

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Augusto Righi”
Corso di Laurea in Fisica

**Sviluppo di un sistema per la misura del
potenziale elettrico in soluzione in sensori
bioelettronici di impedenza per colture
cellulari 3D**

Relatore:
Prof. Beatrice Fraboni

Presentata da:
Luca Zani

Correlatore:
Dott. Filippo Bonafè

Anno Accademico 2024/2025

*Alla mia famiglia,
che crede in me da sempre*

Abstract

Aggregati cellulari tridimensionali (3D), noti come sferoidi, sono ottimi modelli cellulari in vitro data la loro accuratezza nel simulare le interazioni cellulari in vivo. Potenziali candidati per monitorare la coltura in tempo reale sono i sensori bioelettronici di impedenza essendo non costosi e non invasivi. Utilizzando un array di micro-elettrodi (MEA) basati su film sottili di un polimero conduttivo (PEDOT:PSS) è stato costruito un sensore di impedenza. Sopra questo è stato stampato un set di micro-pozzetti di idrogel di agarosio, utili alla formazione di sferoidi. Grazie alla bassa conduttività dell'idrogel è atteso un aumento di risoluzione del sensore a causa del confinamento delle correnti ioniche generate dal sensore sulla coltura cellulare. L'obiettivo del lavoro è la costruzione di un nuovo set-up sperimentale per verificare l'ipotesi. Tramite un dispositivo composto da sonda e micromanipolatori è stata possibile l'acquisizione di mappe di potenziale elettrico alternato (AC). Queste sono state acquisite in presenza/assenza di micro-pozzetti di idrogel ed il confronto ha confermato qualitativamente l'ipotesi.

Indice

Abstract	2
Introduzione	8
1.1 Spettroscopia di impedenza elettrochimica	9
1.1.1 Principi alla base di EIS	9
1.1.2 Modello cellulare per EIS	11
1.1.3 Misure di EIS con sferoidi	12
1.2 Polimeri coniugati	13
1.2.1 Proprietà di CPs.....	13
1.2.2 PEDOT:PSS: un materiale promettente.....	14
1.2.3 Proprietà elettriche di film sottili di PEDOT:PSS	15
1.3 Idrogel per colture cellulari.....	17
1.3.1 Proprietà di idrogel	17
1.3.2 Idrogel di Agarosio	18
1.3.3 Colture di sferoidi in idrogel di agarosio	18
1.4 Obiettivi e design del campione	20
Materiali e Metodi	21
2.1 Fabbricazione del MEA.....	21
2.1.1 Fotolitografia.....	21
2.1.2 Spincoating	22
2.1.3 Procedura sperimentale	22
2.2 Set-up sperimentale	24
2.2.1 Fabbricazione della sonda	24
2.2.2 Descrizione del set-up sperimentale	25
2.3 Fabbricazione dei pozzetti di idrogel	26
2.3.1 Silanizzazione.....	26
2.3.2 Preparazione dell'idrogel di agarosio	26
2.3.3 Stampa dei pozzetti	26
2.4 Metodi di caratterizzazione e acquisizione dati.....	28
Risultati	30
3.1 Spettroscopie di Impedenza Elettrochimica.....	30
3.1.1 Sistema in soluzione elettrolitica	30
3.1.2 Sistema in soluzione elettrolitica con stampa di pozzetti di Idrogel.....	32
3.2 Calibrazione Strumentale.....	34
3.3 Mappe di Potenziale.....	37
3.4 Discussione e Conclusioni	41

Appendice	42
Risoluzione dell'equazione di Laplace in mezzo elettrolitico	42
Bibliografia	44

Capitolo 1

Introduzione

In biologia e in ambito medico si effettuano studi di ricerca riguardanti cellule tumorali e somministrazione di medicinali con modelli cellulari in vitro. Attualmente studi preclinici seguono protocolli di lavoro standard secondo i quali viene testata l'efficacia dei medicinali in colture cellulari bidimensionali costituite da strati monocellulari. L'utilizzo di queste colture garantisce un basso costo, un alto rendimento e la facilità nella coltivazione [1]. Una cultura cellulare in due dimensioni costituisce però una sovra-semplificazione del comportamento che le cellule appaiono avere in vivo dal momento che le interazioni cellulari non sono fedelmente ricostruite. Una alternativa promettente per preservare queste interazioni [2] è una cultura cellulare nella quale le cellule possano aggregarsi in tre dimensioni (3D), questo è possibile se queste sono coltivate in substrati non aderenti e che permettono quindi una organizzazione autonoma in strutture stabili note come sferoidi [3]. Nonostante l'aumento nell'utilizzo di sferoidi in ambito biomedico rimane da colmare un vuoto riguardante le tecnologie per monitorare la loro crescita. Le tecniche che vengono considerate standard attualmente necessitano o della distruzione del tessuto per estrarre campioni o per marcarli [4]. La microscopia a fluorescenza, ad esempio, fornisce ottime informazioni ma presenta due svantaggi. Non è un processo scalabile data l'impossibilità di ottenere informazioni in tempo reale e necessita di marker tossici (fluorofori) [5]. Sensori di impedenza elettrochimica si sono mostrati degli ottimi sostituti per monitorare la vita della cultura cellulare in tempo reale in quanto relativamente non costosi e non invasivi. La tecnica utilizzata per la misura di impedenza è la spettroscopia di impedenza elettrochimica EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) [6]. Finora però questa tecnica è stata utilizzata prevalentemente in colture cellulari 2D [7] [8] con recenti tentativi di estenderla a colture 3D [9] [10].

In questo capitolo si espone il funzionamento che sta alla base di EIS e si descrivono i principali materiali utilizzati per la costruzione del campione studiato; si tratta di un substrato planare con micro-elettrodi in oro, rivestiti di PEDOT:PSS e allineati con micro-pozzetti di idrogel di agarosio. Si discuteranno quindi semiconduttori organici, in particolar modo PEDOT:PSS, ed idrogel, con attenzione rivolta a idrogel di agarosio. Infine, viene presentata la descrizione dettagliata del campione e viene illustrato l'obiettivo del lavoro.

1.1 Spettroscopia di impedenza elettrochimica

La spettroscopia a impedenza elettrochimica è una tecnica non invasiva e permette di studiare lo sviluppo di colture cellulare [6], che siano in sospensione o aderenti a un substrato. Si trasmette in input una differenza di potenziale sinusoidale dipendente dal tempo (AC) a basso voltaggio. Si effettua quindi uno sweep in frequenza del segnale in input registrando valori di corrente nel circuito alla stessa frequenza; tramite i moderni strumenti di misura è possibile indagare un ampio range di frequenze da meno di 1 mHz fino a superare 1 MHz.

1.1.1 Principi alla base di EIS

In elettronica si definisce resistenza il rapporto fra voltaggio costante (DC) in input e corrente risultante che attraversa il circuito. Per descrivere regimi di corrente alternata (AC) è necessario estendere il concetto di resistenza in campo complesso, introducendo una nuova grandezza nota come impedenza. Data l'eccitazione del sistema elettrochimico attraverso un potenziale sinusoidale è conveniente rappresentare il voltaggio come un vettore rotante (generalmente noto come fasore) nel piano complesso in cui V_0 è l'ampiezza, f è la frequenza di rotazione e j è l'unità immaginaria.

$$\overrightarrow{V}(t) = V_0 e^{j2\pi f t} \quad (1)$$

È noto come l'eccitazione del sistema data da un voltaggio di questo tipo generi una risposta in corrente anch'essa sinusoidale, dipendente dal tempo e con uno shift di fase. Ovvero si hanno due fasori con la stessa frequenza ma con una differenza di fase costante φ . Conseguentemente è possibile scrivere la corrente con ampiezza I_0 , frequenza f e fase costante φ .

$$\overrightarrow{I}(t) = I_0 e^{j2\pi f t + j \varphi} \quad (2)$$

Si mostra in figura 1 [11] lo schema dell'andamento del potenziale AC dato in input e la corrente risultante del circuito in funzione del tempo.

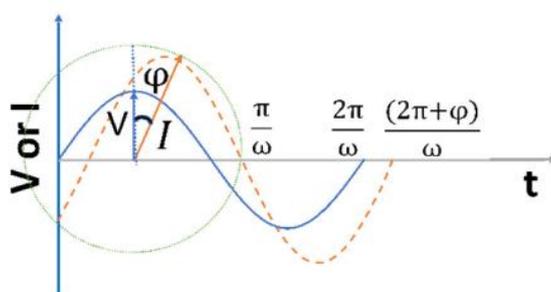


Figura 1: la corrente risultante (arancione) mostra un andamento sinusoidale in risposta al voltaggio AC (blu) dato in input al circuito da [11]

È ora possibile scrivere la definizione di impedenza come il rapporto fra voltaggio in input e corrente del circuito.

$$\vec{Z} = \frac{\overline{V(t)}}{\overline{I(t)}} = \frac{V_0 e^{j2\pi ft}}{I_0 e^{j2\pi ft + j\varphi}} = \frac{V_0}{I_0} e^{-j\varphi} \quad (3)$$

L'impedenza essendo un valore complesso può essere diviso in parte reale e parte immaginaria. Per essere descritta in modo completo si esprime l'impedenza con i valori di modulo e di fase. È possibile ricavare questi valori in funzione della parte reale e immaginaria del valore complesso.

$$Z = Z_r + jZ_i \quad |Z| = \sqrt{Z_r^2 + Z_i^2} \quad \varphi = \tan^{-1}\left(\frac{Z_i}{Z_r}\right) \quad (4)$$

Questo è facilmente osservabile dal plot di Nyquist mostrato in figura 2(a) [12] in cui sull'asse delle ascisse è plottata Z_r e in quello delle ordinate Z_i , in questo modo si vede come l'impedenza possa essere interpretata come un vettore nel piano complesso di lunghezza $|Z|$. Un secondo plot comunemente usato è quello di Bode 2(b) [13] in cui si mostra il modulo e/o la fase dell'impedenza in funzione della frequenza, entrambi gli assi sono mostrati in scala logaritmica.

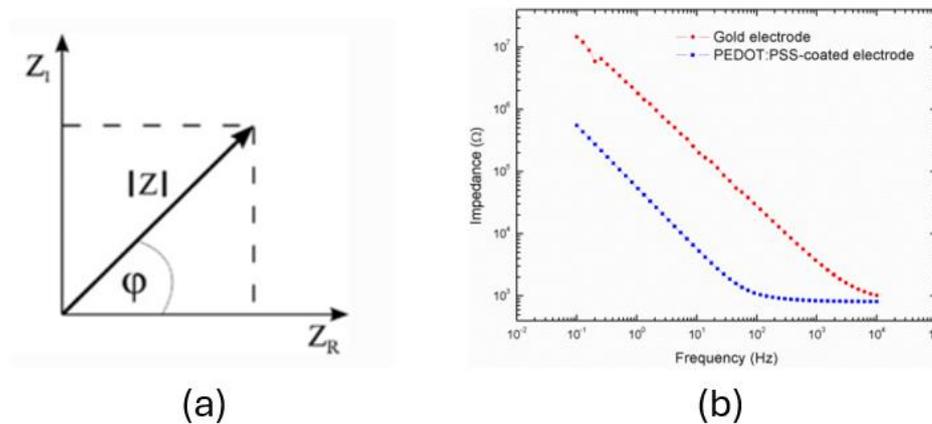


Figura 2: esempi di rappresentazione di impedenza, (a) mostra il plot di Nyquist [12], (b) mostra il plot di Bode [13]

In figura 3 [14] è mostrata l'interfaccia elettrochimica di fondamentale importanza in bio-sensoristica. Si considera un elettrodo immerso in una soluzione elettrolitica, allo scorrere di corrente in questo sistema è possibile modellizzare il comportamento con un circuito equivalente composto da diversi elementi. Nella superficie di contatto fra elettrodo ed elettrolita si crea un doppio strato di portatori di carica: elettroni nell'elettrodo e cariche opposte nella soluzione. Queste sono separate da uno strato di molecole del solvente che agiscono come un dielettrico. Risulta quindi un comportamento capacitivo e modellizzato da una capacità chiamata di double layer

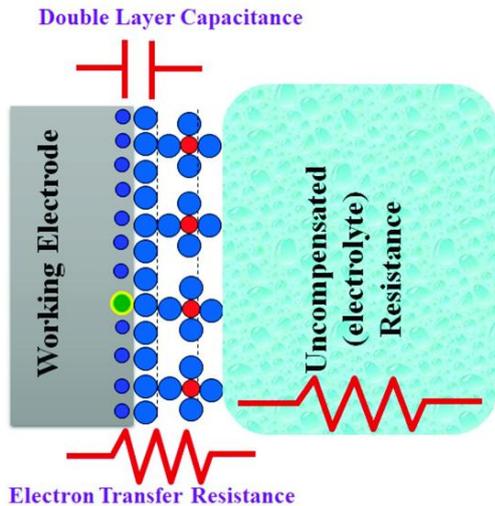


Figura 3: schema che descrive il circuito che modella l'interfaccia elettrochimica elettrodo – elettrolita da [14].

C_{DL} . Nella superficie di contatto possono avvenire reazioni chimiche che permettono scambi di cariche fra soluzione ed elettrodo, questo comportamento Faradaico (resistivo) può essere modellizzato con una resistenza di charge transfer R_{CT} in parallelo con il condensatore prima descritto. La soluzione elettrolitica invece si comporta come una resistenza ed è così che viene parametrizzata R_{SOL} . Questa viene posta in serie agli elementi del circuito che parametrizzano il comportamento della superficie di contatto. Attraverso questo modello di interfaccia elettrochimica diventa chiara l'importanza della spettroscopia di impedenza elettrochimica per conoscerne il

comportamento. Infatti, ogni elemento del circuito è legato ad una proprietà fisica del sistema. Effettuando EIS, quindi, è possibile riconoscerne il comportamento circuitale e di conseguenza le proprietà fisiche e chimiche.

