.1.3	AFM (Atomic Force Microscope)	26
2.2	Materiali	29
2.2.1	PEDOT:PSS	29
2.2.2	ITO (Indium Tin Oxide)	29
2.2.3	PBS (Phosphate Buffered Saline)	31

2.2.4	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	31
2.2.5	Coltura e osservazione cellulare	32
3	Analisi dati	35
3.1	Preparazione dei campioni	35
3.1.1	Procedimento di ossido-riduzione	36
3.2	Misure di morfologia superficiale	37
3.2.1	Procedimento di acquisizione immagini	37
3.2.2	Analisi delle immagini acquisite	39
3.3	Crescite cellulari	43

Introduzione

Questo lavoro costituisce un'interfaccia tra la fisica dei materiali e la biologia; sfruttando le particolari proprietà del polimero conduttore poli(3,4-etilenediossitiolfene) drogato con poli(stirene sulfonato) (PSS), o PEDOT:PSS, sono stati sviluppati e realizzati substrati per colture cellulari. Tale composto è infatti un polimero organico biocompatibile, caratterizzato da proprietà fisiche che ben si prestano ad applicazioni in campo biologico.

Vengono inizialmente descritte le caratteristiche generali e gli schemi di classificazione dei polimeri, per analizzare quindi in dettaglio i polimeri conduttori e la loro modalità di drogaggio. Si presenta quindi il PEDOT:PSS, del quale vengono descritte le proprietà, in particolare ci si sofferma sulle quelle termiche, meccaniche ed elettriche. Il primo capitolo si conclude con la presentazione delle applicazioni bioelettroniche del PEDOT:PSS, illustrando le principali applicazioni nella ricerca biologica e descrivendo le caratteristiche che ne hanno fatto uno dei composti più utilizzati per questo tipo di applicazioni.

Nel secondo capitolo, per la parte sperimentale, sono stati descritti approfonditamente gli strumenti e i materiali utilizzati; in particolare vengono spiegati dettagliatamente il procedimento di spin-coating per la produzione di film sottili e le tecniche AFM (Atomic Force Microscopy) per l'analisi della morfologia superficiale.

Nel terzo capitolo vengono esposte le tecniche sperimentali impiegate: è stata sviluppata una procedura di produzione ripetibile, grazie alla quale sono stati realizzati dei campioni, per i quali poi è stata misurata la rugosità. I risultati conseguiti sono stati infine correlati con l'analisi della proliferazione cellulare, illustrata chiaramente dalle immagini ottenute al microscopio ottico, che rivelano l'adesione e la moltiplicazione cellulare sui substrati di PEDOT:PSS.

Capitolo 1

Polimeri conduttori e PEDOT:PSS

1.1 I polimeri

Un polimero (dal greco *πολυ μέρος* cioè “che ha molte parti”) è una macromolecola composta da un grande numero di molecole identiche, chiamate *monomeri*, unite tra di loro con un legame chimico covalente per mezzo di un processo chimico detto *polimerizzazione*. Grazie a questo processo, il polimero acquista particolari proprietà, che le molecole costituenti non hanno singolarmente.

Molti polimeri sono di uso quotidiano, per esempio la comune plastica sintetica, gli elastomeri o le fibre tessili (come il nylon). Sebbene nel linguaggio comune il termine polimero venga associato a macromolecole di origine sintetica, in realtà si applica a una grande quantità di materiali con proprietà molto diverse, comprendendo anche i biopolimeri naturali, come gli acidi nucleici e le proteine. Esistono anche altri polimeri naturali, come la gomma naturale, l’ambra o la cellulosa, mentre alcuni esempi dei più comuni polimeri sintetici sono:

- le materie plastiche (PVC, polietilene, polipropilene)
- le fibre tessili (come il nylon)
- il silicone e gli elastomeri

...e molti altri. Solitamente la catena di un polimero usato per la preparazione di materie plastiche consiste per lo più di atomi di carbonio (polimeri organici).

A seconda del tipo di legame, i polimeri possono essere suddivisi in due classi: i polimeri *saturati* e i polimeri *coniugati*. Se tutti gli elettroni di valenza vengono utilizzati per formare un legame σ covalente, il polimero è saturato; se alcuni orbitali (in genere gli orbitali p_z degli atomi di carbonio) non sono invece coinvolti nella formazione dei legami σ , essi possono costituire un sistema π lungo la catena del polimero, e il polimero viene detto coniugato.

I polimeri saturati sono isolanti, e per questo sono stati a lungo considerati privi di interesse come componenti per l'elettronica; i polimeri coniugati hanno invece una configurazione elettronica completamente diversa e proprietà elettriche molto varie.

È necessario distinguere i polimeri conduttori a seconda del tipo di conduttività: i polimeri a *conduttività estrinseca*, prodotti mescolando materiali conduttori (come fibre metalliche o carbonio in forma di grafite) con un polimero non-conduttore; e i polimeri a *conduttività intrinseca*, prodotti introducendo delle cariche elettriche in un polimero coniugato, per via chimica oppure elettrochimica.

In termini di conduttività, il confine tra materiali elettricamente isolanti, semiconduttori e conduttori non è netto, come mostra la figura 1.1; in particolare i polimeri coniugati spaziano entro un ampio range di conduttività,.

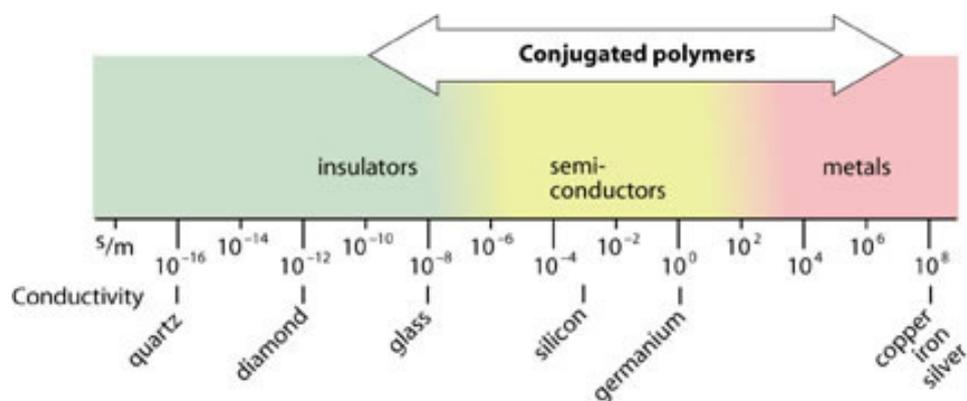


Figura 1.1: Conduttività elettrica di materiali isolanti, semiconduttori e conduttori

1.2 I polimeri coniugati

Abbiamo visto che le proprietà elettriche di questi polimeri dipendono dalla configurazione elettronica degli atomi costituenti e dalla loro interazione all'interno del polimero stesso. Essi sono caratterizzati da uno scheletro costituito da legami σ ed un sistema di orbitali p ad esso ortogonali, che danno origine a legami π coniugati lungo tutta la catena. In particolare, quando nella struttura del polimero gli orbitali degli atomi di carbonio tendono a sovrapporsi, si formano legami di tipo π , permettendo la delocalizzazione degli elettroni all'interno del polimero. Si ottiene così un movimento di cariche e quindi un effetto conduttivo.

Il modello a bande è applicabile anche a questi polimeri; all'aumentare del numero di doppi legami coniugati, ovvero all'aumentare della lunghezza della catena polimerica stessa, diminuisce l'energia del gap tra la banda di valenza, formata dagli orbitali π di legame, e quella di conduzione, formata dagli orbitali π^* di antilegame (per la precisione gap $\pi - \pi^*$ è dato dalla differenza di energia tra il livello energetico del più alto stato π occupato e il più basso stato π^* non occupato). Per catene macroscopiche, questa dipendenza dell'energia del gap con l'inverso del numero di legami di tipo π all'interno del polimero, rappresenterebbe un comportamento essenzialmente metallico, ma modelli più dettagliati hanno smentito questa supposizione. I polimeri coniugati non conducono tutti alla stessa maniera e possono essere quindi suddivisi in due gruppi: quelli che presentano le tipiche proprietà dei semiconduttori e quelli che invece si comportano come metalli. I polimeri coniugati, se sono puri, si comportano come semiconduttori a bassa conduttività, in quanto non contengono mai bande solo parzialmente occupate [1].

1.2.1 Drogaggio

Proprio perché non ci sono bande parzialmente occupate, i polimeri coniugati sono in genere semiconduttori a bassa conduttività. Siccome in genere si tratta di molecole organiche, sono state sviluppate diverse tecniche per introdurre delle cariche elettriche in modo reversibile, così da cambiare le proprietà elettroniche di questi materiali. Il termine “drogaggio” usato in questo contesto genera spesso confusione, in quanto esso viene solitamente usato per indicare l'introduzione di un atomo esterno in un reticolo, in modo da modificare la struttura elettronica.

Quando ci si riferisce a polimeri conduttori, il termine “drogaggio ”indica invece una reazione chimica di ossidazione o di riduzione. Per introdurre cariche nei polimeri coniugati e renderli così conduttori, possono essere utilizzati sia agenti riducenti che ossidanti, cioè agenti di drogaggio che donano elettroni (tipo n) o li accettano (tipo p); è quindi possibile realizzare materiali sia a trasporto di elettroni che a trasporto di lacune.

Nel 1976 Shirakawa, MacDiarmid e Heeger scoprirono che l’ossidazione con i vapori di cloro, bromo e iodio aumenta la conduttività dei film di poliacetilene di un fattore 109 rispetto alle condizioni iniziali. Per tale lavoro essi ottennero nel 2000 il premio Nobel per la Chimica “per la scoperta e lo sviluppo di polimeri elettricamente conduttori”.

La scoperta di queste proprietà simili a quelle di un metallo hanno aperto nuove possibili applicazioni per i polimeri, soprattutto nell’industria elettronica. L’idea che la plastica possa condurre l’elettricità è stata a lungo considerata assurda, e in effetti la plastica è stata in grande misura utilizzata dall’industria elettronica proprio per le sue proprietà isolanti.

Le cariche introdotte nei polimeri determinano la formazione di nuovi stati, chiamati *polaroni* e *bipolaroni*. Si forma un polarone quando un elettrone viene aggiunto (polarone-elettrone) o rimosso (polarone-lacuna) dalla catena coniugata: la conseguente deformazione della catena provoca un cambiamento della struttura dei livelli energetici. Con la formazione di un polarone, si crea un nuovo livello sulla banda di conduzione se si tratta di un polarone-elettrone; al contrario viene rimosso un elettrone da un livello creato nella banda di valenza se si tratta di un polarone-lacuna. In entrambi i casi si crea un nuovo livello semi-pieno, con spin $\frac{1}{2}$.

Un polarone occupa uno spazio circoscritto, in parte a causa dell’attrazione coulombiana con il proprio controione, che in genere ha una mobilità molto bassa, e in parte a causa di una variazione nella geometria della struttura. Di conseguenza il drogaggio deve essere forte per riuscire a ottenere elevate mobilità dei portatori.