1.1.2 Modello cellulare per EIS

È possibile modellizzare la presenza di una cellula sopra un elettrodo planare come quello descritto nel precedente modello (figura 4) [15]. La membrana cellulare ha spessore di circa 4 nm per una cellula di dimensioni di $10 - 100\ \mu\text{m}$, questa agisce come condensatore con capacità di circa $0.01\text{ pF}/\mu\text{m}^2$. Il citoplasma all'interno si può

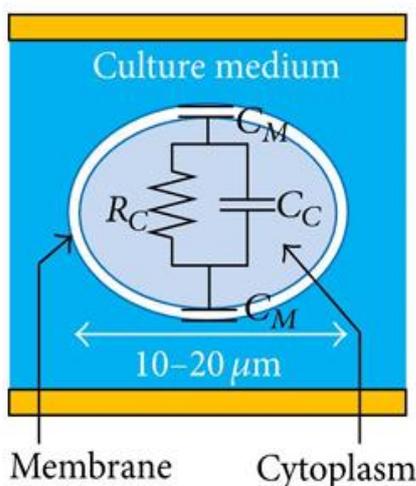


Figura 4: schema che mostra il circuito che descrive il comportamento elettrico della cellula da [15].

modellizzare invece come un parallelo di resistenza R_C e di capacità C_C . La cellula può quindi essere vista come una sfera conduttiva con conducibilità simile a quella della soluzione e con una sottile membrana isolante. Quando la cellula si trova fra gli elettrodi sostituisce parte di elettrolita e causa, dunque, un aumento della resistenza della soluzione (R_{SOL}). Anche l'eventuale adesione della cellula all'elettrodo causa l'alterazione di R_{SOL} e della capacità di double layer C_{DL} . Il primo cresce dal momento che la barriera cellulare (isolante) a contatto con l'elettrodo riduce la superficie nella quale potevano avvenire scambi di cariche fra elettrodo ed elettrolita. Il secondo diminuisce per la stessa causa, la barriera cellulare occupa

superficie che prima era occupata da cariche della soluzione, di conseguenza la capacità diminuisce e l'impedenza aumenta. Questi effetti portano quindi alla crescita nei valori dello spettro di impedenza quando le cellule si duplicano o aderiscono all'elettrodo. Quando invece il numero di cellule in vita nella coltura diminuisce i valori di impedenza decrescono.

1.1.3 Misure di EIS con sferoidi

Utilizzando misure di impedenza è possibile monitorare la crescita della coltura cellulare in tempo reale affidandosi però solo a cellule in adesione all'elettrodo o in sua prossimità. In configurazioni cellulari 3D l'approccio va aggiornato per garantire un campo elettrico uniforme in tutto il campione e rendere il sistema adatto a questo nuovo tipo di coltura cellulare. In letteratura sono presenti alcuni tentativi e sono presentanti alcuni fra quelli più significativi.

Lee et al. [9] nel 2016 hanno mostrato l'uso di EIS per cellule incapsulate in una matrice di idrogel alginato. Hanno studiato l'attività cellulare di GFP che esprime tumore al seno (GFP-MCF-7) usando un sensore di capacità composto da elettrodi verticali. In figura 5 è mostrato in (a) il disegno dell'apparato utilizzato e in (b) e in (c) i risultati dell'esperimento. Un secondo esempio di sistema di misura che è riuscito a monitorare una coltura cellulare è quello portato da Groeber et al. [10]. Sono stati usati elettrodi paralleli come mostrato in figura 5(d) per analizzare l'integrità di epidermide umana ricostruita a diversi livelli di maturità. In figura 5(e) sono mostrati gli spettri di impedenza per cellule di epidermide in tempi differenti.

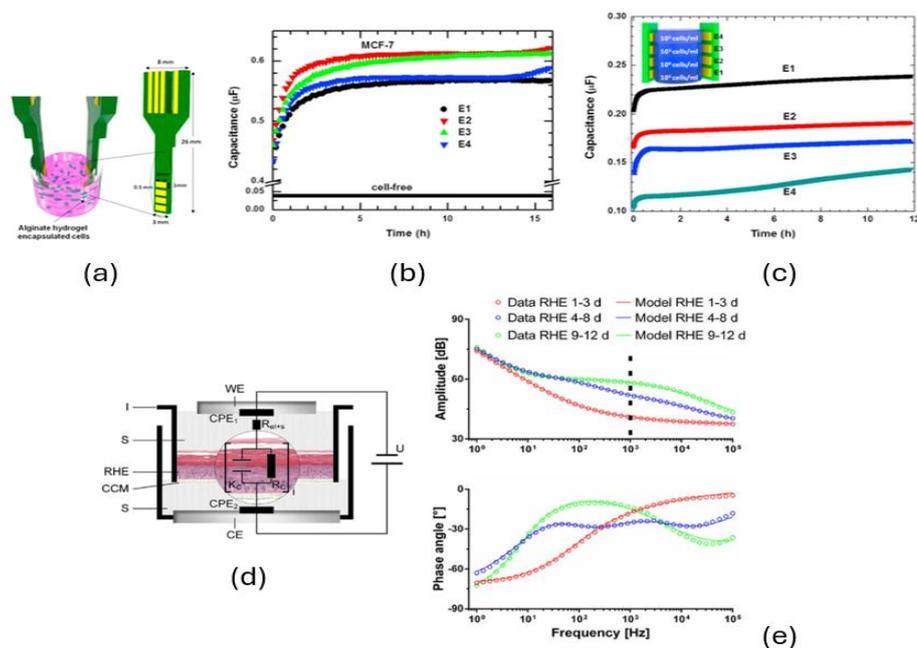


Figura 5: (a) mostra il disegno del sensore di capacità che consiste in quattro paia di elettrodi verticali, (b) capacità misurata in funzione del tempo di idrogel privo di cellule e di idrogel con coltura di GFP-MCF-7, (c) confronto fra capacità in funzione del tempo di campioni con differente densità cellulare da [9]. (d) Set-up per misurare la maturazione di epidermide umana artificiale (RHE) in cui viene riportato il circuito equivalente, (e) plot di Bode di modulo e fase di impedenza di RHE da [10].

1.2 Polimeri coniugati

I materiali usati per dispositivi della vita quotidiana sono basati sul trasporto di carica di elettroni o lacune. Questo è in forte contrasto con il trasporto di informazione nel mondo biologico. È noto, infatti, che le cellule comunicano attraverso canali ionici, pompe ioniche e recettori o trasportatori sensibili a correnti ioniche. Nella ricerca di materiali biocompatibili che diminuissero l'impedenza dell'interfaccia elettrochimica è emersa una classe di materiali nota come polimeri coniugati (Conjugated Polymers) CPs.

1.2.1 Proprietà di CPs

I polimeri coniugati sono costituiti da anelli aromatici ripetuti e legati fra loro, questi creano una conformazione molecolare lineare. Grazie a deboli legami di van der Waals, interazioni dipolari e forze elettrostatiche si genera una microstruttura di film sottile che rende possibile il trasporto di carica fra una catena e l'altra. L'alternarsi di legami singoli e doppi nella struttura della molecola consente il libero movimento di elettroni delocalizzati nella catena. Infatti, grazie all'ibridazione di sp^2 del carbonio gli orbitali p si allineano parallelamente gli uni con gli altri formando un legame π lungo la catena condiviso da tutti gli atomi. La struttura a bande energetiche del materiale corrisponde a una banda π piena e a una banda π^* completamente vuota, queste sono separate da un gap energetico fra il più alto orbitale occupato e il più basso orbitale vuoto [16].

La maggior parte dei polimeri coniugati non possiede portatori di carica intrinseci, perciò, per la conduzione elettrica sono necessarie particelle esterne, come nel dopaggio di semiconduttori. I CPs vengono parzialmente ossidati da accettori elettronici e parzialmente ridotti da donatori di elettroni; una volta dopati posso quindi essere di tipo p (trasportatori di lacune) e/o di tipo n (trasportatori di elettroni). Questi materiali hanno mostrato anche meccanismi di conduttività elettronica e ionica rendendoli degli ottimi candidati per studi biologici, questi infatti coinvolgono flussi ionici in ambiente acquoso [17].

I CPs sono anche noti per essere materiali "morbidi", questo porta vantaggi da numerosi punti di vista. Il primo è la loro abilità di assorbire la soluzione in cui sono immersi gonfiandosi, questo porta naturalmente ad un aumento di trasferimento ionico dal momento che più ioni sono disponibili. Il secondo è la loro compatibilità con materiali come vetro, carta o plastica. Grazie a ciò questi materiali possono essere trattati a bassa temperatura con tecniche come spin coating, stampa o deposizione da fase gassosa [18].

Film sottili di CPs sono tipicamente trasparenti rendendo possibili analisi ottiche del campione [19].

Si riporta anche la possibilità di modificare le proprietà fisiche e chimiche del polimero con discreta facilità aggiungendo ad esempio strutture chimiche al polimero, oppure unendo molecole specifiche per ottenere un comportamento desiderato [20].

1.2.2 PEDOT:PSS: un materiale promettente

PEDOT o poli(3,4 - etilenediossitiufene) è il miglior polimero conduttivo in termini di conduttività e stabilità sintetizzato fino ad oggi; ha infatti una alta e stabile conduttività (circa 10^3 S cm^{-1}) specialmente nel suo stato dopato. PEDOT può essere sintetizzato attraverso polimerizzazione chimica ossidativa o elettrochimica di 3,4-etilenediossitiufene (EDOT), mostrato in figura 6 [21].

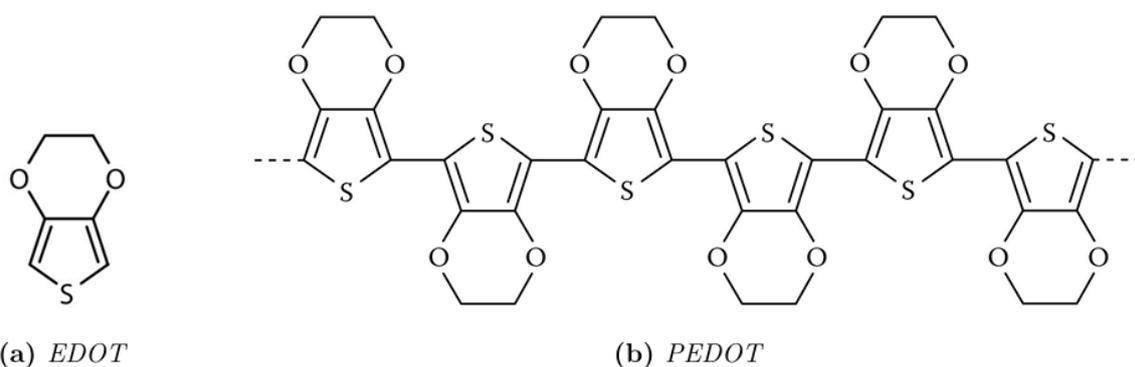


Figura 6: struttura chimica di (a) 3,4- etilenediossitiufene (EDOT) e di (b) poly(3,4- etilenediossitiufene) (PEDOT) [21].

Le ragioni del grande successo di PEDOT rispetto ad altri polimeri conduttivi vanno ricercate nella sua eccellente stabilità chimica e termica (fino a 150°C) grazie alla sua geometria ad anelli e la scarsa presenza di difetti data da una struttura regolare. Inoltre, può essere dopato in modo reversibile e ripetitivo causando una variazione del colore, da un blu opaco nello stato ridotto a quasi trasparente nello stato ossidato. La principale ragione però della sua diffusione è la sua disponibilità come dispersione polimerica: un polielettrolita complesso (PolyElectrolyte Complex) PEC può essere creato usando poli(acido stirensolfonico) (PSS) come contro ione per creare una dispersione stabile, in questo modo le cariche positive di PEDOT sono bilanciate dall'anione PSS. Le strutture chimiche e la dispersione creata sono mostrate in figura 7 [22].

Il PSS viene utilizzato in eccesso rispetto al PEDOT con un rateo PEDOT – PSS da 1: 2.5 fino a 1: 20. Come accade nella maggior parte dei polimeri coniugati carichi, PEDOT non è solubile in nessun solvente, è necessario il PSS che deve essere presente al momento della polimerizzazione del PEDOT in modo che il PEC si formi in situ quando la catena di EDOT si crea. Il solvente scelto per la sintesi di PEDOT:PSS è l'acqua essendo polare, quindi un ottimo solvente per PSS, ed essendo inerte alla maggior parte di elementi chimici. Non vi è nessun aggregato molecolare dato da PEDOT:PSS ma solo interazioni fra catene polimeriche.

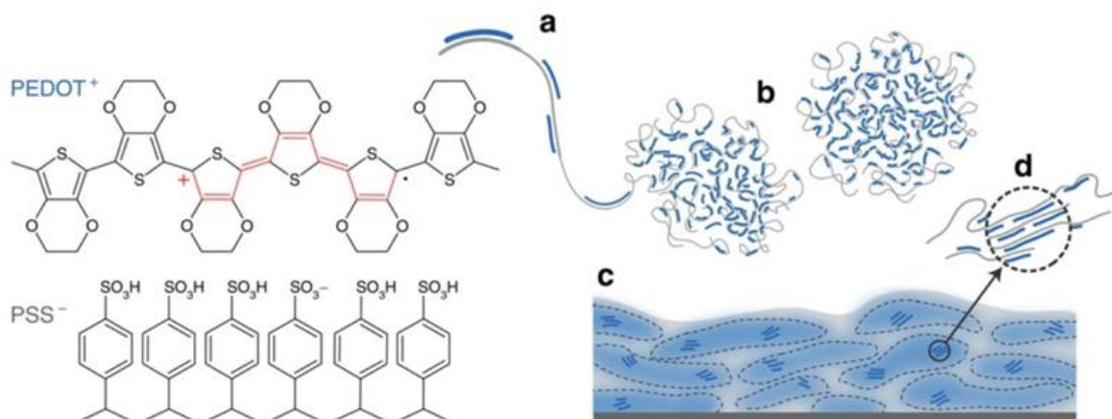


Figura 7: struttura chimica di PEDOT:PSS: (a) sintesi di PEDOT in struttura di PSS, (b) formazione di particelle colloidali in dispersione, (c) film ottenuto con fasi ricche in PEDOT:PSS (blu) e fasi ricche in PSS (grigie), (d) aggregati che migliorano il trasporto elettronico [22].

La dispersione sintetizzata può essere descritta come un gel polimerico con deboli legami di crosslink composto da particelle gelatinose di PEDOT e da uno scheletro di PSS in solvente acquoso. Le particelle di gel si depositano in una morfologia chiamata a pancake [23] mostrato in figura 7(d) dove queste si restringono nella direzione verticale durante la formazione del film portando infine a una forma a disco; la regione di contatto è ricca in PSS.

1.2.3 Proprietà elettriche di film sottili di PEDOT:PSS

La maggior parte di dispositivi elettronici sono costruiti su substrati planari e PEDOT:PSS viene solitamente depositato in film sottili. Si descrivono brevemente le proprietà elettriche del materiale e le conseguenze della sua presenza nell'interfaccia elettrochimica.