Quando un secondo elettrone viene rimosso da una sezione di un polimero già precedentemente ossidata, può succedere che venga creato un secondo polarone indipendente oppure, se è l’elettrone spaiato del primo polarone che viene rimosso, che si formi un bi-polarone. Lo stesso meccanismo porta alla formazione di bi-polaroni aggiungendo elettroni a una sezione del polimero già ridotta: possiamo così considerare i bi-polaroni

creati dalla combinazione di due polaroni con la stessa carica. In un bi-polarone le due cariche non sono indipendenti, ma si muovono come una coppia. Vi sono due livelli nel gap di energia: nel caso di un bi-polarone negativo, entrambi i livelli sono completamente occupati mentre nel bi-polarone positivo entrambi i livelli sono vuoti. Perciò, mentre lo spin di un polarone è uguale a $\frac{1}{2}$, lo spin di un bi-polarone è pari a 0.

1.2.2 Dipendenza dalla temperatura

La dipendenza dalla temperatura segue il consueto andamento tipico dei semiconduttori: il materiale è isolante a basse temperature, poiché l'energia del gap prevale su quella termica degli elettroni che non riescono a saltare nella banda di conduzione; al crescere della temperatura, la conduttività aumenta esponenzialmente. Questo comportamento è contrario a quello dei metalli, per i quali la conduttività diminuisce all'aumentare della temperatura, poiché i portatori di carica risentono di una diminuzione della mobilità a causa dell'aumento delle vibrazioni reticolari all'interno del materiale.

I polimeri fortemente drogati mostrano un comportamento anomalo: esiste un punto di *crossover*, cioè un valore di temperatura dopo il quale la conduttività cessa di aumentare e inizia lentamente a decrescere.

È possibile rivelare se i portatori di carica sono elettroni o lacune applicando una differenza di temperatura al materiale; infatti le cariche mobili tendono a concentrarsi nelle zone più fredde e, se per un tipo di portatori questo fenomeno è più rilevante che per l'altro, si viene a creare un campo elettrico. Il parametro associato a questo fenomeno è il *potere termoelettrico*, definito come la costante di proporzionalità tra l'intensità del campo elettrico formatosi e il gradiente di temperatura; se risulta positivo, significa che i portatori maggioritari sono lacune, se risulta negativo invece che sono elettroni.

1.3 PEDOT

Il PEDOT (poli(3,4-etilenediossitiufene)) è ottenuto dalla polimerizzazione chimica o elettrochimica di monomeri di EDOT (3,4-etilenediossitiufene). È un polimero coniugato a conduttività intrinseca e la sua scoperta è stata opera dei laboratori di ricerca Bayer, in Germania, alla fine degli anni '80.

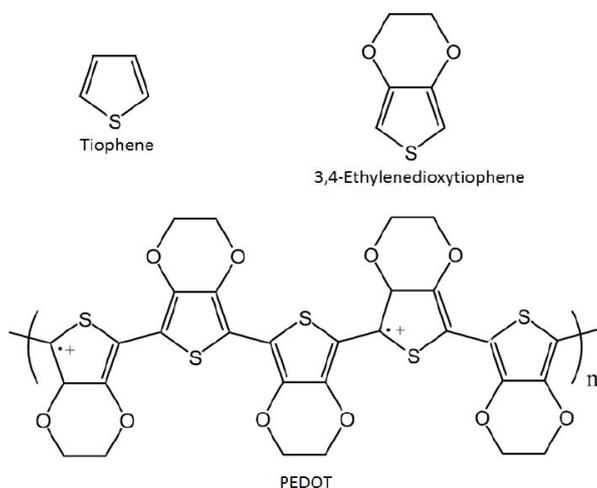


Figura 1.2: struttura chimica del PEDOT

Questa sostanza è molto interessante per le sue svariate proprietà:

- presenta un'elevata reversibilità, che permette di passare ripetutamente dallo stato drogato allo stato non drogato. Nello stato ossidato è pressoché trasparente e di colore celeste, mentre nello stato neutro appare opaco e di colore blu scuro. Questo cambiamento visibile del colore tra i due stati rende il PEDOT adatto ad applicazioni ottiche, per esempio nei display elettrocromici;
- il PEDOT è molto stabile sia chimicamente che termicamente. Gli studi condotti indicano che il degradamento inizia intorno ai 150°C, mentre la completa decomposizione avviene solamente intorno ai 390°C. A temperature ambientali, la sua conducibilità elettrica rimane sostanzialmente inalterata nel tempo. L'elevata stabilità del PEDOT è legata alla sua conformazione ad anello e all'effetto degli atomi di ossigeno nelle posizioni 3,4, che cedono elettroni bilanciando le cariche positive presenti nella struttura del polimero;

- l'ampiezza del gap è pari a circa 1,5-1,6 eV; ma dopo il processo di drogaggio si riduce a 1 eV. Perciò il PEDOT manifesta nello stato drogato elevati valori di conducibilità elettrica, superiori a 550 S/cm;
- il suo *potenziale di riduzione* (cioè la sua tendenza ad acquisire elettroni) è più basso rispetto a quello degli altri polimeri conduttori, e questa proprietà conferisce un'elevata stabilità elettrochimica al PEDOT nello stato drogato.

La fortuna del PEDOT è principalmente legata al fatto che può essere sottoposto a dispersione polimerica. Questo termine indica un sistema a due fasi costituito da un insieme di particelle di natura polimerica, idrofobe, di forma sferoidale, con diametro nell'ordine dei micron, disperse in un mezzo. La metodica di sintesi [2] è basata sulle seguenti operazioni :

1. *formazione della emulsione monomero/acqua*: il monomero liquido è versato lentamente in un recipiente contenente acqua, ed il sistema è sottoposto ad agitazione fino alla formazione di una fase dispersa costituita da minuscole particelle di monomero;
2. *polimerizzazione e formazione della dispersione polimero/acqua*: alla emulsione monomero/acqua viene aggiunto il catalizzatore per fare partire la reazione di polimerizzazione che procede, separatamente, in ogni singola particella. Il processo conduce all'ottenimento di una emulsione di particelle di polimero disperse in acqua.

1.4 PEDOT:PSS

Il PEDOT non è però solubile in nessun solvente, per cui necessita dell'anione PSS (polistirene sulfonato), come controione, per poter essere combinato. Il composto che si ottiene è un poli-elettrolita composto (PEC) in cui il PEDOT rappresenta lo stato ossidato, che ben si presta per formare emulsioni stabili. La figura 1.3 presenta la struttura chimica del PEDOT:PSS.

Il drogaggio del PEDOT col poli-elettrolita PSS fu sperimentato per la prima volta nel 1990 e il successo riscontrato lo ha fatto diventare lo standard industriale ancor

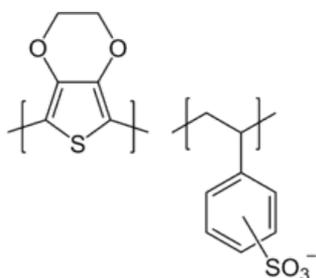


Figura 1.3: struttura chimica del PEDOT:PSS

oggi utilizzato. La combinazione può avere il PSS presente in diverse quantità di pesi molecolari, e quindi con diverse poli-dispersività. Il PSS si trova facilmente in commercio e viene usato per formare film resistenti e trasparenti, in quanto il PSS è altamente solubile in acqua e non presenta assorbimenti nel campo della luce visibile.

Quando viene utilizzato come controione per il PEDOT, il PSS è usato sempre in eccesso. Il rapporto molare dei gruppi di tiofene sui gruppi di acido solfonico nella dispersione standard PEDOT:PSS varia tra 1:1,9 a 1:15,2, che corrisponde a una variazione del rapporto di massa tra 1:2,5 a 1:20. La carica in eccesso di PSS varia da 6 a 46 volte, in quanto è presente una carica per ogni 3 o 4 anelli di tiofene. La struttura del PEDOT:PSS dipende fortemente dalla delocalizzazione delle cariche positive nel PEDOT, dai deboli gruppi polari risultanti e dalla diversa spaziatura delle cariche del PEDOT rispetto al PSS. Per questo motivo, la struttura del composto presenta interazioni casuali tra le rispettive catene di polimeri, senza nessun ordine a livello molecolare o supermolecolare. Il nome comunemente dato a questo tipo di struttura è *scrambled-eggs* (uova strapazzate).

La dimensione delle particelle nella dispersione di PEDOT:PSS può essere calcolata applicando un processo di ultracentrifugazione; la distribuzione della dimensione medie delle particelle, comprese tra i 10 nm e 1 μm , è tipicamente non-gaussiana.

1.5 Proprietà di film sottili di PEDOT:PSS

La dispersione iniziale può essere ridotta in film sottili attraverso varie procedure; lo *spin-coating* è una tecnica molto semplice ed efficace per ottenere film di spessore fino a 300 nm ed è quella utilizzata nell'ambito di questo lavoro.

1.5.1 Proprietà termiche e luminose

I film sottili di PEDOT:PSS hanno un'elevata stabilità termica fino a 200°C. Al di sopra di tale valore, il gruppo PSS si rompe a causa dell'evaporazione, causando il degradamento del materiale, mentre sopra i 350°C il carbonio si ossida, provocandone la decomposizione.

Molto importante è anche la proprietà relativa all'esposizione alla luce dei film, perché la conduttività dei film diminuisce considerevolmente, quando vengono assorbiti fotoni provenienti da raggi UV con $\lambda < 320$ nm. I film di PEDOT:PSS sono soggetti a degradarsi come conseguenza del processo di ossidazione del PEDOT, che viene indotto dall'aria ed è accelerato dall'assorbimento di raggi UV. Le possibili applicazioni all'aperto del materiale sono così limitate, in quanto è necessario prendere misure che si oppongono a questo processo, per esempio limitando il processo di ossidazione attraverso la riduzione dello spessore dei film o l'aggiunta di stabilizzanti.

1.5.2 Proprietà meccaniche

L'elevata flessibilità del PEDOT:PSS lo rende interessante rispetto ad altri materiali, perché non si rompe quando viene steso su fogli di polimeri sottoposti a flessione. Svolgendo prove di resistenza a trazione su film di PEDOT:PSS, si osserva la forte dipendenza delle caratteristiche meccaniche dal livello di umidità relativa rH, evidenziata dal diagramma in figura 1.4.

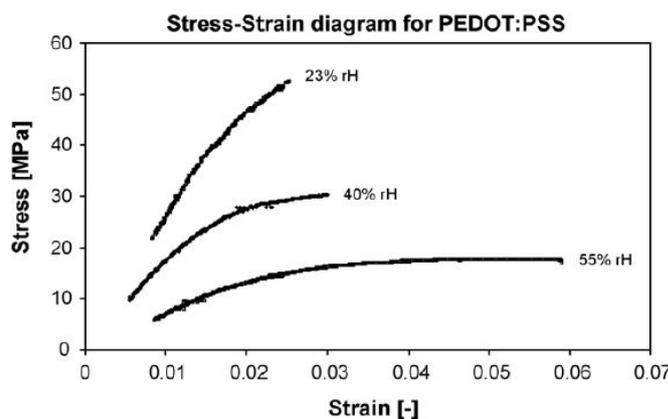


Figura 1.4: Grafico sforzo-deformazione a diversi valori di umidità relativa

Questo effetto dipende dai legami a idrogeno tra le molecole di PSS, che sono alla base della coesione del materiale. Quando il livello di umidità è basso, i legami sono molto forti e, in caso di frattura (cioè quando la crepa cresce) i grani non vengono separati, e quindi si rompono (frattura transgranulare). Quando i livelli di umidità relativa sono più elevati, l'acqua si lega attorno ai grani, aumentandone il volume. In questo modo il materiale tende a un rigonfiamento che aumenta la distanza tra i grani. Per questo motivo, i grani riescono a scorrere tra loro quando il materiale è sottoposto a trazione, generando una frattura intergranulare che può dar luogo a difetti macroscopici.

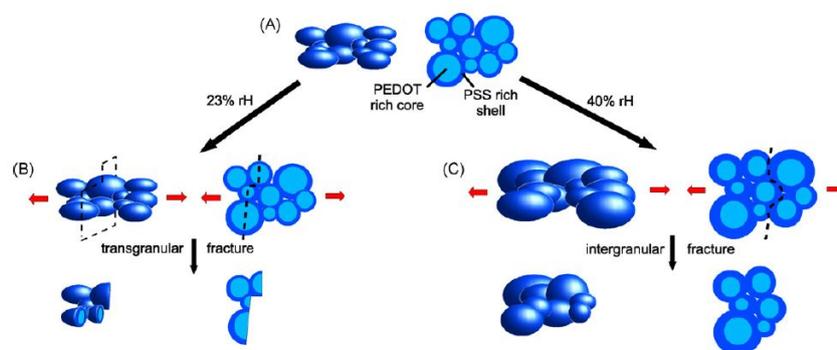


Figura 1.5: (A) Modello a grani di un film di PEDOT:PSS.(B) Frattura transgranulare (basso rH). (C) Frattura intergranulare (rH elevato).

1.5.3 Conduttività

La conduttività intrinseca del PEDOT:PSS rende le proprietà di questo polimero simili a quelle dei metalli. Siccome gli anelli di tiofene sono fortemente drogati p, essi formano un sistema π . A causa della reazione di polimerizzazione ossidativa, ogni 3 - 4 anelli di tiofene si genera così una carica positiva. Il PSS non partecipa direttamente al trasporto di carica ma contribuisce indirettamente alle proprietà legate ai film sottili, poiché è ciò che permette al PEDOT di essere portato nello stato di dispersione polimerica.

La conduttività, nel caso di di materiali con entrambi i tipi di portatori (elettroni e lacune) σ è definita:

$$\sigma = n_e \cdot e \cdot \mu_e + n_p \cdot e \cdot \mu_p \quad (1.1)$$

dove e è la carica elementare, ed n e μ sono la densità di portatori e la mobilità di carica di elettroni e lacune.

Il trasporto di carica nel PEDOT:PSS è dovuto alle sole lacune: gli elettroni iniettati si ricombinano con i siti ossidati del PEDOT, non contribuendo alla corrente totale.

La densità del film solido è circa 1 g/cm^3 , mentre la densità di molecole di EDOT è stimata essere pari a circa 10^{21} cm^{-3} , a causa del peso dei monomeri di PEDOT (140 g/mol) e PSS (182 g/mol). La misura elettrochimica del livello di ossidazione ci indica una carica ogni 3 EDOT, per cui la densità delle lacune è stimata pari a $n_p = 3 \cdot 10^{20} \text{ cm}^{-3}$, e la mobilità è approssimativamente calcolata pari a $\mu_p = 20 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$.

La conducibilità σ , o indifferentemente la resistività ρ vengono misurate attraverso la resistenza R e lo spessore del film d sulla base della formula:

$$\rho = \sigma^{-1} = R \cdot d \quad (1.2)$$

Per comprendere il meccanismo di conduzione dei polimeri coniugati consideriamo che le cariche “saltino” tra siti adiacenti. La frequenza del trasporto di carica tra due siti adiacenti è correlata alla loro posizione energetica relativa, alla distanza e all’orientazione relativa.

Durante le sue ricerche sulla proprietà del PEDOT:PSS in funzione della temperatura, A.N. Aleshin ha verificato un aumento della conduttività al crescere di esse; e Mott ha inserito tale caratteristica nel suo modello VRH (Variable Range Hopping), ottenendo la seguente equazione:

$$\sigma(T) = \sigma_0 \cdot e^{-\left(\frac{T_0}{T}\right)^\gamma} \quad (1.3)$$

dove σ_0 è la conduttività a temperatura infinita e γ vale $\frac{1}{1+D}$, con D dimensionalità del sistema.

Il recente lavoro di Mott fornisce una spiegazione del trasporto di carica in numerosi semiconduttori organici. Nel modello VRH, presentato in figura 1.6, il trasporto di carica viene governato esclusivamente dall’ “hopping”, cioè dal salto dei portatori tra siti adiacenti [3]. Questa rappresentazione deriva dal fatto che non ci sono livelli delocalizzati in bande di valenza e conduzione. Analizzando i dati che si derivano dal modello di Mott,

si nota anche che la conduttività è influenzata anche dal pH, in quanto essa è maggiore per bassi valori di pH.

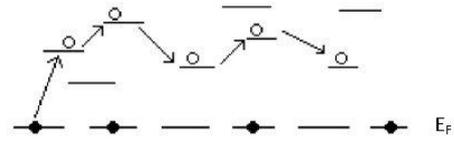


Figura 1.6: Schema di trasporto del modello VRH

1.6 Applicazioni bioelettroniche del PEDOT:PSS

1.6.1 Bioelettronica organica

L'elettronica organica si occupa delle applicazioni di semiconduttori a base di carbonio, principalmente polimeri coniugati, e del loro utilizzo per dispositivi elettronici e optoelettronici.

L'interesse per questi materiali è legato alla possibilità di regolare sinteticamente le loro proprietà elettroniche e il loro comportamento alle basse temperature. Le prime ricerche sull'elettronica organica risalgono agli anni '60, e riguardavano le proprietà dei cristalli organici. Alla fine degli anni '70, il gruppo di scienziati coordinato da Heeger ha dimostrato che il polimero coniugato poliacetilene può acquisire un'elevata conducibilità quando drogato con iodio – una scoperta che ha fatto vincere loro il premio Nobel per la chimica nel 2000. Gli anni '80 hanno visto l'avvio della commercializzazione dei materiali elettronici organici nella elettrofotografia, e si sono chiusi con le osservazioni sulle efficienti proprietà di elettroluminescenza, che hanno dato origine al *diodo organico ad emissione di luce* (OLEDs, Organic Light-Emitting Diode). Lo sviluppo del settore è letteralmente esploso negli anni '90, quando sono state avviate numerose attività di ricerca sugli OLED, sui *transistor organici a film sottile* (OTFTs, Organic Thin-Film Transistors) e sui *materiali fotovoltaici organici* (OPVs, Organic Photovoltaics).

La figura 1.7 presenta il numero di pubblicazioni scientifiche nel settore (si noti l'asse logaritmico), a riprova dell'enorme sviluppo di questo campo. La connessione tra l'elettronica organica e la biologia rappresenta senz'altro un settore emergente.

A causa della loro natura “morbida”, i materiali elettronici organici presentano molti vantaggi che li rendono interessanti: alta compatibilità meccanica con i tessuti, che i tradizionali materiali elettronici non hanno, e una migliore compatibilità con i substrati flessibili. La capacità dei materiali elettronici organici di trasportare ioni, oltre a elettroni e lacune, apre un nuovo canale di comunicazione con la biologia, legato all'importanza dei flussi di ioni nei sistemi biologici. Si tratta quindi di un campo di applicazione in cui le caratteristiche tipiche dei materiali organici presentano notevoli vantaggi sui materiali tradizionali.

Il termine “bioelettronica organica” descrive questo nuovo tema di ricerca, presentato schematicamente in figura 1.8. È un campo che si occupa del collegamento tra strumenti

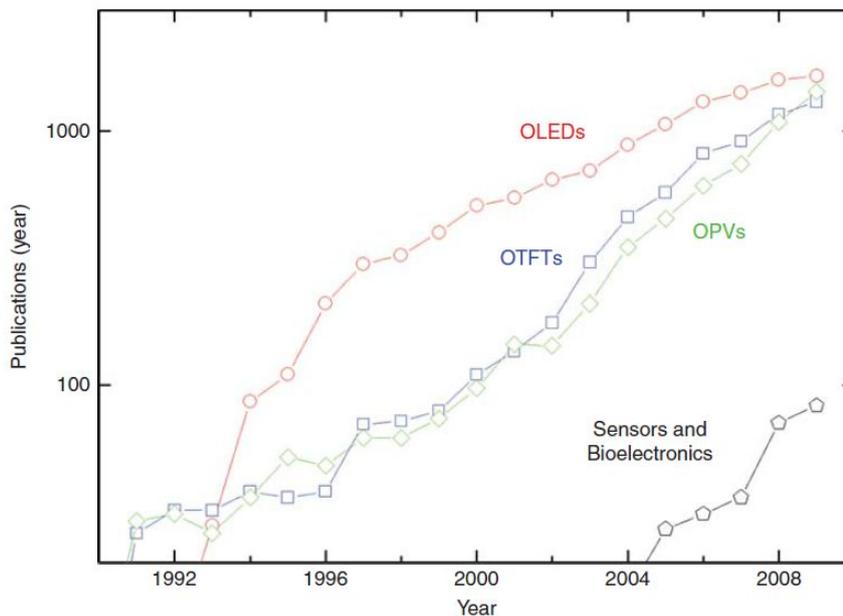


Figura 1.7: Numero di pubblicazioni di elettronica organica; il numero di pubblicazioni su diodi organici a emissione di luce (OLEDs), transistor organici a film sottili (OTFTs) e materiali fotovoltaici organici (OPVs) è considerevolmente aumentato negli ultimi venti anni. Negli ultimi anni è anche molto cresciuto l'utilizzo di questi strumenti nei sensori e in bioelettronica.

elettronici organici e oggetti della sfera biologica. Tale collegamento è bidirezionale: da un lato una reazione o processo biologico invia un segnale a uno strumento elettronico organico (per esempio una reazione enzimatica cambia il flusso che attraversa un transistor polimerico); dall'altro uno strumento elettronico organico innesca una reazione biochimica o un processo biologico (per esempio l'applicazione di una potenziale su un elettrodo polimerico conduttivo stimola la crescita e la mobilità cellulare).