Per comprendere le proprietà elettriche si utilizza la conduttività nonostante una completa teoria di conduzione per polimeri altamente dopati non esista ancora. Si definisce conduttività il prodotto di carica elementare per la mobilità di trasportatori di carica per la loro densità. In PEDOT:PSS solo le lacune contribuiscono al trasporto di carica dal momento che gli elettroni si ricombinano nei siti ossidati del PEDOT. Per un rateo 1 : 2.5 di PEDOT – PSS è possibile calcolare la densità delle lacune e viene stimata pari a circa 10^3 cm^{-3} , con ciò si ottiene una conduttività di 1000 S/cm. Si notifica che molti altri fattori influenzano la conduttività come il valore del pH della soluzione, la distribuzione di particelle di gel e l'aggiunta di altri componenti. La spiegazione comune dietro al meccanismo di conduttività di PEDOT:PSS è chiamato *hopping model*: le cariche saltano fra catene polimeriche vicine. Questo accade grazie agli orbitali π , in questi orbitali gli elettroni sono liberi di muoversi; quando si verifica una sufficiente sovrapposizione π - π fra catene polimeriche vicine gli elettroni possono saltare da una molecola all'altra [17].

È importante menzionare il comportamento di film sottile di PEDOT:PSS posto a contatto con un elettrodo funzionante e una soluzione elettrolitica [17]. In figura 8 è

mostrato lo schema della configurazione descritta. PEDOT:PSS, in qualità di OMIEC (Organic Mixed Ionic-Electronic Conductor), viene studiato per capire quale circuito equivalente associare alla configurazione presentata, se siano presenti fenomeni Faradaici o capacitivi. La presenza di PEDOT:PSS permette di considerare trascurabili i fenomeni Faradaici presenti nell'interfaccia elettrochimica (che descrivono la penetrazione di elettroni nella soluzione). La nuova interfaccia può semplicemente essere modellizzata da un condensatore con una nuova capacità C_{DL} in serie alla resistenza della soluzione R_{SOL} . PEDOT:PSS segue quindi un comportamento capacitivo; dal momento che le cariche (ioniche ed elettroniche) sono accumulate in tutto il volume del film si fa riferimento alla capacità volumetrica del materiale [24]. Questa pone la capacità del condensatore in funzione del volume e risulta compresa fra $25 - 60 F/cm^3$ [25]. Il principale effetto che ha PEDOT:PSS sull'interfaccia elettrochimica è quello di diminuire l'impedenza alle basse frequenze [26].

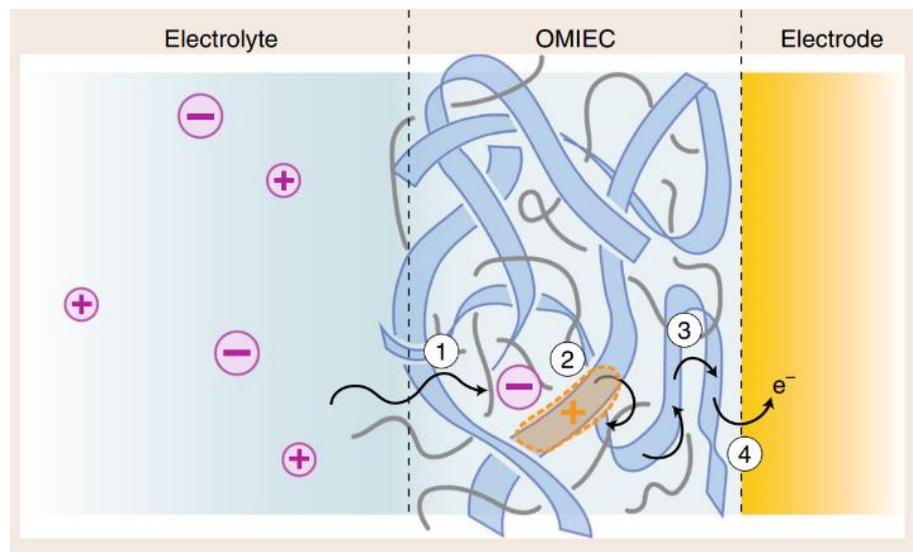


Figura 8: OMIEC in contatto con elettrolita ed elettrodo, sono mostrati in (1) iniezione di uno ione dopante, (2) lacuna stabilizzata da uno ione dopante, (3) portatore di carica "salta" fra strutture di PEDOT ravvicinate e (4) scambio di carica fra OMIEC e l'elettrodo [17].

1.3 Idrogel per colture cellulari

Le proprietà bio-chimiche delle cellule dipendono fortemente dall'ambiente in cui si trovano. La maggior parte della conoscenza che si ha su processi cellulari deriva da studi effettuati su materiali piatti e duri come vetro o plastica. Nonostante la semplicità di utilizzo di questi materiali le cellule coltivate in questo modo presentano differenze sostanziali rispetto a quelle in vivo. È anche già stato discusso come una coltura bidimensionale non rappresenti fedelmente le proprietà cellulari (introduzione al capitolo 1). Per colmare il varco fra i metodi di coltura tradizionali e aggregati cellulari tridimensionali complessi sono avanzate molte ipotesi su nuovi materiali utilizzabili. Quelli che hanno riscontrato più vantaggi sono i polimeri idrofili gonfiati in acqua, conosciuti come idrogel. I principali vantaggi di questi materiali sono il grande contenuto di acqua e la loro texture elastica, questi causano pochissimi danni alla coltura cellulare e sono compatibili con tessuti viventi. Gli idrogel stanno ottenendo riconoscimento anche da un punto di vista ingegneristico dal momento che hanno simili proprietà meccaniche di tessuti molli e possono essere ingegnerizzati per imitare la morfologia di questi tessuti.

1.3.1 Proprietà di idrogel

La principale proprietà che illustra il vantaggio degli idrogel per la coltura cellulare o semplicemente per l'interazione con tessuti biologici è il modulo di Young. Come mostrato da Yuk, Lu, Zhao et al. [27] in figura 11 i principali materiali usati come elettrodi presentano un modulo di Young oltre 1 GPa, che è di diversi ordini di grandezza maggiore rispetto a quello mostrato da tessuti neurali. Altri materiali sono stati proposti per colmare la differenza, tra questi vi sono materiali plastici (PaC, PI, PC) o elastomeri (PDMS, PU, Epoxy) ma presentano valori comunque troppo elevati.

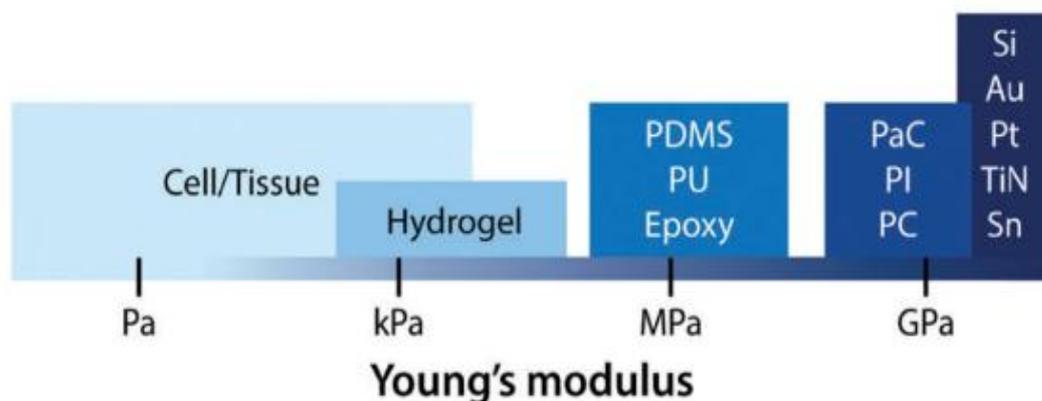


Figura 9: modulo di Young di materiali comunemente usati come elettrodi o come rivestimento di elettrodi, gli idrogel presentano un valore simile a quello di cellule/tessuti riducendo l'incompatibilità meccanica con tessuti biologici da [27].

Gli idrogel invece presentano biocompatibilità e proprietà simili a quelle dei tessuti, si notano infatti valori di modulo di Young in comune fra tessuti e idrogel dell'ordine del kPa.

1.3.2 Idrogel di Agarosio

L'agarosio è un polisaccaride lineare ottenuto dalle alghe rosse che consiste in D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio con molti gruppi idrossilici nella sua unità strutturale. Questi rendono possibili i legami ad idrogeno fra gli atomi di idrogeno della catena e quelli in acqua. Grazie a questa proprietà l'agarosio può formare un idrogel stabile. Il processo di gelificazione, come mostrato in figura 10 [28], è governato dalla temperatura. Scaldando il materiale fino ad 80 – 90 °C i legami ad idrogeno fra le unità strutturali di agarosio si spezzano, in questo modo l'agarosio si disperde in acqua in forma di spire casuali. Quando la temperatura viene abbassata ai 30 – 40 °C le catene molecolari di agarosio si rintrecciano grazie a nuovi legami ad idrogeno, in questo modo si forma una struttura a doppia elica che si dispone strettamente nello spazio per formare un gel [29].

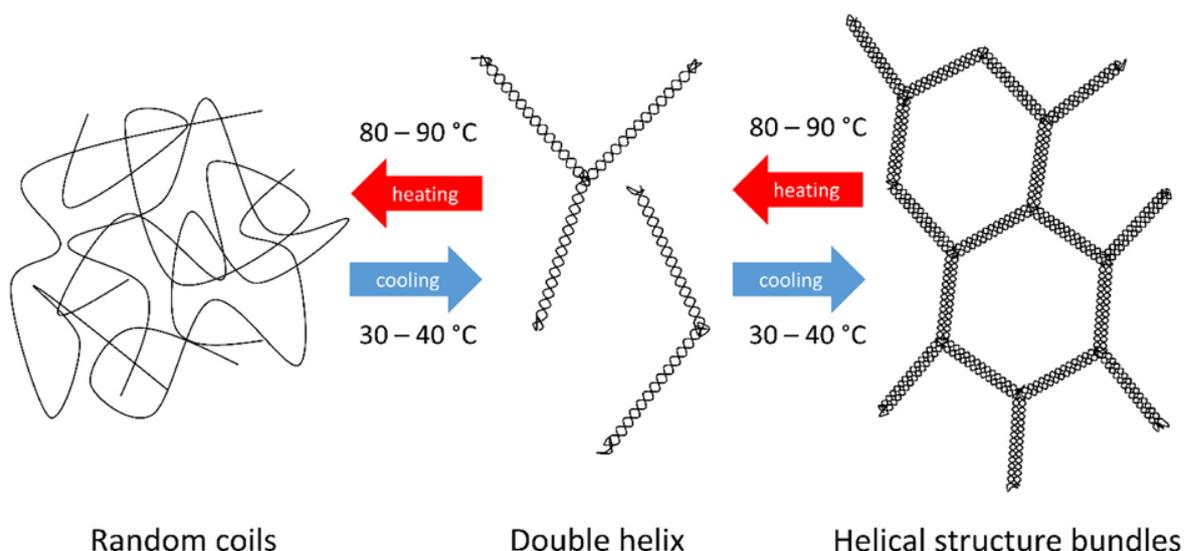


Figura 10: meccanismo di gelificazione dell'agarosio da [29].

1.3.3 Colture di sferoidi in idrogel di agarosio

Negli ultimi anni stanno venendo studiate sempre di più le proprietà meccaniche e di adesione cellulare degli idrogel. Nell'idrogel di agarosio, in particolare, affinché una coltura cellulare non aderisca alle pareti è necessario un baking a temperatura ambiente con una soluzione di alcol polivinilico (PVA) in acqua. Avendo trattato l'idrogel di agarosio in questa maniera è possibile creare una struttura a pozzetti in cui depositare la coltura cellulare. Non essendo possibile l'adesione in nessuna superficie del pozzetto le cellule si aggrenderanno in una struttura tridimensionale in sospensione. In figura 11, dal lavoro di Tartagni et al. [30] si mostra ciò che è appena stato descritto. Come si nota in figura 11(c) la deposizione di cellule risulta in uno sferoide in

sospensione. Se si stampa quindi l'idrogel di agarosio in questa forma e con il trattamento al PVA come descritto è possibile usarlo come scaffold per sferoidi cellulari.

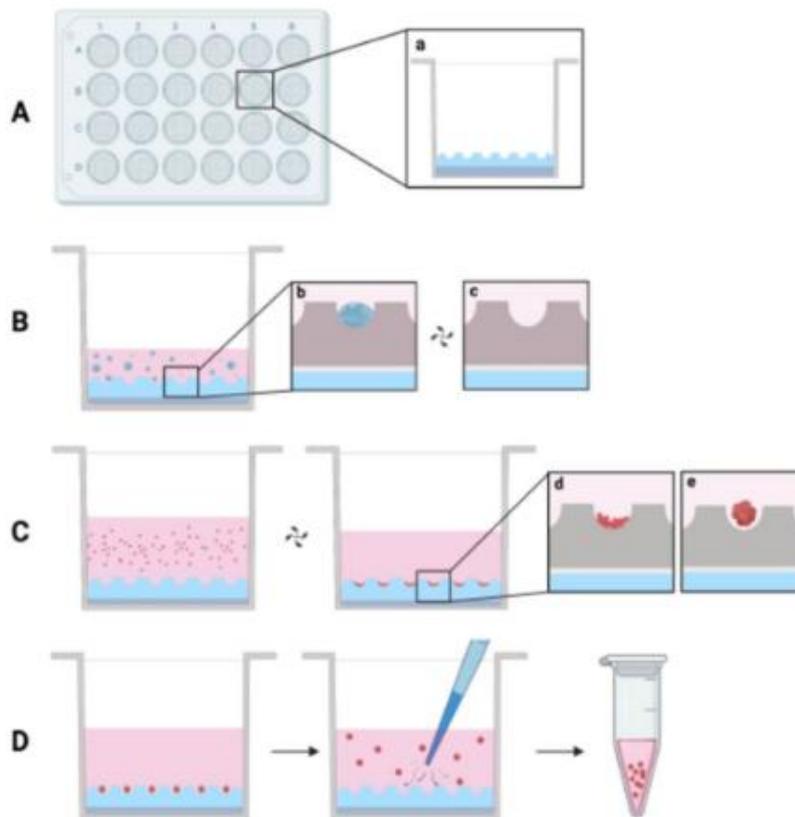


Figura 11: procedimento di lavoro presentato da [30], in (c) si nota l'aggregazione tridimensionale delle cellule in pozzetti di idrogel.

1.4 Obiettivi e design del campione

La conoscenza dei materiali precedentemente descritti è fondamentale per la descrizione del campione utilizzato sperimentalmente e per la comprensione dell'obiettivo finale dello studio.

Il campione analizzato consiste in un substrato planare in vetro, su questo si trova un array di micro-elettrodi (MicroElectrodes Array) MEA in oro. Gli elettrodi sono stati ricoperti di un film sottile di PEDOT: PSS e le feedlines (percorsi conduttivi) sono state isolate elettricamente con un film polimerico. In corrispondenza di ogni elettrodo è stato stampato un pozzetto di idrogel di agarosio. Tutto il sistema si trova immerso in una soluzione elettrolitica.

Il ruolo del film di PEDOT:PSS è quello di abbassare l'impedenza dell'interfaccia. Il primo ruolo dell'idrogel in questo dispositivo è quello di confinare la coltura cellulare inducendola a formare un aggregato tridimensionale (aspetto già utilizzato in [30]) attraverso un trattamento al PVA. Questo è mostrato in figura 12 dove si pone a confronto lo schema di una coltura cellulare 2D in adesione agli elettrodi 12(a) e lo schema di una coltura cellulare aggregata in sferoide grazie al pozzetto di idrogel 12(d).

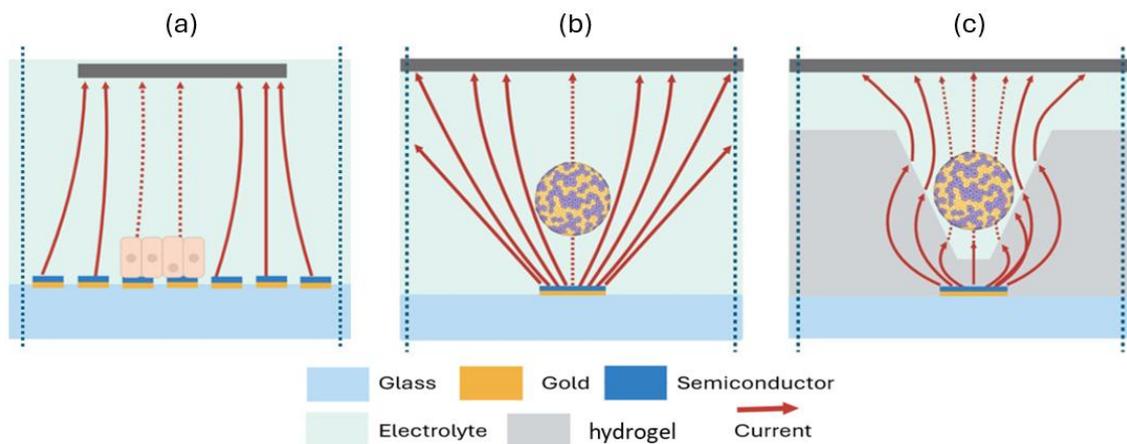


Figura 12: schemi di diverse colture cellulari, sono disegnate le linee di corrente influenzate dalla presenza della coltura, le linee tratteggiate indicano che si ha una corrente minore a causa della presenza di cellule. (a) Schema di coltura cellulare bidimensionale in adesione agli elettrodi, (b) schema di coltura tridimensionale in sospensione in assenza di pozzetto di idrogel, (c) schema di coltura cellulare tridimensionale in sospensione all'interno del pozzetto di idrogel.

Il secondo ruolo del pozzetto è quello di confinare le linee di corrente elettrochimica sullo sferoide, questo è possibile grazie alla bassa conduttività dell'idrogel rispetto alla soluzione elettrolitica. In figura 12 è mostrato il confronto delle linee di corrente fra una coltura cellulare 3D in assenza di pozzetto 12(b) (di conseguenza senza confinamento) e quelle in presenza di pozzetto 12(c) con confinamento. L'obiettivo del lavoro è quello di verificare sperimentalmente il confinamento di potenziale elettrico indotto dalla presenza del pozzetto. Si è proceduto confrontando mappe in ampiezza e fase del potenziale elettrico in presenza e in assenza di pozzetto di idrogel. Dettagli sui metodi sperimentali e sistema di misura sono riportati nel capitolo successivo.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

In questo capitolo sono presentate le specifiche dei materiali e i metodi sperimentali usati per costruire il campione da analizzare, viene illustrato l'apparato sperimentale utilizzato per la caratterizzazione degli strumenti utilizzati e per le misure finali. Il capitolo viene suddiviso in quattro sezioni, la prima illustra il procedimento di fabbricazione dell'array di microelettrodi, la seconda descrive l'apparato sperimentale necessario alla fabbricazione del film di idrogel, alle caratterizzazioni degli strumenti utilizzati e alle misure finali. La terza descrive la preparazione e la fabbricazione dell'idrogel di agarosio e la quarta le tecniche di caratterizzazione e di misura utilizzate.

2.1 Fabbricazione del MEA

Il campione è composto da un substrato planare in vetro con micro-elettrodi in oro, gli elettrodi vengono ricoperti da un sottile film di PEDOT:PSS mentre le feedlines vengono schermate tramite un materiale polimerico isolante noto come negative photoresist. È presentata di seguito la procedura sperimentale step by step per la preparazione del MEA, basata su tecniche di fotolitografia.

2.1.1 Fotolitografia

La fotolitografia si basa sulle proprietà di alcuni materiali sensibili alla luce chiamati photoresist. Questi materiali possono essere solubili in specifici solventi chiamati developer dipendentemente se sono stati esposti a raggi UV. Esistono due categorie di photoresist: se il materiale viene esposto a raggi UV e diventa solubile nel developer allora viene chiamato positive photoresist, se invece viene esposto a raggi UV e la parte esposta diventa insolubile nel developer viene chiamato negative photoresist. Il processo di immersione nel developer per eliminare photoresist dal campione è chiamato sviluppo. La fotolitografia permette di trasferire un pattern geometrico in un substrato ricoperto con photoresist esponendo a raggi UV zone specifiche. Sperimentalmente la fotolitografia è stata effettuata con ML3 MicroWriter di Durham Magneto Optics. Questa è una macchina che effettua fotolitografia a scrittura diretta. Generalmente operazioni standard di fotolitografia si basano sull'esposizione attraverso una maschera di vetro cromato costruita da venditori specifici. Nel campo della ricerca è però necessario cambiare spesso il design della maschera. Le macchine che effettuano fotolitografia a scrittura diretta risolvono il problema dal momento che memorizzano la maschera in un software. Queste macchine usano ottiche controllate da computer in modo da esporre a raggi UV direttamente il photoresist senza il bisogno di una maschera fisica. I pattern necessari sono stati disegnati con il software Clewin 4

e caricate sul software di ML3. Questa usa una sorgente di luce a 385 nm in grado di garantire una risoluzione di 1 μm .

2.1.2 Spincoating

Materiali come photoresist e PEDOT:PSS sono stati uniformemente distribuiti sul campione utilizzando spincoating. Questa tecnica permette la formazione di film sottili ed omogenei con grande riproducibilità. Il liquido che si vuole distribuire viene versato sul campione e lo spin coater (strumento che effettua spincoating) viene accelerato fino a una scelta velocità rotazionale. L'operazione lascia sul substrato un film sottile mentre la maggior parte della soluzione viene espulsa a causa della rotazione.

2.1.3 Procedura sperimentale

Il substrato di vetro è stato pulito mediante sonificazione in bagni di acetone/isopropanolo/acqua distillata. Dopo una fase di disidratazione (10 minuti a 110 °C), è stato applicato lo strato di positive photoresist Microposit S1818 tramite spin coating (4000 rpm per 60 secondi) e successivamente è stato fatto annealing (letteralmente "ricottura") a 110 °C per 1 minuto. I contatti metallici sono stati modellati attraverso litografia a scrittura diretta utilizzando ML3 Microwriter (Durham Magneto Optics). È stato fatto lo sviluppo del photoresist con il developer Microposit MF-319 in modo da eliminare la parte esposta a raggi UV. Successivamente, sono stati depositati 7 nm di cromo e 30 nm di oro tramite evaporazione termica. I campioni sono stati immersi in acetone per 4 ore per la rimozione del photoresist (lift-off). I contatti metallici sono stati incapsulati con il negative photoresist mr-DWL 5 (Micro Resist Technology). Il photoresist è stato applicato tramite spin coating a 3000 rpm per 30 secondi ed è stato fatto annealing a 90 °C per 4 minuti. Dopo l'esposizione laser è stato fatto un secondo annealing a 100 °C per 2 minuti e i campioni sono stati fatti riposare per 1 ora a temperatura ambiente. Lo sviluppo è stato effettuato con il developer mr-Dev 600 (Micro Resist Technology), e infine il photoresist è stato sottoposto ad annealing finale (hard bake) a 120 °C per 30 minuti.

È stato poi applicato uno strato di S1818 tramite spin coating (2000 rpm per 60 secondi) per la fotolitografia del PEDOT:PSS. Dopo lo sviluppo, i substrati sono stati trattati con plasma d'aria (15 W per 4 minuti) e la soluzione di PEDOT:PSS è stata applicata tramite spin coating a 3000 rpm per 10 secondi. Lo spessore finale del film risultante è stato di (110 ± 10) nm. La soluzione utilizzata è composta dal 94% PEDOT:PSS (Heraeus, Clevios PH1000), dal 5% glicole etilenico (EG) (Sigma Aldrich), utile a rendere PEDOT:PSS più conduttivo, dal 1% di 3-glicidossipropiltrimetossisilano (GOPS) per aumentarne la stabilità in soluzioni acquose e dal 0,25% di acido 4-dodecilbenzensolfonico (DBSA) utilizzato per aumentare la tensione superficiale e quindi migliorare l'adesione al substrato. Successivamente si è fatto annealing dei campioni a 120 °C per 1 ora, e infine lo strato di S1818 è stato rimosso dopo 4 ore in isopropanolo.

In figura 13 è presentata la visualizzazione sintetica dei passaggi appena illustrati. Una piscinetta in silicone è stata disposta sul campione in modo che al suo interno fossero collocati tutti gli elettrodi. È in questo modo possibile inserire una soluzione elettrolitica (PBS) all'interno della well in modo che tutti gli elettrodi si trovino immersi.

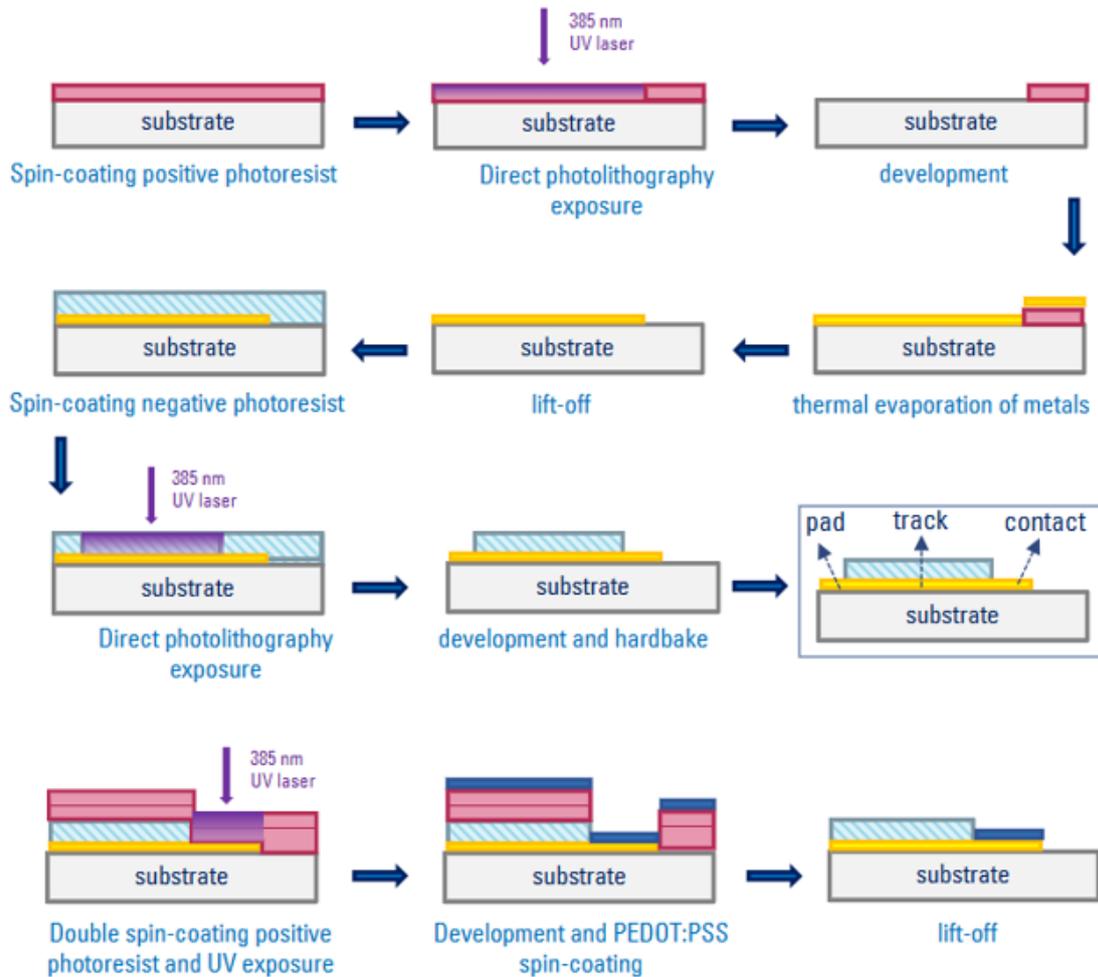


Figura 13: schema dei passaggi della fabbricazione di MEA con sottile film di PEDOT:PSS sugli elettrodi. Nota: non è stato fatto un doppio spin coating per il positive photoresist nell'ultima riga ma si è creato solo un singolo strato.

2.2 Set-up sperimentale

In questa sezione si mostra e si descrive il set up sperimentale utilizzato per l'acquisizione di misure di potenziale nel campione fabbricato. La prima parte descrive il processo di fabbricazione di una sonda utile all'acquisizione di misure di potenziale mentre la seconda descrive il vero e proprio apparato sperimentale costituito da microscopio invertito e da set di micromanipolatori.

2.2.1 Fabbricazione della sonda

La sonda consiste in una pipetta sottile in vetro dotata di micro-foro (diametro di $\sim 100 \mu m$) in una delle due estremità (figura 14(a)). Al suo interno è stato inserito un filo di Ag/AgCl e riempita con soluzione elettrolitica (PBS). Seguono i passaggi effettuati in dettaglio.