Un esempio di OTFT è il *transistor organico elettrochimico* (OECT, Organic Electrochemical Transistor), che consiste in un film di polimero conduttore (canale del transistor) e un elettrodo di gate entrambi in contatto con un elettrolita. Tramite il gate è possibile controllare il livello di drogaggio del polimero conduttore. A causa della geometria del transistor, una piccola corrente del *gate* controlla una corrente molto maggiore che scorre attraverso il canale polimerico (corrente di *drain*); il vantaggio principale degli OECT è quindi un'amplificazione del segnale. Applicando il principio dell'OECT, è stato svilup-

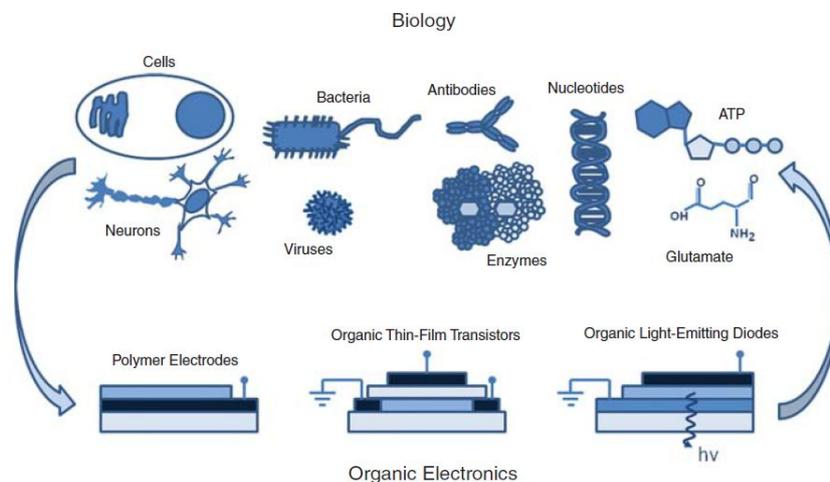


Figura 1.8: Rappresentazione schematica del campo di applicazione della bioelettronica organica: entità biologiche, come cellule, microorganismi, proteine, oligonucleotidi e piccole molecole, possono essere interfacciate con strumenti elettronici organici utilizzabili per ricerche biologiche e in campo medico

pato un sensore di glucosio capace di misurare concentrazioni simili ai livelli presenti nella saliva umana, con un semplice strumento interamente polimerico. Un tipico polimero conduttore utilizzato per gli OECT è proprio il PEDOT:PSS.

Consideriamo in dettaglio il meccanismo di interazione tra conduzione ionica ed elettronica all'interno di un OECT. Sotto l'applicazione di un potenziale positivo all'elettrodo di gate, i cationi presenti nella soluzione elettrolitica entrano nel film polimerico e compensano gli anioni PSS, riducendo la densità delle lacune del PEDOT e quindi riducendone la conducibilità (il meccanismo è simile alla compensazione del drogaggio, dove i donatori sono impiantati in un semiconduttore tipo p per condurlo al suo limite intrinseco). Di conseguenza, applicando una differenza di potenziale ai capi del polimero, questo sarà percorso da una corrente (di elettroni) più o meno elevata a seconda della tensione applicata al gate (che genera invece una corrente di ioni nell'elettrolita). Perciò l'OECT fornisce un modo per convertire le correnti di ioni in correnti di elettroni, creando così un legame diretto tra la biologia e l'elettronica.

L'elettronica può essere utilizzata per controllare gli eventi e i processi biologici, al fine di sviluppare tecnologie biomedicali. Uno degli aspetti di controllo si riferisce all'ingegneria

dei tessuti e riguarda la proliferazione e differenziazione delle cellule nella struttura del polimero conduttore.

Nel 1994 il gruppo di lavoro guidato da Langer ha scoperto che le cellule endoteliali dell'aorta crescono in modo diverso su film di polipirrolo con diverso stato di ossidazione. Si è visto che le cellule aderivano e si distribuivano in modo normale su un film di polipirrolo ossidato, mentre la conversione del polipirrolo al suo stato neutro impediva la distribuzione delle cellule. Ulteriori lavori di Langer hanno mostrato che le cellule nervose cresciute su un film di polipirrolo, se stimolate elettricamente, si estendono il doppio rispetto al caso in assenza di stimolo elettrico. Questo lavoro si è rivelato di enorme importanza, poiché ha permesso di riparare un danno neurale attraverso una crescita guidata, ed inoltre ha aperto la strada all'idea che fosse possibile ricreare lo stesso esperimento con altri tipi di cellule cresciute su polimeri conduttori.

Attualmente sono condotti ingenti sforzi per comprendere i meccanismi attraverso i quali i dispositivi elettronici e i substrati sintetici interagiscono con diversi sistemi biologici, sia *in vitro* che *in vivo*.

I film di PEDOT:TOS (TOS è il p-toluenesulfonato) sono stati di recente utilizzati per dirigere l'aderenza e la proliferazione di cellule verso una ben definita area di una piastra Petri, attraverso un'alterazione dello stato di ossidazione del polimero, in pratica creando così una piastra Petri "intelligente". Il PEDOT:TOS è stato immerso in un terreno per la crescita cellulare, a cui è stato applicato un potenziale, creando così un gradiente di ossido-riduzione lineare sul film di PEDOT.

L'effetto del gradiente è stato quello di differenziare la densità delle cellule per le diverse aree della piastra Petri, da regioni a bassa densità cellulare, dove le singole cellule erano ben divise le une dalle altre, a regioni dove le cellule stavano iniziando a confluire in un tessuto. Come strumento per guidare la crescita cellulare, i dispositivi elettronici organici offrono i vantaggi della reversibilità e della semplicità del controllo elettrico.

Complessivamente, la ricerca dimostra che l'adesione e la proliferazione cellulare possono essere controllate dalla modulazione elettrochimica dei parametri della superficie [4].

1.6.2 PEDOT:PSS come substrato per colture cellulari

Come già detto precedentemente i polimeri conduttori sono noti per essere “materiali intelligenti”, per la possibilità di cambiare le loro proprietà tramite ossidazione e riduzione. Oltre ad avere proprietà variabili, i film di polimeri conduttori sono trasparenti, citocompatibili, possono essere utilizzati su vaste aree e vengono prodotti a basso costo, rendendo semplice la loro integrazione con le colture cellulari [5].

La natura “morbida” della materia organica permette di ottenere una maggiore compatibilità meccanica con i tessuti (dovuta alla maggiore flessibilità), rispetto ai tradizionali materiali usati in elettronica, e la loro capacità di trasportare sia cariche di ioni che di elettroni apre un collegamento diretto con la biologia [6]. Gran parte del fascino suscitato dai polimeri conduttori nelle applicazioni biomedicali risiede nella loro biocompatibilità e facilità di funzionamento insieme con le biomolecole. Grande interesse ha anche ricevuto la biodegradabilità delle strutture di polimeri conduttori.

Sebbene il polipirrolo e la polianilina drogati siano stati i primi polimeri conduttori usati per l'ingegneria dei tessuti, il PEDOT drogato ha recentemente assunto un ruolo primario grazie alla sua elevata stabilità ossidativa e maggiore conduttività. Ha inoltre dimostrato di essere poco o assolutamente non tossico per una vasta tipologia di cellule, quali le cellule endoteliali, le cellule epiteliali, i fibroblasti, i linfociti T e le cellule neuronali [4].

Riassumendo, il PEDOT è un ottimo substrato per la crescita cellulare poichè presenta le seguenti caratteristiche:

- ha proprietà elettroniche che possono essere alterate in risposta a stimoli elettrici
- ha capacità di conduzione sia ionica che elettronica, proprietà che rappresenta il collegamento col mondo della biologia
- è flessibile e quindi ha una maggiore compatibilità meccanica con i tessuti
- è biocompatibile e citocompatibile (non è tossico per numerosi tipi di cellule)
- è biodegradabile
- è trasparente
- ha un basso costo di produzione

Capitolo 2

Apparato sperimentale

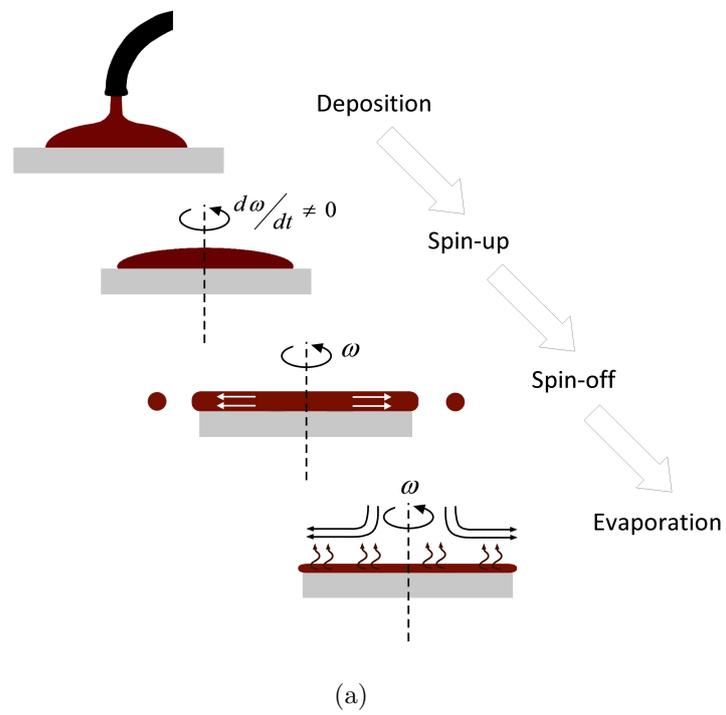
2.1 Strumenti

2.1.1 Spin-coater

Lo *spin-coating* è uno dei processi più usati per la creazione di film sottili; esso consiste nel depositare una grande quantità di soluzione su un supporto, che viene poi posto in veloce rotazione. In questo modo la soluzione tende a ricoprire uniformemente la superficie, mentre il liquido in eccesso viene spinto all'esterno, a causa della forza centrifuga dovuta alla rotazione del supporto. Lo spessore finale e le altre proprietà dipendono dalla natura della soluzione (viscosità, velocità di evaporazione, tensione superficiale, ecc) e dai parametri scelti per il processo di *spin-coating*. Leggere modifiche di tali parametri possono provocare variazioni drastiche del film sottile ottenuto.

La procedura di *spin-coating* [7] si può suddividere nelle seguenti fasi (figura 2.1 a):

1. deposizione della soluzione sul supporto, per esempio con una pipetta;
2. aumento della velocità di rotazione del supporto con conseguente distribuzione della soluzione e fuoriuscita della soluzione in eccesso;
3. rotazione del supporto a velocità costante; lo spessore del film è determinato dalla viscosità del fluido;
4. evaporazione del solvente; la rotazione del supporto è ancora a velocità costante e lo spessore del film si assottiglia ulteriormente.



(b)

Figura 2.1: Procedura di *spin-coating* e spin-coater

Lo strumento utilizzato era stato precedentemente tarato dividendo l'intervallo di velocità in quattro tacche equidistanti (da 0 a 3), suddivise a loro volta da tacche intermedie.