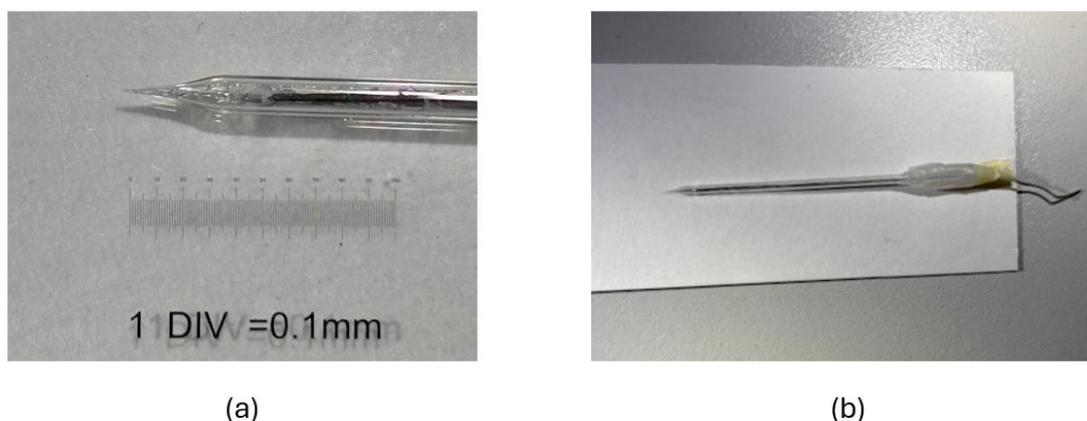


Figura 14: (a) microforo al termine della pipetta in vetro, la scala graduata misura 1 cm con risoluzione di 0.1 mm. (b) Sonda composta da pipetta in vetro, filo di Ag/AgCl fissato con parafilm e nastro adesivo, soluzione PBS all'interno.

- **Step 1: produzione del filo di Ag**

Si è utilizzato un filo di Ag di lunghezza $l = 4.5 \text{ cm}$ e di diametro $d_1 = 0.5 \text{ mm}$. È stato limato uniformemente in modo da raggiungere il diametro di $d_2 = 0.35 \text{ mm}$. Grazie a questo passaggio è stato possibile inserirlo in seguito all'interno della pipetta in vetro.

- **Step 2: clorurazione dell'Ag**

Il filo di Ag viene ossidato in un ambiente ricco di cloro. Sperimentalmente si utilizza un potenziostato. Viene fatta scorrere corrente di densità $J = 100 \mu A/cm^2$ all'interno del filo di Ag immerso in una soluzione ricca di Cl (KCl 0.25 M). La corrente è stata erogata per 4 ore. Il processo descritto ha permesso la formazione di un sottile strato di AgCl in superficie. Si è così creato il filo di Ag/AgCl.

- **Step 3: composizione della sonda**

Attraverso una siringa dotata di ago estremamente sottile è stata riempita la pipetta con la soluzione PBS con l'accortezza di evitare la formazione di bolle

d'aria all'interno. Successivamente il filo di Ag/AgCl è stato inserito all'interno. Questo è stato poi fissato alla pipetta tramite parafilm e nastro adesivo. Il risultato finale è mostrato in figura 14(b).

2.2.2 Descrizione del set-up sperimentale

L'immagine dell'apparato sperimentale è mostrata in figura 15. Si tratta di un microscopio invertito 15(a) dotato di ingrandimenti a 5x, 20x e 50x. Per tutti gli scopi del lavoro è stato utilizzato sempre l'ingrandimento 5x.

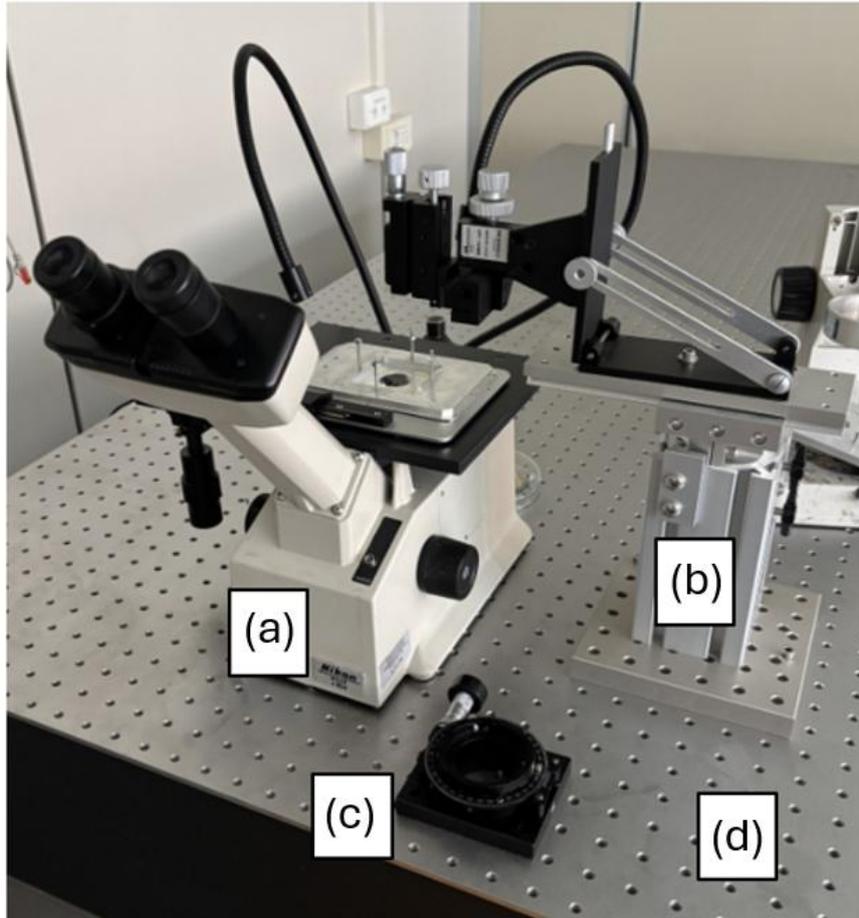


Figura 15: set-up sperimentale compost da (a) microscopio invertito, (b) set di micromanipolatori, (c) micromanipolatore angolare, (d) banco ottico.

A destra del microscopio si trova un set di micromanipolatori 15(b). È possibile fissare la sonda ai micromanipolatori, in questo modo si possono effettuare spostamenti micrometrici lungo i tre assi spaziali. La precisione risulta essere per gli spostamenti orizzontali (quindi lungo gli assi X e Y) di 0.1 mm. Per l'asse verticale si hanno in dotazione 2 micromanipolatori, uno "grossolano" per spostamenti macroscopici e uno "fine" per quelli microscopici. La precisione lungo questo asse (Z) è di 10 μm . Vi è la possibilità di integrare al set di micromanipolatori un micromanipolatore angolare 15(c). Il set-up è stato fissato al banco ottico per aumentare la precisione delle misure 15(d) riducendo gli effetti delle sollecitazioni meccaniche esterne.

2.3 Fabbricazione dei pozzetti di idrogel

Sul campione fabbricato in precedenza viene applicato uno strato di idrogel di agarosio con pozzetti a piramide rovesciata. Si presenta in questa sezione la preparazione di idrogel di agarosio e la stampa in film con pozzetti.

2.3.1 Silanizzazione

La silanizzazione è un processo utile all'aumentare l'aderenza dell'idrogel al substrato. Si è creata una soluzione di 3-amminopropiltrietossisilano (APTES) al 2% in acqua distillata, miscelata nel sonificatore. È stata quindi inserita nella well per una notte. In questo processo uno strato monomolecolare di silano si deposita sul campione. Questo favorisce l'attacco dell'idrogel al substrato [31].

2.3.2 Preparazione dell'idrogel di agarosio

Sono stati creati 10 grammi di soluzione composta al 98% di acqua distillata e 2% di agarosio. Per far sciogliere l'agarosio in acqua è stato necessario aumentare la temperatura della soluzione. Si è quindi scaldata la soluzione in microonde con l'accortezza di evitare il bollore per non far fuoriuscire la soluzione dal contenitore. Non avendo controllo sulla temperatura si è considerato l'agarosio completamente disciolto quando la soluzione è risultata trasparente alla vista. Da questo momento in poi la soluzione liquida, diminuendo in temperatura, si gelificherà fino a diventare un composto solido nell'arco di 20 – 30 minuti.

2.3.3 Stampa dei pozzetti

La stampa segue il seguente protocollo noto come micromolding: la soluzione di agarosio viene versata sul substrato e lo stampo con il pattern desiderato viene pressato sulla soluzione. Questo protocollo è stato adattato al set up sperimentale essendo necessario l'allineamento dei pozzetti con gli elettrodi sottostanti. Lo schema di micromolding è presentato in figura 16.

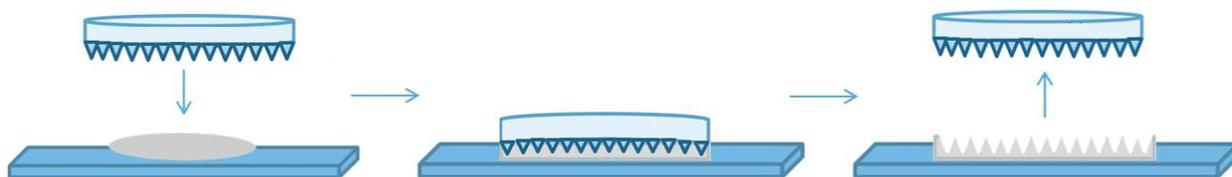
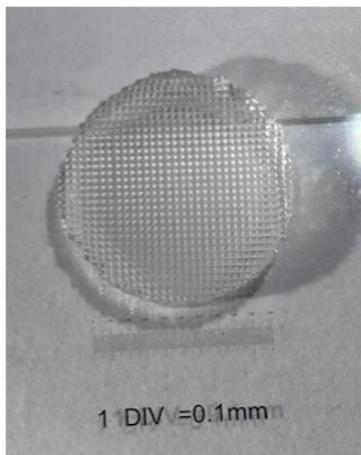


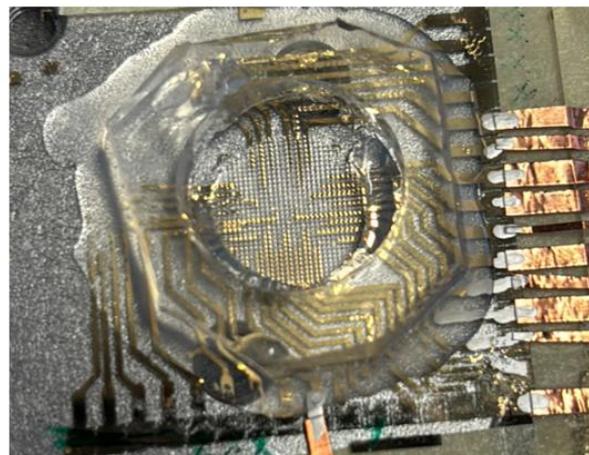
Figura 16: schema di micromolding, in grigio si ha la soluzione di idrogel che viene pressata dallo stampo di PDMS

Sperimentalmente si è usato uno stampo circolare di PDMS, questo (mostrato in figura 17(a)) è fabbricato in modo da avere piramidi di altezza 400 μm a base quadrata di lato 250 μm in rilievo. Quando questo viene pressato sulla soluzione liquida di agarosio e si mantiene la posizione fino a gelificazione si ottiene un film di idrogel di agarosio con pozzetti piramidali a base quadrata.

Il campione di MEA con well di silicone è stato posto su un vetrino a sua volta fissato al tavolino portaoggetti del microscopio. Si è attaccato con lo stampo di PDMS ad un “pistone” in plastica fissato al micromanipolatore angolare. Il set di micromanipolatori è stato quindi equipaggiato con questo sistema di micromanipolatore angolare e stampo. Lo scopo del “pistone” è quello di favorire l’ingresso dello stampo nella well, altrimenti ostacolato dalla presenza del micromanipolatore angolare. Osservando al microscopio e muovendo lo stampo con il micromanipolatore angolare (tenendo fisso il campione) si sono pre-allineate le piramidi dello stampo con gli elettrodi. Lo scopo del pre-allineamento dello stampo è quello di garantire l’allineamento dei pozzetti di idrogel agli elettrodi al momento della stampa senza altri allineamenti successivi alla stampa.



(a)



(b)

Figura 17: (a) stampo in PDMS utilizzato sperimentalmente di circa 1 cm di diametro, la scala graduata misura 1 cm, (b) campione finale con stampa di pozzetti di idrogel allineati con gli elettrodi.

All’interno della well è stata versata la soluzione di agarosio ancora liquida (pochi istanti dopo il procedimento illustrato in 2.3.2). Utilizzando il micromanipolatore verticale lo stampo in silicone (precedentemente allineato) è stato pressato all’interno della well. Si è mantenuto lo stampo in posizione per 30 minuti. Al termine della solidificazione del idrogel si è sollevato lo stampo. Si è ottenuto il campione finale mostrato in figura 17(b) con un film di idrogel di $\sim 250 \mu m$.

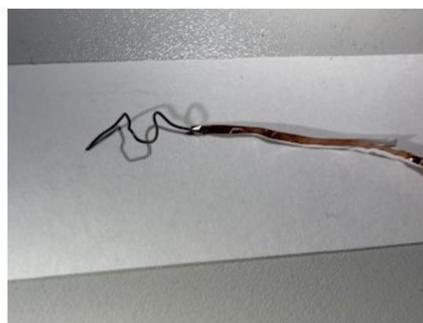
2.4 Metodi di caratterizzazione e acquisizione dati

Viene utilizzata EIS per la caratterizzazione delle proprietà fisiche del campione mentre per l'acquisizione dati di potenziale si utilizza SRET (Scanning Reference Electrode Technique). Vengono presentate individualmente di seguito.

EIS: Attraverso EIS è possibile riconoscere il comportamento circuitale della configurazione sperimentale studiata e di conseguenza analizzare le sue proprietà fisiche. Lo strumento utilizzato è il Lock In Amplifier della Zurich Instruments (MFLI) (figura 18(a)). Ad un elettrodo viene applicato un potenziale AC di frequenza f e di ampiezza $V_{rms} = 100\text{ mV}$. Si chiude il circuito elettrochimico con un filo di Ag/AgCl (figura 18(b)) immerso in soluzione e si misura la corrente AC del circuito variando la frequenza nel range $10 - 10^5\text{ Hz}$.



(a)



(b)

Figura 18: (a) Lock In Amplifier da Zurich Instruments, (b) filo di Ag/AgCl (parte grigia) usato come elettrodo di riferimento.

Grazie alla reazione chimica $AgCl \rightleftharpoons Ag^+ + Cl^-$ che avviene nella superficie del materiale non si hanno effetti capacitivi e quelli Faradaici sono trascurabili. Viene chiamato elettrodo di riferimento dal momento che non inserisce elementi circuitali al circuito equivalente. In questo modo sono stati caratterizzati gli elettrodi di PEDOT:PSS. L'interfaccia elettrochimica con sovrapposizione di film sottile di PEDOT:PSS può essere parametrizzata tramite un circuito elettrico. Ogni elemento del circuito è associato ad un comportamento fisico del sistema. Attraverso EIS con lo stesso sweep in frequenza si è caratterizzata la sonda, sottoposta al potenziale AC utilizzato per l'elettrodo. Infine, si è caratterizzata tramite EIS la configurazione usata per acquisizione di misure di potenziale: elettrodo e sonda; i parametri utilizzati sono i medesimi. Le caratterizzazioni ottenute sono illustrate nel capitolo successivo.

SRET: La tecnica consiste nell'acquisizione di misure di potenziale tramite la sonda nello spazio soprastante l'elettrodo. Utilizzando il Lock In Amplifier si manda un potenziale AC con $f = 5.77\text{ kHz}$ e ampiezza $V_{rms} = 100\text{ mV}$ nel circuito elettrochimico composto da elettrodo del MEA ed elettrodo di riferimento. La sonda è collegata ad un

ingresso ad alta impedenza ($1\text{ M}\Omega$) di MFLI per la misura del potenziale AC. Attraverso il set di micromanipolatori è possibile muovere la sonda ed acquisire misure di modulo e fase di potenziale elettrico nella posizione in cui si trova. Con il micromanipolatore dell'asse verticale si fissa la quota della sonda a $250\text{ }\mu\text{m}$ dall'elettrodo. Si mappa il potenziale su un piano orizzontale di lato $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ centrato sull'elettrodo monitorando i movimenti della sonda tramite il microscopio. Si riporta in figura 19 l'immagine del microforo della sonda utilizzata per SRET tramite ingrandimento 5x. La creazione della mappa ed i risultati ottenuti sono riportati nel capitolo successivo.

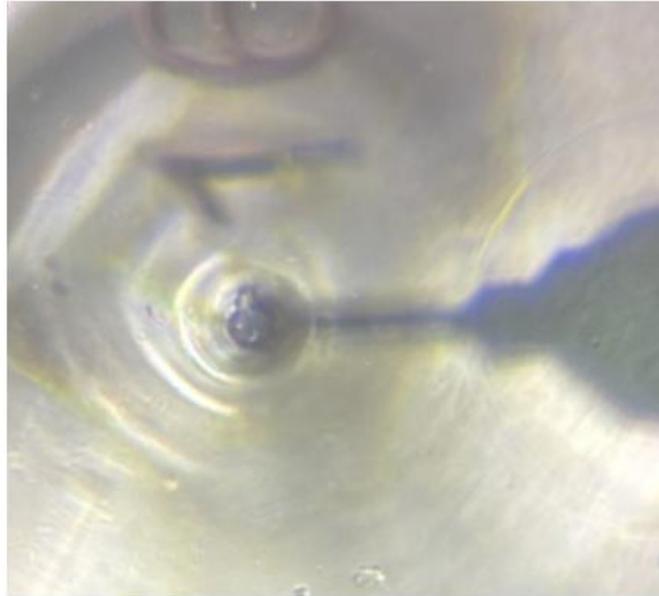


Figura 19: ingrandimento 5x raffigurante il microforo della sonda utilizzata per SRET sovrapposto all'elettrodo 16 del MEA di diametro $100\text{ }\mu\text{m}$

Capitolo 3

Risultati

In questo capitolo sono riportati i principali risultati ottenuti durante l'implementazione del sistema di misura del potenziale, i quali sono: spettroscopie di impedenza elettrochimica (EIS) degli elettrodi utilizzati e della sonda, calibrazione posizionale dello strumento di misura; sono riportate infine le mappe in ampiezza e fase del potenziale elettrico come risultato conclusivo del sistema di misura implementato.

3.1 Spettroscopie di Impedenza Elettrochimica

3.1.1 Sistema in soluzione elettrolitica

Sono state svolte EIS in tre configurazioni particolari per confermare il comportamento del sistema previsto in linea teorica (trattato nel paragrafo 1.4.1): la prima configurazione studiata è usando l'elettrodo 19 dell'array di microelettrodi e usando come elettrodo di riferimento quello di Ag/AgCl, la seconda configurazione studiata è usando la sonda e l'elettrodo di riferimento di Ag/AgCl e la terza è usando l'elettrodo 19 e la sonda. L'elettrodo 19 utilizzato ha raggio pari a $r = 50 \mu m$ e spessore pari a $z = 100 nm$. Nella figura 20 sono riportate le tre spettroscopie ottenute nelle configurazioni descritte precedentemente.

Tutte le spettroscopie mostrate hanno sull'asse verticale sinistro il modulo dell'impedenza in scala logaritmica, su quello verticale destro la fase in scala lineare e sull'asse orizzontale la frequenza in scala logaritmica. A causa di limiti strumentali si evidenzia che l'acquisizione ottenuta dopo i 10 kHz risulta essere influenzata da non idealità circuitali introdotte dal sistema di misura.

Il plot 20(a) mostra i valori di modulo e fase dell'impedenza nella configurazione elettrodo 19 – Ag/AgCl al variare della frequenza, il comportamento osservato è quello di un circuito resistenza – condensatore (RC) in serie. In scala log-log il modulo dell'impedenza decresce linearmente a basse frequenze, il plot tende poi a un valore costante aumentando la frequenza; la fase invece in scala semilogaritmica tende a un valore di $\varphi = 90^\circ$ a basse frequenze ed aumentando la frequenza decresce velocemente. Successivamente il plot 20(b) mostra modulo e fase dell'impedenza nella configurazione sonda - Ag/AgCl, in questo caso si nota il comportamento tipico di un circuito puramente resistivo, cioè fase nulla e impedenza costante in modulo in tutto l'intervallo di frequenze scelto; in questo caso è quello che ci si aspetta da una interfaccia di questo tipo in cui il foro micrometrico della sonda (diametro di $\sim 100 \mu m$) presenta una altissima resistenza al passaggio di cariche ioniche che domina il comportamento circuitale. Infine, il grafico 20(c) mostra la configurazione elettrodo 19 – sonda, si nota nuovamente un comportamento tipico di un circuito RC

con le stesse caratteristiche del 20(a) nella forma dei plot di modulo e di fase. I plot 20(a) e 20(c) mostrano differenze nei parametri circuitali quali resistenza (R) e costante di tempo ($\tau = RC$) mentre si osserva lo stesso valore di capacità (C). Si mostra in figura 21 l'estrazione di tali parametri tramite il fit al modulo dell'impedenza calcolata in circuito RC.

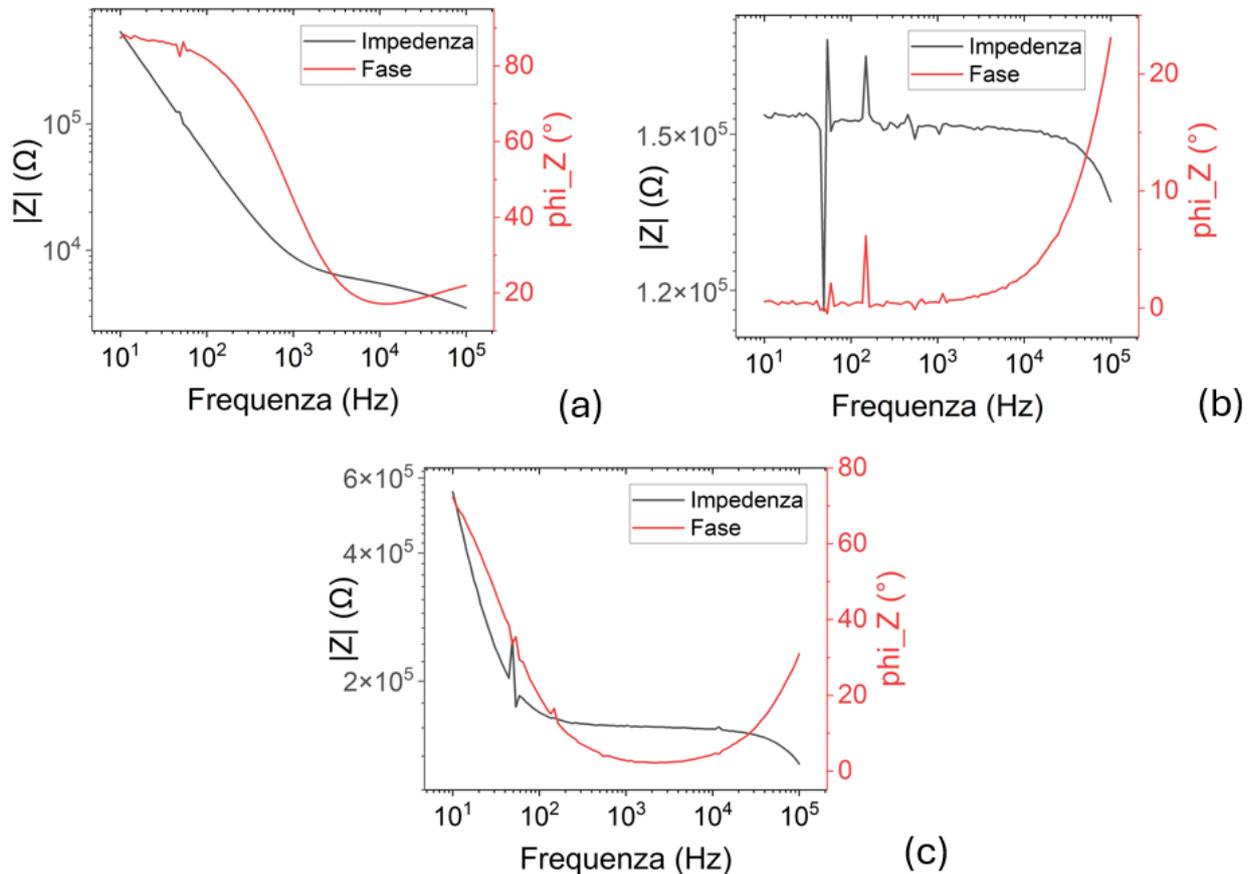


Figura 20: Plot di Bode in diverse configurazioni del set-up sperimentale, sono rappresentate con frequenza e modulo di impedenza in scala logaritmica e fase in scala lineare; (a) EIS in configurazione elettrodo 19 - elettrodo di Ag/AgCl, (b) EIS in configurazione sonda - elettrodo di Ag/AgCl, (c) EIS in configurazione elettrodo 19 - sonda.

In entrambe le configurazioni è presente l'elettrodo 19 rivestito da PEDOT: PSS, questo è l'elemento circuitale che viene approssimato come condensatore nel circuito RC equivalente; perciò, il valore di capacità risulta lo stesso. È possibile verificare il valore di capacità volumetrica di PEDOT: PSS utilizzando la capacità estratta ed essendo note le dimensioni dell'elettrodo utilizzato; questa risulta $C_v = (37.54 \pm 0.06) F/cm^3$ compatibile con l'intervallo fra 25 e 60 F/cm^3 atteso [25]. Il valore di resistenza appare invece due ordini di grandezza maggiore nella configurazione con la sonda, infatti, nella configurazione 20(a) la resistenza è data solo dalla soluzione elettrolitica mentre nella 20(c) è data dalla soluzione elettrolitica sommata a quella del foro micrometrico della sonda. Il foro ha una resistenza molto maggiore rispetto a quella della soluzione e questo causa un valore di resistenza maggiore. La costante di tempo risulta un ordine di

grandezza maggiore nella configurazione in cui è presente la sonda data la sua dipendenza della resistenza e dalla capacità.

Osservando i plot in figura 20 si nota rumore a 50 Hz per ogni configurazione, nel plot 20(b) invece il rumore persiste fino a 1 kHz. Si ricorda inoltre che i risultati oltre i 10 kHz non sono stati inclusi nel fit per le considerazioni precedentemente descritte. Per garantire quindi un buon rapporto segnale rumore rimanendo nell'intervallo di frequenze accettabile si è scelto $f = 5.77 \text{ kHz}$ come frequenza di acquisizione per la successiva mappa di potenziale elettrico.

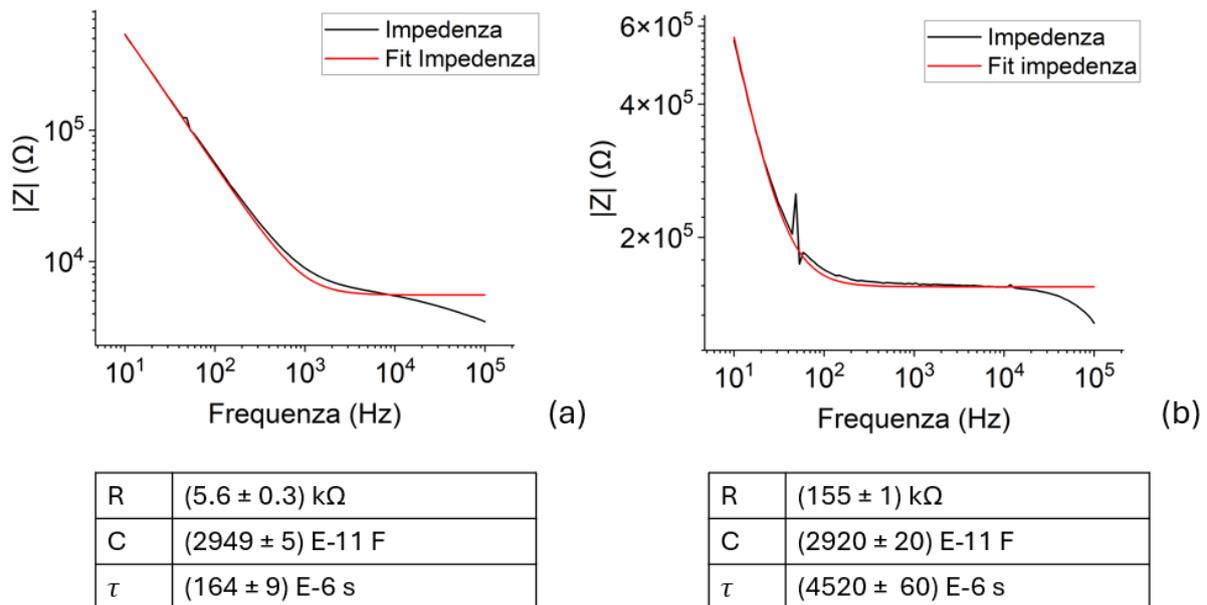


Figura 21: Fit al modulo dell'impedenza in due diverse configurazioni sperimentali, si ha frequenza e impedenza in scala logaritmica, sono riportate nelle tabelle sottostanti i valori di capacità C, resistenza R e costante di tempo τ estratti dal fit e la funzione usata: (a) fit della configurazione elettrodo 19 - elettrodo di Ag/AgCl, (b) fit della configurazione elettrodo 19 - sonda.