2.1.2 Sourcemeter Keithley 2400

Il SourceMeter Keithley 2400, progettato specificatamente per applicazioni che richiedono sia la generazione che la misura di corrente, è stato utilizzato per ossidare e ridurre i film sottili di PEDOT:PSS da utilizzare poi come substrati per colture cellulari.

È uno strumento che ne ha cinque integrati in esso: può essere usato come sorgente di tensione o corrente in continua (DC), o semplicemente lavorare come multimetro, misurando tensioni, correnti e resistenze. In tutte le applicazioni è molto stabile, a basso rumore, ed il multimetro ha inoltre un elevato livello di ripetibilità [8]. Ha un'accuratezza dello 0.015% per le tensioni, dello 0.035% per le correnti, e dello 0.04% per le resistenze; e una risoluzione per il multimetro di $5\frac{1}{2}$ digit. (???)

I range di misure entro i quali lo strumento lavora sono:

come generatore:

- di tensione, genera un voltaggio da 5 μ V a 210 V;
- di corrente, da 50 pA a 1,05 A.

come multimetro:

- misura di voltaggio da 1 μ V fino a 211 V;
- misura di corrente da 10 pA a 1,055 A;
- misura di resistenza da 100 $\mu\Omega$ a 211 Ω .



Figura 2.2: SourceMeter Keithley 2400

2.1.3 AFM (Atomic Force Microscope)

La deposizione del PEDOT:PSS ha bisogno di una superficie piatta, e il comportamento delle cellule è molto influenzato dalle caratteristiche della superficie stessa. Per questo motivo, per la caratterizzazione morfologica delle superfici e per ottenerne una mappatura tridimensionale, viene utilizzato il microscopio a forza atomica (AFM), che ben si presta alle misurazioni di superficie dell'ordine delle micro o delle nano dimensioni (il potere risolutivo dello strumento è infatti dell'ordine del nanometro).

Il suo funzionamento (rappresentato schematicamente in figura 2.3) si basa su una microleva (*cantilever*) alla cui estremità è montata una punta acuminata (*tip*), tipicamente composta da silicio o nitruro di silicio, con un raggio di curvatura di qualche nanometro. La punta viene posizionata nelle vicinanze del campione da analizzare, a una distanza variabile a seconda della modalità di utilizzo. Quando la punta è abbastanza vicina al campione, le forze che intercorrono tra loro generano una deflessione della microleva, in accordo con la legge di Hooke.

La deflessione è misurata grazie a questo meccanismo: un raggio laser focalizzato sulla microleva, che è ricoperta da un sottile strato metallico, viene riflesso su un fotodiodo suddiviso in quattro settori; dalla misura della variazione delle intensità relative alle diverse sezioni del fotodiodo è possibile conoscere precisamente la deflessione verticale e laterale della microleva.

Il principio di funzionamento dell'AFM consiste nella misura della forza di interazione tra la punta e il campione, tramite la misura della deflessione della microleva. Il funzionamento dell'AFM può essere esemplificato considerando le forze di Van der Waals. L'energia potenziale di Van der Waals due atomi, posti ad una distanza r l'uno dall'altro, è descritta dal potenziale di Lennard-Jones:

$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.1)$$

dove ε è la profondità della buca di potenziale e σ è il diametro della sfera che approssima l'atomo in un modello a sfera rigida.

Questo potenziale consente di stimare la forza di interazione punta-campione, sommando i contributi di tutti gli atomi della punta e del campione.

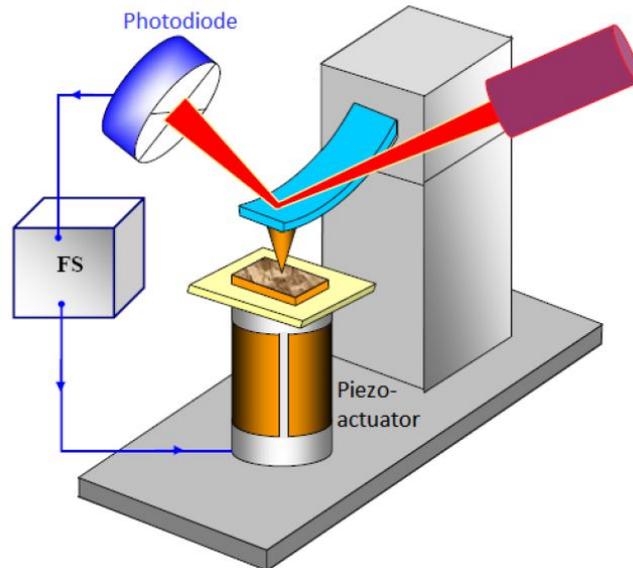


Figura 2.3: Rappresentazione schematica di un microscopio a forza atomica; il sistema di feedback (FS) controlla i parametri impiegati per effettuare le misurazioni.

Il movimento della punta è controllato da un attuttore piezoelettrico, il che significa che il materiale genera una tensione quando è soggetto ad una deformazione meccanica; viceversa si espande o si contrae quando gli viene applicata una differenza di potenziale [10]. I segnali elettrici di un sistema di feedback controllano l'attuttore piezoelettrico, e ciò permette quindi, per esempio, di mantenere una distanza costante tra punta e superficie, per evitare che la punta possa collidere con la superficie del campione, provocando un danneggiamento sia del campione in esame che della punta stessa.

Il sistema di feedback può quindi mantenere costanti i parametri del meccanismo grazie al quale sono ottenute le misurazioni superficiali. Tali parametri variano in base a quale modo di funzionamento dell'AFM si sta utilizzando.

I modi di funzionamento dell'AFM [9] sono:

- *contact mode* (a contatto statico): la forza che si instaura tra la punta e la superficie del campione viene mantenuta costante durante la scansione, grazie al sistema di feedback, mantenendo di conseguenza anche la deflessione della micro-leva a un valore costante.

- *non-contact mode* (ad assenza di contatto dinamico): la micro-leva viene fatta oscillare a una frequenza prossima o uguale a quella di risonanza. Le forze presenti tra la punta e la superficie modificano tale oscillazione, permettendo allo strumento di ottenere informazioni sulla morfologia superficiale dalla differenza tra l'oscillazione di riferimento e quella modificata;
- *semicontact mode* (o *tapping mode*; a contatto dinamico): la micro-leva viene fatta oscillare in modo tale che venga a contatto col campione a ogni periodo, poi viene applicata la forza necessaria per staccare la punta dal campione. Tale metodo nasce dall'esigenza di analizzare quei campioni che all'aria sviluppano uno strato di menisco liquido; diventa necessario infatti mantenere la punta della sonda abbastanza vicina al campione, così da poter rilevare le forze interatomiche a breve raggio, ed evitare allo stesso tempo che la punta resti bloccata sulla superficie. La micro-leva è fatta oscillare a una frequenza vicina a quella di risonanza, similmente a quanto avviene per il *contact mode*; ma quando la punta si avvicina alla superficie del campione, l'interazione delle forze che agiscono sulla micro leva (forze di Van der Waals, interazioni dipolo-dipolo, forze elettrostatiche, ecc.) causa una diminuzione dell'ampiezza dell'oscillazione. Questo sistema fa sì che la superficie del campione e la punta siano molto meno danneggiati che in *contact mode*.

L'AFM può lavorare su praticamente qualsiasi tipo di campione, ed ha ovviamente il vantaggio, rispetto a un microscopio elettronico, di ottenere una mappatura tridimensionale della superficie, e che i campioni da analizzare non necessitano di alcun trattamento che potrebbe rovinarli. D'altra parte sono però inferiori sia la superficie che la profondità massime scansionabili.

L'AFM utilizzato per questo lavoro è un SolverP47H-Pro della ditta NT-MDT; questo microscopio permette scansioni fino a $60 \times 60 \mu\text{m}^2$ su campioni di dimensioni fino a $100 \times 100 \times 20 \text{ mm}^3$ (la massima altezza misurabile è di circa $3 \mu\text{m}$). L'AFM è sospeso su corde elastiche e collocato su un tavolo anti-vibrazioni, in modo da minimizzare il rumore esterno.

L'AFM è fornito dalla ditta con un software per l'acquisizione e l'analisi delle immagini, chiamato Nova, ma le immagini ottenute possono essere analizzate anche utilizzando un software open-source, Gwyddion.

2.2 Materiali

2.2.1 PEDOT:PSS

Come ampiamente illustrato nel precedente capitolo, le applicazioni del PEDOT drogato con polistirene sulfonato (PSS) abbracciano diversi campi grazie all'alta conduttività del materiale, alla sua stabilità termica e meccanica e alla facilità di deposizione sotto forma di film sottili e biocompatibili.

Il PEDOT:PSS è fornito dalla ditta Heraeus in differenti formulazioni; quella utilizzata per questo lavoro è la Clevios P CPP105D, ottimizzata per avere un'alta conduttività e buone proprietà adesive sulle superfici di plastica e di vetro. Di seguito è riportata la tabella delle caratteristiche fornita dal produttore.

Clevios™ Coating Guide Formulation CPP 105D

For antistatic coatings with higher conductivity. Good adhesion properties on plastic and glass surfaces, and resistance to both aliphatic and aromatic hydrocarbon solvents.

	On plastic	On glass
Wet film thickness	6 μm	12 μm
Surface resistivity	$< 10^4$ Ohm/sq	$< 10^3$ Ohm/sq
Quantity of Clevios™ P used per m^2	2.6 g	5.2 g

Properties of the dispersion (approximate values)

- Solid content: 1.2 %
- Viscosity: 30 mPa.s
- pH value: 2.8
- Density: 0.900 g/cm^3

2.2.2 ITO (Indium Tin Oxide)

L'ossido di indio-stagno è una soluzione solida, tipicamente in percentuale in peso intorno al 90% In_2O_3 e 10% SnO_2 . L'ITO è un materiale semiconduttore di tipo n drogato fortemente, con ampiezza del gap pari a 4 eV; è trasparente alla luce e incolore in forma di film sottile, mentre in grandi quantità presenta un colore dal giallo pallido al verde

COMPONENT	% BY WEIGHT
Clevios™ P	42.92
N-Methyl-2-pyrrolidone	2.58
Silquest® A 187™	0.86
Isopropanol	53.34
Dynol™ 604	0.30

Figura 2.4: specifiche del Clevios P CPP105D [11]

dipendente dalla concentrazione di drogante. Ha proprietà di riflettere radiazioni nella regione dell'infrarosso (come i comuni metalli).

L'ITO è il più impiegato ossido trasparente conduttivo per la fabbricazione di pellicole conduttive trasparenti (PCT), grazie alle sue proprietà di conduttività elettrica e trasparenza ottica, oltre al fatto che può essere depositato sotto forma di film sottile. Nella realizzazione del materiale è necessario trovare un compromesso tra le due proprietà, poiché ad esempio un aumento della densità di portatori di carica migliora la conduttività, ma a discapito della trasparenza.

L'ITO viene principalmente utilizzato per schermi a cristalli liquidi (LCD), schermi al plasma, schermi tattili, diodi organici ad emissione di luce (OLED), cellule fotovoltaiche e per rivestimenti ottici di vario tipo.