3.1.2 Sistema in soluzione elettrolitica con stampa di pozzetti di Idrogel

La procedura sperimentale di spettroscopia di impedenza elettrochimica descritta nel paragrafo 3.1.1 è stata ripetuta sul sistema precedente sul quale sono stati stampati pozzetti di idrogel allineati con gli elettrodi del campione sottostanti. Le configurazioni sperimentali studiate sono analoghe alle precedenti con la differenza che in questo studio è stato scelto l'elettrodo numero 3. Si è quindi fatta EIS nelle configurazioni: elettrodo 3 – elettrodo di Ag/AgCl, sonda – elettrodo di Ag/AgCl ed elettrodo 3 – sonda; la figura 22 riporta le spettroscopie ottenute. Le condizioni di accettabilità e le dimensioni dell'elettrodo rimangono le stesse del paragrafo 3.1.1. Il grafico 22(a) rappresenta la EIS fra elettrodo 3 ed elettrodo di riferimento di Ag/AgCl, si nota un comportamento che ricorda qualitativamente quello di un circuito RC ma non soddisfa pienamente i requisiti quali fase che tende a un valore di $\varphi = 90^\circ$ a basse frequenze e modulo dell'impedenza che presenta un plateau ad alte frequenze.

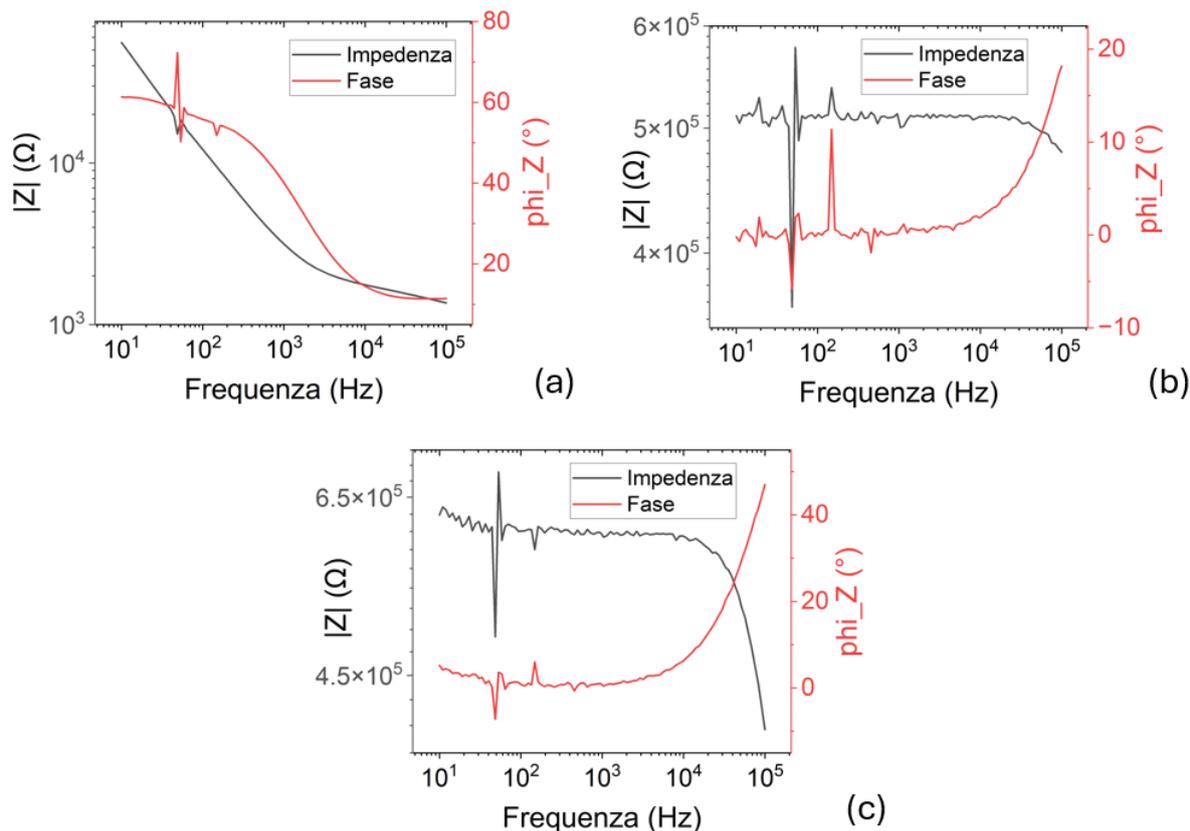


Figura 22: Plot di Bode in diverse configurazioni del set-up sperimentale, sono rappresentate con frequenza e modulo di impedenza in scala logaritmica e fase in scala lineare; (a) EIS in configurazione elettrodo 3 - elettrodo di Ag/AgCl, (b) EIS in configurazione sonda - elettrodo di Ag/AgCl, (c) EIS in configurazione elettrodo 3 - sonda.

Procedendo al 22(b) in cui si mostra EIS di Sonda - Ag/AgCl si nota lo stesso comportamento di un circuito resistivo equivalente (come già visto nel grafico 22(b)) con fase nulla e modulo di impedenza costante. Infine, nel grafico 22(c) che rappresenta l'EIS in configurazione elettrodo 3 - sonda si nota nuovamente un comportamento tipico di un circuito puramente resistivo con le stesse caratteristiche del precedente. Questa configurazione ha un comportamento diverso rispetto a quella mostrata in figura 20(c), ci si aspetterebbe lo stesso comportamento dal momento che in entrambe le configurazioni si ha la sonda e gli elettrodi utilizzati hanno la stessa dimensione. Il diverso comportamento risiede nel fatto che è stata utilizzata una nuova sonda per queste spettroscopie, questa dotata di un foro di dimensioni minori e quindi di resistenza più alta (~ 500 k Ω) rispetto alla configurazione 20(c) (~ 150 k Ω), pur rimanendo nello stesso ordine di grandezza. Come conseguenza si ha l'aumento della costante di tempo τ per la configurazione 22(c). Questo plot quindi, rispetto al 20(c), ha il tratto decrescente spostato verso le basse frequenze. A causa dell'intervallo di frequenze di acquisizione scelto viene mostrato solo parzialmente.

3.2 Calibrazione Strumentale

Il sistema di misura di potenziale è stato calibrato utilizzando l'insieme di micromanipolatori che permettono il movimento della sonda lungo i tre assi cartesiani, questa sarà utilizzata in seguito per acquisire misure di potenziale elettrico; la calibrazione è risultata fondamentale per verificare qualitativamente la forma del modulo e della fase del potenziale in funzione della distanza fra elettrodo e sonda, quindi di confermare il funzionamento dell'apparato.

Si sono acquisite misure di potenziale alla frequenza $f = 5.77 \text{ kHz}$ nella configurazione elettrodo 19 - sonda, al circuito è stata data in input una differenza di potenziale $V_{rms} = 100 \text{ mV}$. Si è usato il micromanipolatore governante il moto della sonda lungo l'asse verticale con risoluzione di $10 \text{ }\mu\text{m}$ per muovere la sonda ed acquisire valori di modulo e fase in punti diversi dello spazio. Sono stati acquisiti undici valori di modulo e fase a distanza di $50 \text{ }\mu\text{m}$. Si è partiti da una posizione di contatto fra la sonda e l'elettrodo 19, si è successivamente alzata la sonda fino ad una altezza di $250 \text{ }\mu\text{m}$ per poi scendere nuovamente nella posizione di contatto. La figura 23 mostra i valori di modulo e fase ottenuti in questa acquisizione.

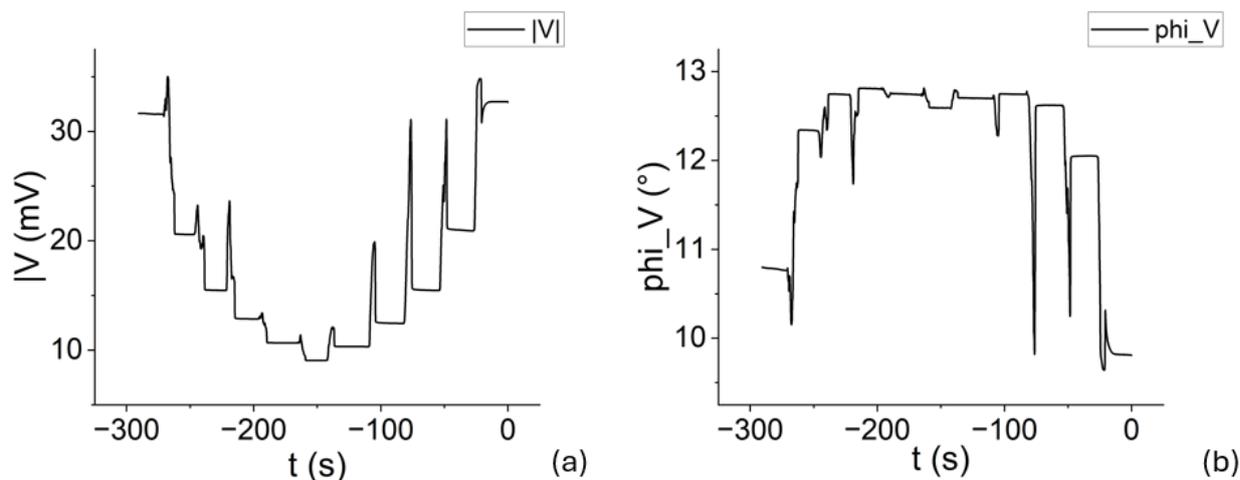


Figura 23: plot di acquisizione dati di modulo (a) e di fase (b) di potenziale elettrico, sull'asse delle ascisse è riportato il tempo mentre sulle ordinate la grandezza acquisita. L'acquisizione è stata fatta ad una frequenza di $f = 5.77 \text{ kHz}$ con la sonda fissata esattamente sopra l'elettrodo muovendola lungo l'asse verticale.

Lo strumento utilizzato (Lock In Amplifier) permette di acquisire misure di potenziale AC in funzione del tempo, l'acquisizione dati è stata quindi svolta muovendosi con step di $50 \text{ }\mu\text{m}$ lungo l'asse verticale e si è mantenuta la posizione fino a quando si è ottenuto un valore stabile, solo successivamente la sonda è stata collocata nella nuova posizione. Così facendo si ottiene un plot a gradini come mostrato in figura 23 in cui in (a) si mostra il modulo del potenziale mentre in (b) la fase. Da ogni plateau del plot si è calcolato il valore medio di modulo e fase e le loro deviazioni standard; in figura 24 si mostra il plot ottenuto con i valori medi calcolati in funzione della coordinata verticale.

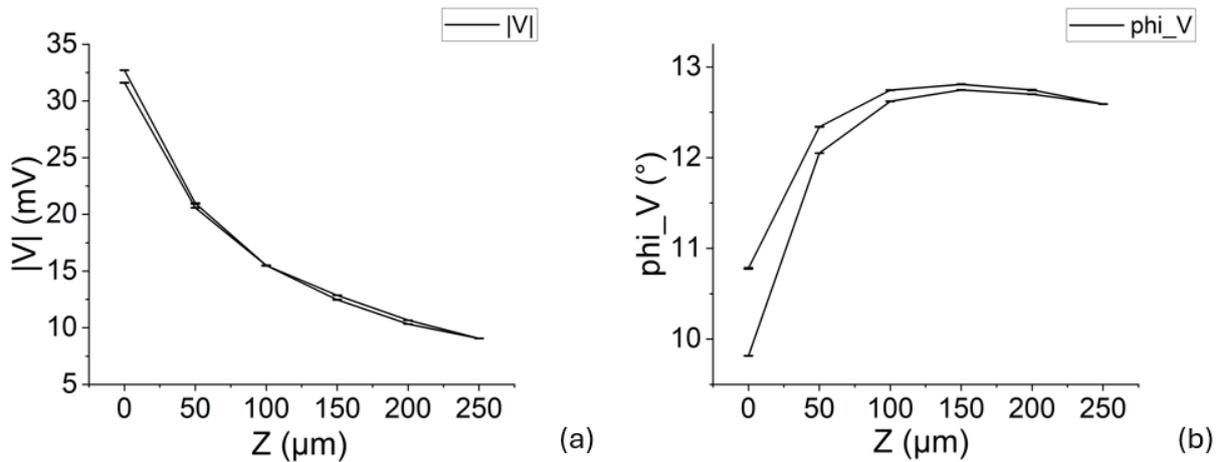


Figura 24: plot di modulo (a) e fase (b) del potenziale in funzione della quota Z , i punti riportati sono ottenuti calcolando i valori medi del plot in figura 4, sono riportate le deviazioni standard per ogni punto come barre di errore. L'acquisizione è stata fatta ad una frequenza di $f = 5.77$ kHz con la sonda fissata esattamente sopra l'elettrodo.

Dal plot in figura 24 si nota una evidente simmetria nelle due fasi di acquisizione (allontanamento ed avvicinamento) nonostante la manualità dell'acquisizione. Nel plot 24(a) si nota un massimo del modulo del potenziale in posizione di contatto, allontanandosi dall'elettrodo diminuisce di conseguenza il valore del modulo che raggiunge il minimo alla distanza massima. In 24(b) si nota invece un minimo della fase del potenziale nella posizione di contatto, si ha poi una crescita del valore allontanandosi dall'elettrodo.