Nonostante le eccellenti proprietà, a causa del costo elevato, della fragilità e della mancanza di flessibilità, si stanno cercando materiali alternativi all'ITO (un potenziale sostituto è rappresentato dai rivestimenti conduttivi di nanotubi di carbonio) [12].

Nel nostro caso, la scelta dell'ITO come substrato per la deposizione di PEDOT:PSS nasce da tre principali considerazioni:

- superficie piatta: la deposizione del PEDOT:PSS richiede una superficie piatta e il movimento delle cellule non deve essere influenzato dalla rugosità del materiale;
- trasparenza: per osservare la crescita delle cellule, usiamo un microscopio inverso, in cui la luce è trasmessa attraverso il campione. Il materiale deve quindi essere trasparente alle frequenze ottiche;
- conduttività: per ossidare il PEDOT:PSS, la sua superficie deve essere esposta a una soluzione elettrolitica.

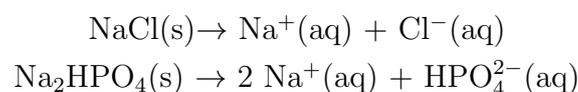
Usando un substrato conduttivo è quindi possibile applicare una differenza di potenziale costante sull'intera area interessata.

2.2.3 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Per ottenere l'ossidazione e la riduzione del film sottile di PEDOT:PSS è necessaria una soluzione elettrolitica, ovvero una soluzione in grado di condurre corrente elettrica grazie alla presenza di ioni positivi e negativi (derivati appunto dalla dissociazione e ionizzazione dell'elettrolita in soluzione) [13].

In questo lavoro abbiamo utilizzato il PBS, una soluzione tampone (cioè una soluzione che mantiene il pH a un valore pressoché fisso) acquosa, con una concentrazione di pH e ioni analoga a quella del corpo umano. Il PBS utilizzato è composto da cloruro di sodio (NaCl) e fosfato di sodio (Na_2HPO_4) disciolti in acqua con concentrazione, rispettivamente, di 8.01 g/L e 1.78 g/L; il pH della soluzione è pari a 7.4.

Questi sali dissociano in acqua secondo la reazione:



Il PBS viene normalmente utilizzato anche per diluire altre sostanze e risciacquare contenitori di cellule.

2.2.4 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Il DMEM, uno dei più comuni mezzi per la coltura cellulare, è una variazione dell'EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium). Entrambi sono soluzioni acquose contenenti sali, aminoacidi, glucosio e vitamine, e l'indicatore di pH rosso fenolo; il DMEM però contiene circa quattro volte più vitamine e aminoacidi, e da due a quattro volte più glucosio. La composizione specifica può poi differire tra un preparato e l'altro. Il DMEM venne usato per la prima volta nella coltura di cellule embrionali di topi ed è adatto per moltissimi tipi di cellule, tra cui quelle di esseri umani, scimmie, topi, polli e pesci.



Figura 2.5: DMEM in una bottiglietta

2.2.5 Coltura e osservazione cellulare

In questo lavoro i substrati per la coltura cellulare sono state testati utilizzando fibroblasti dermici umani (hDF, human Dermal Fibroblasts).

Queste cellule sono state conservate in DMEM, a cui era stato aggiunto un 10% di siero fetale di vitello, penicillina (100 unità/ml), streptomicina (100 g/mL), 2 mM L-glutammina (il tutto fornito dalla Sigma-Aldrich di Milano), e tenute in incubatore al 5% di CO₂, in ambiente umidificato, a 37 °C.

Le colture cellulari sono state periodicamente controllate per verificare che non fossero affette da infezione da micoplasma.

Il vetrino ricoperto con PEDOT:PSS è stato alloggiato in una piastra Petri da 35 mm e sterilizzato sotto raggi UV.

I fibroblasti sono stati distaccati dalla fiasca utilizzando tripsina-EDTA (0.02%), e piastrati in terreno di coltura a temperatura ambiente, con concentrazione di 10 000 cellule per piastra, al di sopra del substrato di PEDOT:PSS.

Poi le piastre Petri sono state tenute in incubatore a 37 °C per 4 ore, per permettere l'adesione cellulare, e l'osservazione è stata effettuata utilizzando un microscopio ottico Nikon Eclipse-Ti.



Figura 2.6: Fibroblasti in coltura cellulare

Capitolo 3

Analisi dati

3.1 Preparazione dei campioni

Per preparare i campioni, è necessario innanzitutto pulire i vetrini, prima di stendervi sopra il PEDOT:PSS. Per fare ciò sono necessari sia un solvente polare che un solvente apolare, nel nostro caso rispettivamente acqua deionizzata e isopropanolo. I vetrini sono immersi in un contenitore con l'isopropanolo, e lasciati nel bagno a ultrasuoni per 5 minuti, dopodiché sono trasferiti in un contenitore con acqua distillata e rimessi nel bagno a ultrasuoni per altrettanto tempo. Dopo questa operazione i vetrini sono lasciati asciugare all'aria.

A questo punto i vetrini sono stati lasciati per 15 minuti sotto una lampada a raggi UV, che hanno la proprietà di aumentare l'adesività di una superficie poiché, a contatto con l'ossigeno dell'aria generano ozono, estremamente reattivo. Tuttavia, essendo stati riscontrati risultati pressoché identici per vetrini trattati o non trattati con raggi UV, dopo averlo testato una volta, non è stato più incluso questo passaggio nella procedura di preparazione dei campioni.

Il procedimento descritto è stato impiegato sia per i vetrini semplici che per quelli con un lato ricoperto da un sottilissimo strato di ITO, con l'accorgimento per questi ultimi di controllare che la faccia su cui si deposita il pedot sia effettivamente quella che conduce, misurandone la resistenza con un multimetro, che sul lato senza ITO risulta invece pari a 0.

Il vetrino viene quindi collocato nell'alloggiamento dello spin-coater e viene cosperso di PEDOT:PSS, distribuendolo con una pipetta, come mostrato in figura 3.1 (il PEDOT:PSS era stato precedentemente immerso nel bagno a ultrasuoni per 10 minuti per rendere omogenea la distribuzione del polimero nella soluzione). Lo spin-coater viene azionato a velocità 2.2 (che corrisponde a circa 1000 giri al minuto) per circa 10 secondi, lasciando sulla superficie del vetrino un film sottile di PEDOT:PSS di circa 300 nm. Il vetrino così ricoperto, dopo essere stato rimosso dallo spin-coater, è collocato su un hot plate a circa 140 °C per 5 minuti, per permettere al solvente di evaporare.



Figura 3.1: Deposizione del PEDOT:PSS sul vetrino nell'alloggiamento dello spin-coater, con una pipetta Pasteur

3.1.1 Procedimento di ossido-riduzione

Per la procedura di ossido-riduzione è stato utilizzato il Sourcemeter Keithley 2400 come generatore di tensione. Ogni vetrino è immerso in un contenitore con PBS; nel caso del PEDOT:PSS su vetro è stato necessario interporre del nastro adesivo conduttivo tra il vetro e i morsetti a coccodrillo, mentre nel caso del PEDOT:PSS su ITO i morsetti si applicano direttamente, perché l'ITO conduce; nel contenitore è stato inserito anche un filo di rame in modo da applicare una differenza di potenziale tra filo e PEDOT:PSS (vedi figura 3.2). La tensione è regolata a 3 V nel caso del vetro e a 0.7 V nel caso dell'ITO (il valore è più basso perché l'ITO con tensioni superiori tende a rovinarsi).

Per il vetrino collegato a tensione negativa, ioni positivi dalla soluzione elettrolitica entrano nel film di PEDOT: PSS e di conseguenza, al fine di mantenere l'equilibrio di carica, la densità di lacune nel materiale diminuisce nel materiale: il PEDOT: PSS è ridotto. Questa reazione è stata accompagnata dal cambiamento di colore del PEDOT PSS da blu scuro a un blu più chiaro e intenso. Analogamente, per il vetrino collegato a tensione positiva, la densità di lacune aumenta e il film è ossidato. Poiché queste reazioni sono reversibili, la tensione applicata è stata mantenuta per circa 1 ora per indurre un'ossidazione (o riduzione) stabile del film polimerico.

I vetrini così preparati sono stati tagliati con una punta diamantata e poi risciacquati con acqua distillata per ricavarne parti di dimensioni opportune per collocarle nelle piastre Petri; a questo punto i substrati sono pronti per la semina cellulare.

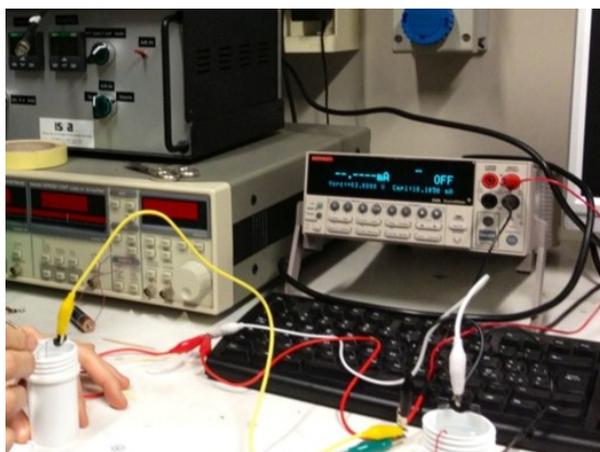


Figura 3.2: Apparato per l'ossidazione e la riduzione del PEDOT:PSS

3.2 Misure di morfologia superficiale

3.2.1 Procedimento di acquisizione immagini

In primo luogo bisogna predisporre l'AFM in modo opportuno per le misure da effettuare: il metodo di utilizzo migliore per questo lavoro è il *semicontact mode*, poichè la superficie dei campioni analizzati risulta piuttosto "morbida", pertanto con il *contact mode* l'interazione tra punta e substrato risulterebbe troppo intensa, con il rischio di danneggiare sia i campioni che la punta. È quindi necessario innanzitutto montare una

punta adatta per il *semicontact mode*. Dopodiché, tramite il software dello strumento, è possibile effettuare la preparazione dell'AFM.

Si comincia dall'*aiming*, ovvero il “prendere la mira”: muovendo le viti che controllano la direzione del laser presenti sul microscopio si deve fare in modo che il raggio sia posizionato esattamente sulla punta e che l'intensità misurata dal fotodiodo sia adeguata. Bisogna inoltre centrare il punto di riflessione del laser rispetto al fotodiodo, e per questa operazione è sufficiente girare le viti che controllano l'orientazione del fotodiodo presenti sul microscopio, cercando di portare il più possibile vicino a zero i valori di deflessione laterale e verticale.

Completato l'*aiming*, la fase successiva è quella di *resonance*, che consiste nel misurare la frequenza di oscillazione propria della punta, per farla oscillare proprio con quella frequenza durante la scansione. Si ottiene così una curva simile a quella in figura 3.3 , dove il picco corrisponde alla frequenza con massima ampiezza di oscillazione (e conseguente deflessione del raggio laser).

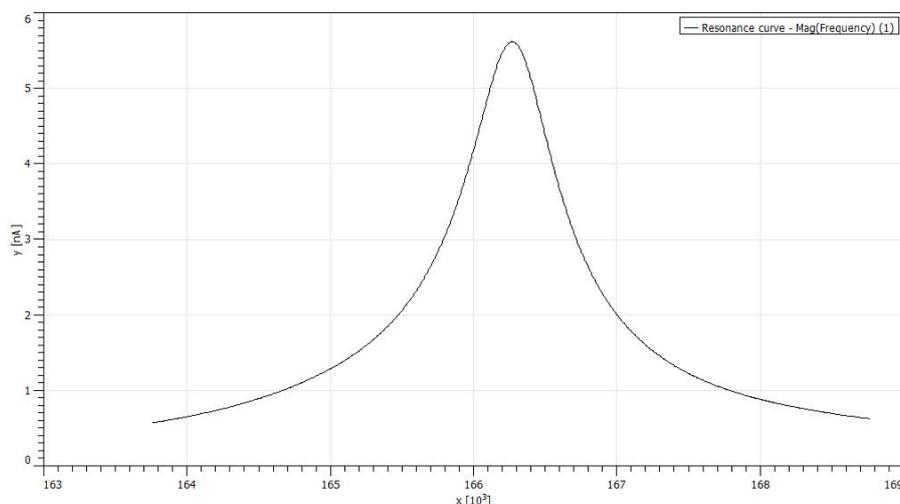


Figura 3.3: Curva di risonanza, con frequenza in ascissa e deflessione del raggio in ordinata

L'AFM è stato calibrato con le griglie di altezze certificate (fornite sempre dalla ditta NT-MDT), perciò prima di iniziare a prendere misure si carica il file di set adeguato alla rugosità che ci aspettiamo (tgz1: tra 0 e 50 nm, tgz2: tra 50 e 300 nm, tgz3: oltre 300 nm); nel nostro caso è stato caricato il file tgz2.

A questo punto si può far avvicinare il campione alla punta del microscopio (*approach*), ponendolo ad un'altezza tale che l'oscillazione sia smorzata (ovvero non troppo lontano dal campione, situazione in cui l'oscillazione è libera e molto ampia); una volta che la punta è "atterrata" sulla superficie (*landing*), è tutto pronto per partire con la scansione (*scan*). Dopo aver definito la frequenza di scansione e la dimensione dell'area da analizzare, viene acquisita l'immagine della morfologia superficiale.

3.2.2 Analisi delle immagini acquisite

Per ogni campione sono state scansionate numerose aree diverse e di misure differenti ($60 \times 60 \mu\text{m}^2$, $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ e $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) e per ognuna di esse si è estrapolato il valore di rugosità (RMS), fornito direttamente dal software, e l'errore ad esso associato, che è stato calcolato statisticamente con la formula della deviazione standard:

$$\sigma = \sqrt{\sum_{n=1}^N \frac{(x_n - \bar{x})^2}{N}}$$

Poi, facendo una media tra le varie rugosità relative alle diverse aree, si è ottenuta la rugosità complessiva per ogni campione.

Da una prima serie di misure, si sono ottenuti i seguenti valori di RMS *roughness*:

	1 strato	2 strati
neutro	$(10 \pm 4) \text{ nm}$	$(23 \pm 10) \text{ nm}$
ossidato	$(7 \pm 4) \text{ nm}$	$(19 \pm 10) \text{ nm}$
ridotto	$(7 \pm 4) \text{ nm}$	$(19 \pm 9) \text{ nm}$

In generale, il PEDOT CPP105D presenta molte "buche", alcune più grandi, di circa $1 \mu\text{m}$ di diametro e profonde 50 nm , e numerose più piccole, di diametro di circa 100 nm e profonde 20 nm , sparse casualmente su tutta la superficie. Dall'aspetto sembrano bolle che dopo essere scoppiate hanno lasciato il solco nella posizione in cui si trovavano sulla superficie. L'ossidazione e la riduzione non alterano questa morfologia "macroscopica", e, sovrapponendo più strati, si ha poi una sovrapposizione tra le buche dei diversi strati, con un conseguente aumento della rugosità (circa di un fattore due passando da uno a due strati, come riportato nella tabella).

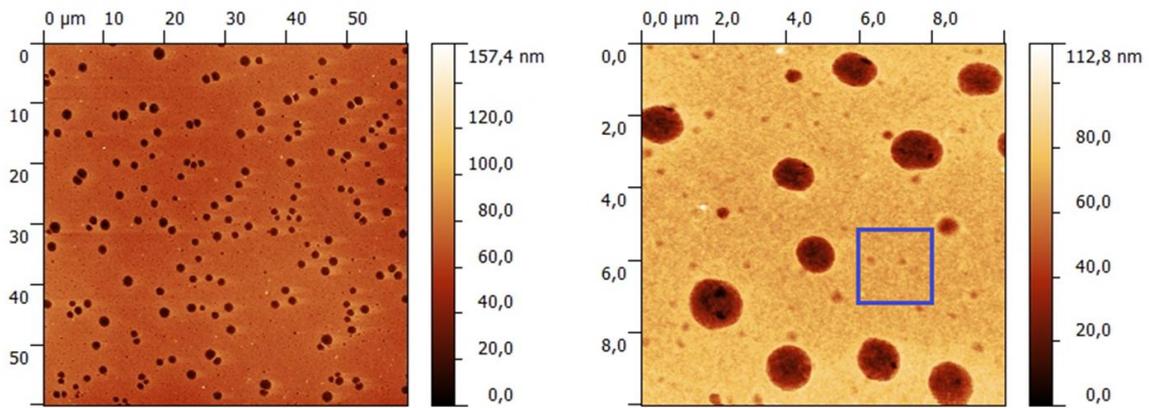


Figura 3.4: Immagini da AFM di superfici di aree diverse

Il problema principale è che in questo caso si ha una rugosità “macroscopica” su mappe di lato superiore ai 2 μm (come quelle riportate), dovuta alle buche, e una rugosità “microscopica” su mappe piccole, che riescono a prendere aree di campione senza queste buche (come l’area entro il quadrato blu in figura 3.4), dovuta all’effettiva morfologia del PEDOT. Questo effetto porta all’elevata deviazione standard riportata in tabella, soprattutto per i campioni composti da due strati, in quanto variando l’estensione dell’area esaminata, o anche solo spostandosi in zone con diversa densità di queste buche, si registrano valori di rugosità piuttosto diversi.

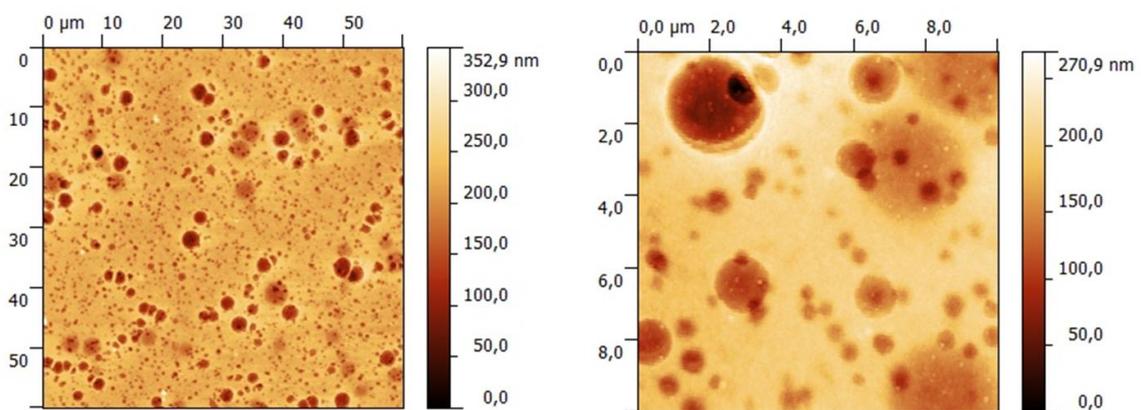


Figura 3.5: Immagini da AFM di campioni con due strati di PEDOT:PSS

Con due strati di PEDOT è possibile distinguere abbastanza chiaramente le buche presenti in superficie (strato superficiale), più nette, e quelle presenti nello strato sottostante, che appaiono più smussate. Questo effetto consente, in teoria, di poter variare la roughness in base al numero di strati che compongono il campione, anche se non c'è nessun controllo sulla distribuzione di queste irregolarità. Come visibile in tabella, le morfologie sono molto simili tra campioni neutri, ossidati e ridotti, perciò sono stati riportati nelle figure solo i campioni neutri.

È riportata di seguito un'altra serie di misurazioni:

campione	prima	dopo
1	(6 ± 3) nm	(4 ± 2) nm
2+	(6 ± 3) nm	(6 ± 3) nm
3+	(6 ± 4) nm	(4 ± 3) nm
4-	(3 ± 1) nm	(5 ± 3) nm
5+	(8 ± 6) nm	(7 ± 5) nm
6-	(10 ± 5) nm	(9 ± 5) nm

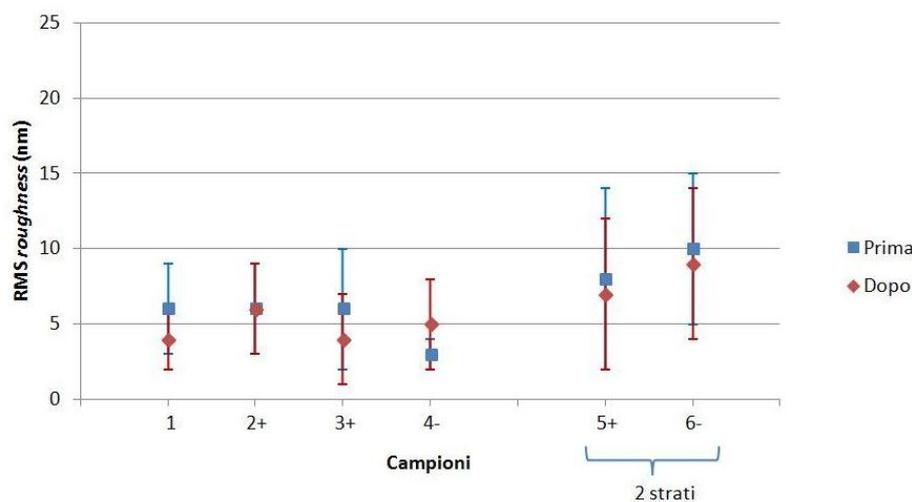


Figura 3.6: Roughness complessiva di diversi campioni di PEDOT CCP105D su ITO prima e dopo il processo di ossidazione o riduzione; il campione 1 è neutro, i campioni ossidati sono indicati con un più (2+, 3+, 5+) e quelli ridotti con un meno (4-, 6-)

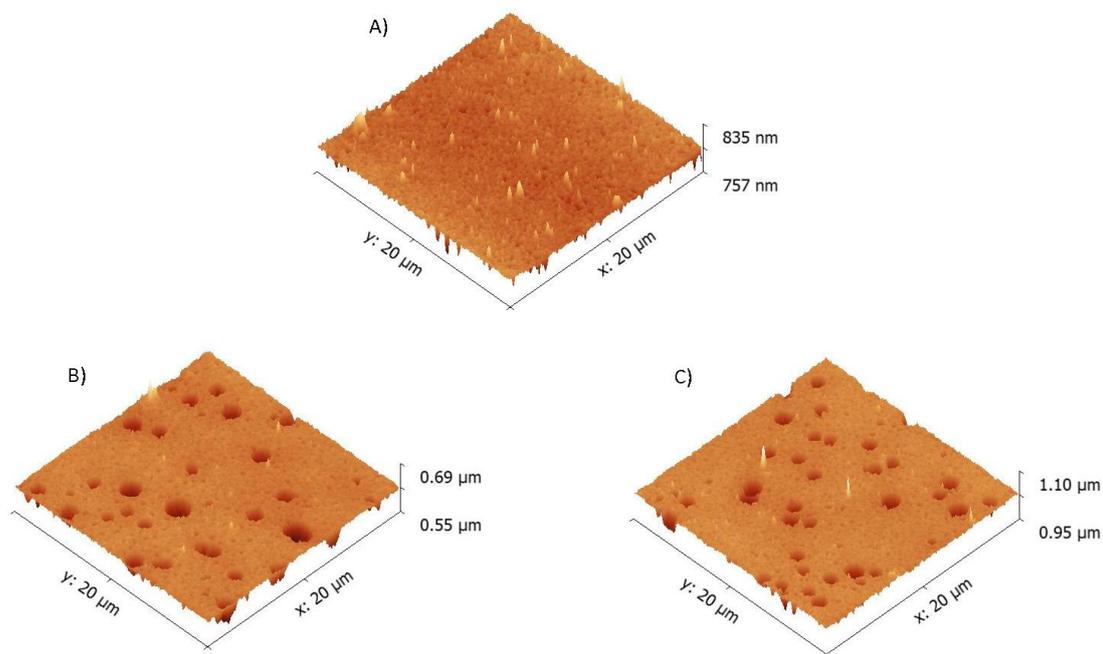


Figura 3.7: Immagini 3D da AFM di superfici ampie $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. A) Morfologia di un campione neutro (1). B) Morfologia di un campione ossidato (2+). C) Morfologia di un campione ridotto (3-).

In figura 3.7 è possibile visualizzare direttamente la morfologia tipica di campioni neutri, ossidati e ridotti.

Sono stati analizzati numerosi altri campioni, e, come già evidenziato, si è riscontrato che la morfologia dei campioni varia in modo davvero lieve tra campioni neutri, ossidati e ridotti, e anche in caso di substrati di vetro o di ITO. Quest'ultimo risultato è estremamente importante per la ricerca, poiché significa che è possibile utilizzare il substrato più semplice da trattare o più adeguato per una certa procedura, senza che la morfologia superficiale del PEDOT:PSS subisca variazioni.

3.3 Crescite cellulari

Utilizzando i campioni di PEDOT:PSS CPP105D preparati, sono state realizzate colture di cellule hDF (fibroblasti dermici umani), che hanno un tempo di raddoppiamento pari a 60 ore.

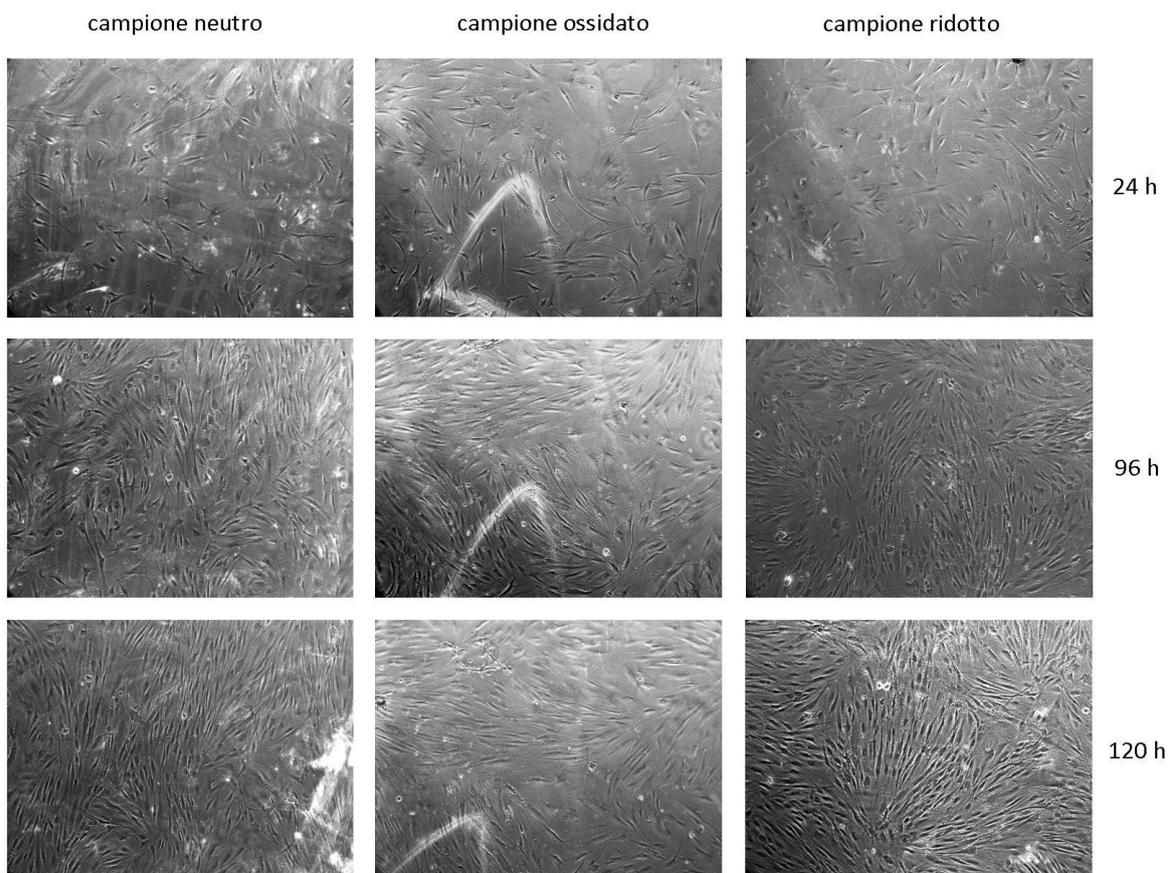


Figura 3.8: Adesione e crescita di cellule hDF su PEDOT:PSS CPP105D

Osservando le immagini presentate in figura 3.8, si nota che a 24 ore dalla semina, tutti i campioni mostrano all'incirca la stessa densità di cellule, ma lasciando trascorrere un tempo più lungo il comportamento cellulare si differenzia a seconda del substrato: sui campioni neutri e ossidati le cellule sono aderite, ma non riescono a crescere e a moltiplicarsi adeguatamente (anche se sul campione ossidato la proliferazione risulta alquanto migliore di quella sul campione neutro); mentre invece sui campioni ridotti le cellule aderiscono, crescono e si replicano maggiormente, fino confluire in un tessuto.

Le cellule hDF quindi crescono e proliferano in misura molto maggiore sul substrato di PEDOT:PSS ridotto. Dalle analisi morfologiche dei campioni, è chiaro quindi che l'adesione e la moltiplicazione cellulari non dipendono dalla rugosità del campione (che era infatti circa la stessa anche per quelli ossidati e neutri), ma da qualche altro parametro ancora ignorato alla situazione attuale della ricerca.

Conclusioni

Grazie alla sua eccellente biocompatibilità, il polimero PEDOT:PSS è stato utilizzato come interfaccia tra le cellule e dispositivi elettrici. Il presente lavoro è stato volto a sviluppare un substrato per la coltura cellulare a partire dal PEDOT:PSS, analizzando in seguito il ruolo inibitore o catalizzatore dei diversi substrati considerati.

Nello stato ridotto, il PEDOT:PSS ha dimostrato di avere eccellenti proprietà per la replicazione cellulare, fino alla confluenza in un tessuto; mentre per lo stato ossidato e per quello neutro, i campioni risultano idonei all'adesione di queste cellule, ma limitano la loro proliferazione. Grande rilievo assumono soprattutto i risultati ottenuti con la crescita delle cellule hDF, in quanto si tratta della prima dimostrazione delle proprietà di adesione e proliferazione svolta utilizzando cellule umane, ponendo così la presente ricerca all'avanguardia nel settore. In particolare è stato dimostrato come i processi di ossido-riduzione influenzino macroscopicamente la replicazione cellulare, anche se i processi necessitano di un'ulteriore ottimizzazione, per poter ottenere risultati completamente riproducibili.

Si è dimostrato inoltre che l'adesione e la moltiplicazione delle cellule non dipendono dalla rugosità del campione: tutti i campioni presentano infatti all'incirca la medesima rugosità, ma le cellule mostrano comportamenti differenti per i diversi substrati. Tra i quesiti aperti ancora da risolvere va quindi menzionata la necessità di comprendere quali siano quindi i parametri che condizionano la proliferazione cellulare.

Bibliografia

- [1] A. Elschner, S. Kirchmeyer, W. Lövenich, U. Merker, and K. Reuter, *PEDOT - Principles and Applications of an Intrinsically Conductive Polymer*, CRC Press, 2011.
- [2] http://www.eziomartuscelli.net/files/parte_c.pdf
- [3] N. F. Mott, *Philosophical Magazine* volume 19, 1969.
- [4] Róisín M. Owens and George G. Malliaras, *Organic electronics at the interface with biology*, MRS bulletin, volume 35, giugno 2010.
- [5] Alwin M. D. Wan, Rebecca M. Schur, Christopher K. Ober, Claudia Fischbach, Delphine Gourdon, and George G. Malliaras, *Electrical Control of Protein Conformation*, Advanced Materials, 2012.
- [6] A. Gumus, J. P. Califano, A.M.D. Wan, J. Huynh, Cynthia A. Reinhart-King e G.G. Malliaras, *Control of cell migration using a conducting polymer device*, Soft Matter, 2010.
- [7] <http://www.clean.cise.columbia.edu/process/spintheory.pdf>
- [8] http://www.tevetllc.com/documents/pdf/keithley/2400_Series_Broc.pdf
- [9] Giessibl, J. Franz, *Advances in atomic force microscopy*, Reviews of Modern Physics, volume 75, 2003.
- [10] A. Manbachi and R.S.C Cobbold *Development and Application of Piezoelectric Materials for Ultrasound Generation and Detection*, Ultrasound, volume 19, 2011.

- [11] http://clevios.com/media/webmedia_local/media/datenblaetter/Clevios_P_coating_guide_08-03-18jb2.pdf
- [12] E. Fortunato, D. Ginley, H. Hosono and D.C. Paine, *Transparent Conducting Oxides for Photovoltaics*, MRS Bulletin, volume 32, marzo 2007.
- [13] http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer_v._01.pdf