La forma del modulo di potenziale attesa la si ottiene risolvendo l'equazione di Laplace nell'elettrolita. La soluzione è chiamata *Spreading Potential* ovvero il potenziale distribuito nello spazio a causa della configurazione del sistema e della soluzione elettrolitica in cui è immerso. Si può modellizzare l'elettrodo come un disco conduttore sottoposto a un potenziale AC. L'elettrodo è posizionato all'interno di un piano isolante (il substrato di vetro del dispositivo in posizione $z = 0$), ricoperto da polimero conduttivo ed immerso in un mezzo elettrolitico. È quindi possibile ricavare la forma integrale del potenziale all'interno della soluzione; la derivazione è riportata in appendice. La forma del potenziale è dunque:

$$\phi(\rho, z) = e^{i\phi_0} \frac{2V_0}{\pi} \int_0^\infty \frac{\sin(t)}{t} J_0\left(\frac{\rho}{a}t\right) e^{-\left(\frac{z}{a}\right)t} \frac{\beta a}{t + \beta a} dt \quad (5)$$

In cui si indica V_0 l'ampiezza del potenziale AC, a il raggio dell'elettrodo, ρ la coordinata radiale, z la coordinata verticale e J_0 funzione di Bessel di ordine zero e β il rapporto fra ammettenza del film di PEDOT:PSS e conduttività dell'elettrolita. In figura 25 si mostra la soluzione esatta dell'equazione messa a confronto della soluzione approssimata per grandi distanze; questa la si ottiene considerando l'elettrodo come una sorgente

puntiforme in un semispazio. L'equazione è la seguente con derivazione riportata in appendice.

$$\phi(r) = \frac{2 V_0 a}{\pi r} \quad (6)$$

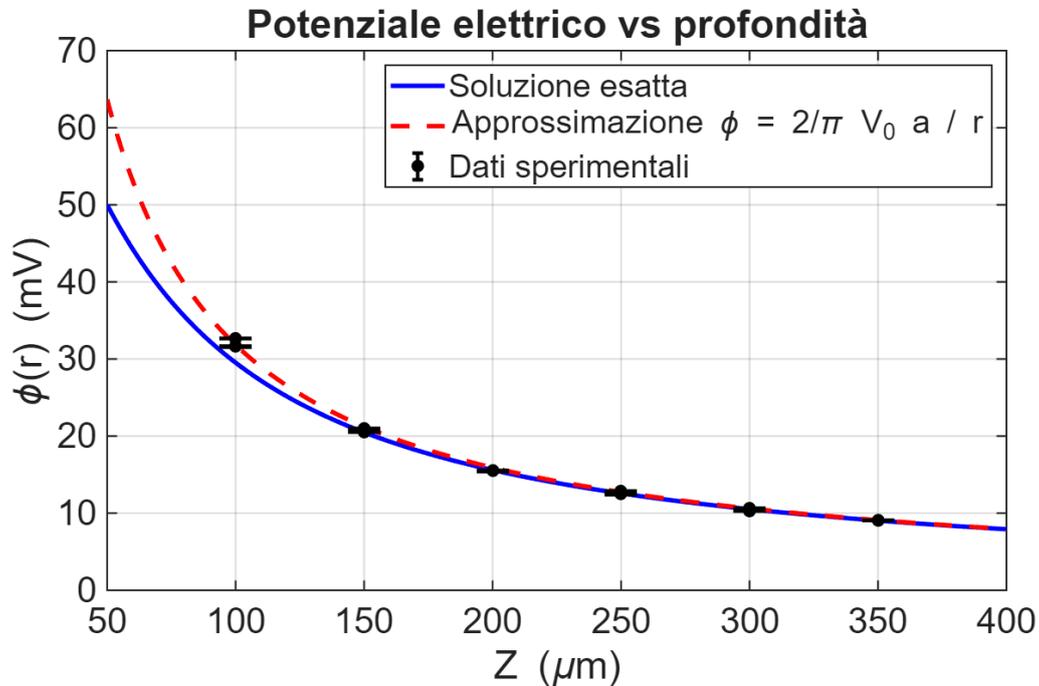


Figura 25: potenziale elettrico in soluzione in funzione della quota Z, in blu è presentata la soluzione esatta dell'equazione di Laplace, in rosso tratteggiato è presentata la soluzione approssimata valida a distanza, in nero sono presentati i punti sperimentali con barre di errore. I punti sono inseriti nel plot con uno shift posizionale di 100 μm in allontanamento dall'elettrodo.

Il plot rosso tratteggiato mostra la soluzione approssimata calcolata come mostrato nella legenda, il plot blu mostra la soluzione esatta. Sulle ascisse si trova la coordinata verticale. Il calcolo è eseguito usando i parametri del sistema quindi $V_0 = 100 \text{ mV}$ ed $a = 50 \text{ μm}$. Si nota da subito la convergenza dei modelli a grande distanza, prova che il modello approssimato è valido nel suo limite. Confrontando invece il plot del modulo di potenziale ottenuto sperimentalmente con quello teorico emergono differenze. I valori di potenziale teorico dalla distanza di 100 μm a 350 μm coincidono con i valori di modulo di potenziale sperimentale nel range fra 0 – 250 μm. Questo potrebbe essere sintomo che l'acquisizione non sia partita da una posizione di contatto ma da una quota maggiore a causa delle dimensioni "finite" della sonda. Questa, infatti, misura potenziale dall'estremità del filo inserito nella pipetta. Il filo non corrisponde esattamente al fondo del puntale in vetro (a causa delle sue dimensioni) ma si trova poco più in alto. Questa ipotesi (ragionevole dato il set-up sperimentale) conferma la convergenza fra l'andamento del modulo di potenziale sperimentale e quello teoricamente previsto. In figura 25 sono riportati in nero i punti sperimentali della figura 24(a) con lo shift posizionale di 100 μm ipotizzato, è evidente l'accordo ottenuto.

3.3 Mappe di Potenziale

In questo paragrafo sono riportate le mappe in modulo e in fase di potenziale elettrico acquisite in entrambi i set up sperimentali i quali sono l'elettrodo 19 in soluzione elettrolitica e l'elettrodo 3 in soluzione elettrolitica con stampa di pozzetti di Idrogel centrati sugli elettrodi.

Le mappe sono state acquisite nei pressi dell'elettrodo funzionante ottenendo valori di modulo e fase ad una quota fissata. L'acquisizione dati è stata eseguita suddividendo il piano XY orizzontale in una griglia da 121 punti. Si è fissata la posizione dell'elettrodo in uso nell'origine della griglia, gli assi X e Y sono stati suddivisi in undici punti ciascuno distanziati di $\Delta X = \Delta Y = 100 \mu m$. La quota dell'asse Z (asse verticale) è stata fissata a $Z = 250 \mu m$ in modo da non urtare contro la stampa di idrogel. Questa suddivisione dello spazio ha permesso di agire in modo sistematico acquisendo i valori di modulo e fase in ogni punto individuato dalla griglia totalizzando un totale di 121 misure di ogni grandezza. La differenza di potenziale data in input al circuito risulta $V_{rms} = 100 mV$, la frequenza di acquisizione usata risulta essere $f = 5.77 kHz$.

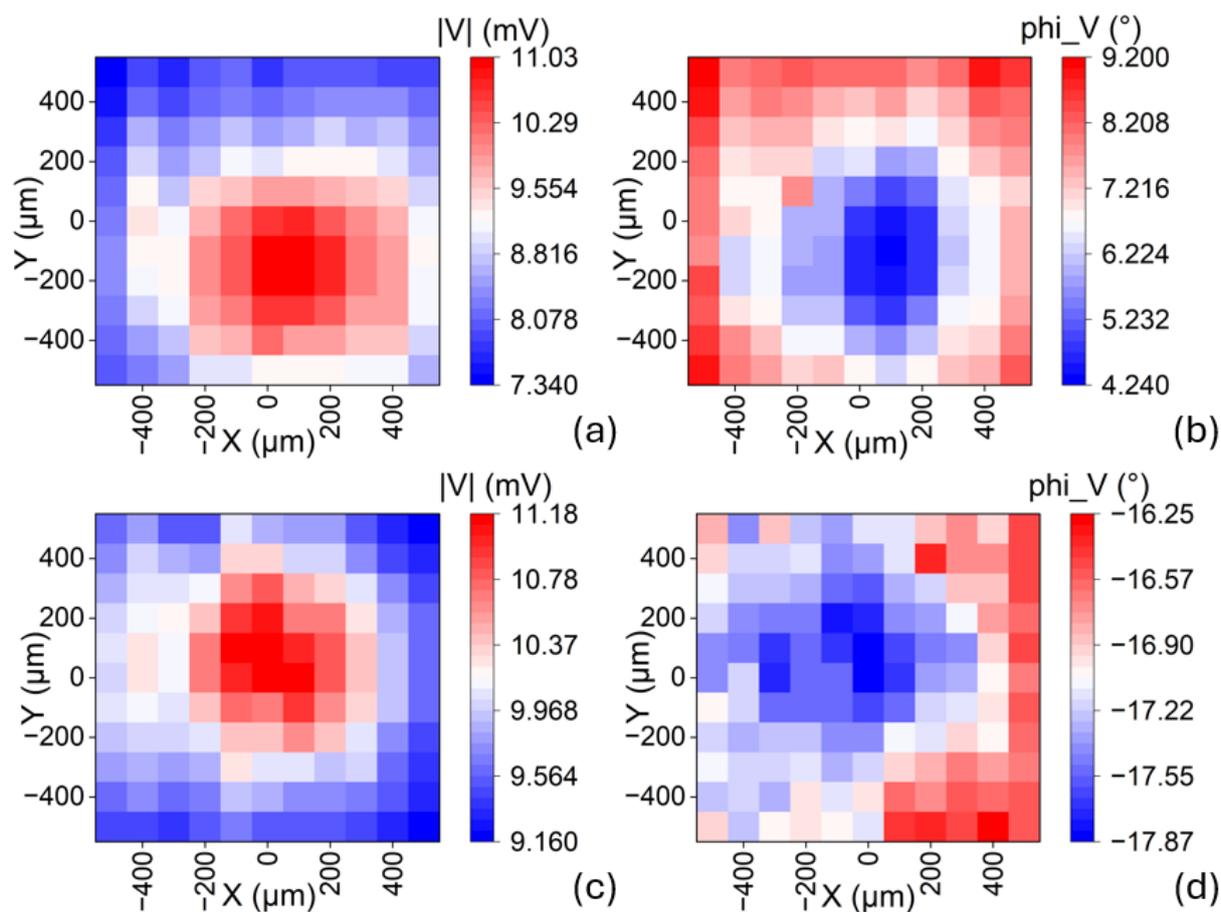


Figura 26: mappe in modulo e in fase di potenziale elettrico, nella prima riga si trovano (a) mappa in modulo e (b) mappa in fase di elettrodo 19 in soluzione elettrolitica, nella seconda riga si trovano (c) mappa in modulo e (d) mappa in fase di elettrodo 3 in soluzione elettrolitica con stampa di pozzetti di idrogel. L'acquisizione è stata fatta ad una frequenza di $f = 5.77 kHz$ con la sonda fissata a $z = 250 \mu m$.

I punti dello spazio in cui sono stati acquisiti i dati sono stati raggiunti dalla sonda muovendola con il set di micromanipolatori dato in dotazione al set-up sperimentale. Si è fissato il valore sull'asse orizzontale delle X e con il micromanipolatore che permette il moto sull'asse orizzontale delle Y si sono acquisiti i valori lungo gli undici punti dell'asse, successivamente si fissa un nuovo valore sull'asse delle X e si procede in modo analogo acquisendo infine tutti i 121 punti del piano. I valori riportati sulle mappe sono stati ottenuti come illustrato nel paragrafo 3.2. Si riportano in figura 26 le mappe ottenute.

Le mappe (a) e (b) presentano i valori di modulo e fase nel sistema di elettrodo 19 in soluzione elettrolitica mentre le mappe (c) e (d) presentano quelli in configurazione elettrodo 3 in soluzione elettrolitica con stampa di pozzetti di idrogel. Si notifica che per favorire il confronto le mappe (a) e (b) riportano i valori speculari in X rispetto all'acquisizione originale.

Le mappe in figura 26 sono state interpolate linearmente ottenendo una rappresentazione qualitativamente più omogenea dei risultati sperimentali, vengono riportate in figura 27.

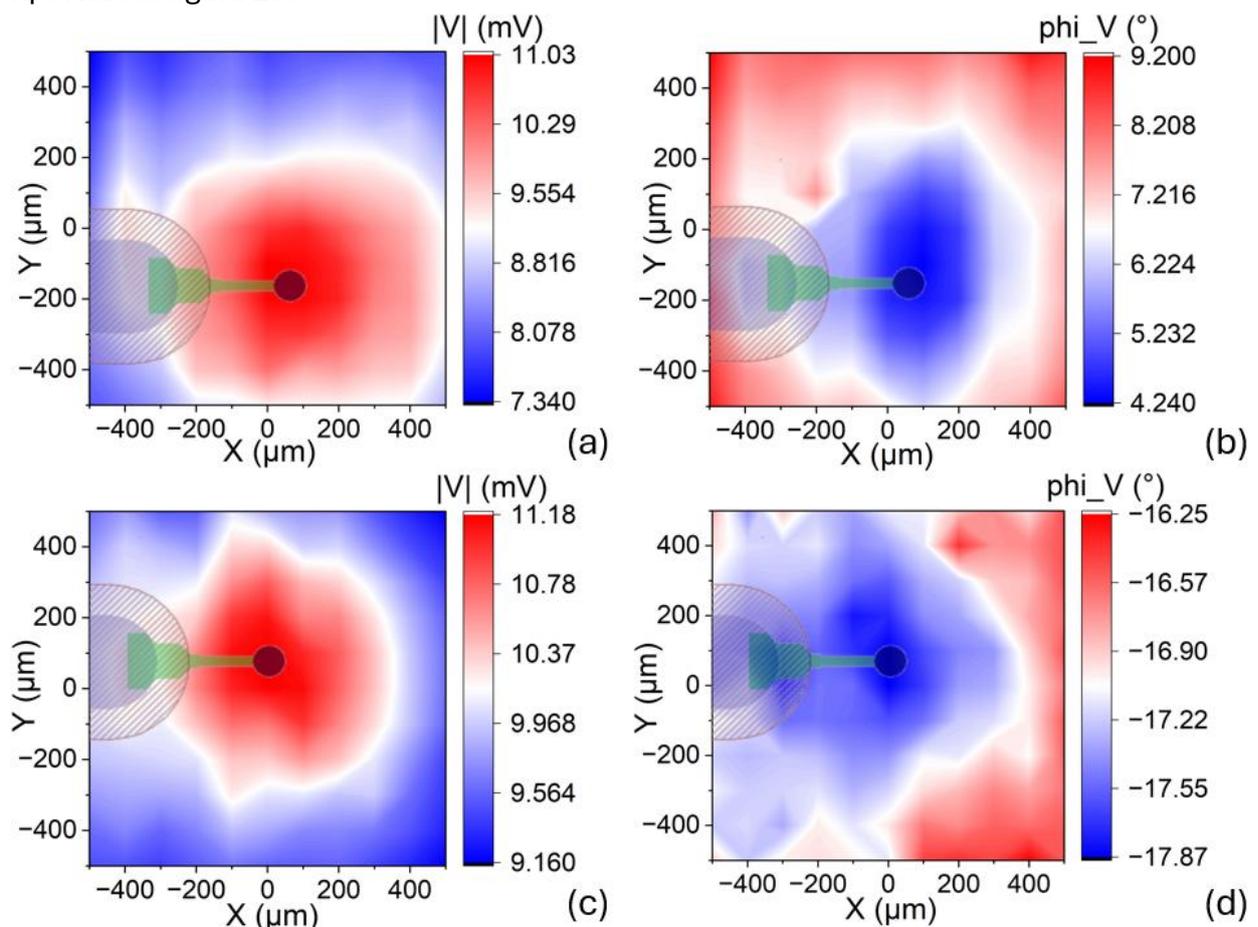


Figura 27: mappe in modulo e in fase di potenziale elettrico da interpolazione da dati discreti, sono riportate le posizioni effettive degli elettrodi utilizzati (con diametro $100 \mu\text{m}$). Nella prima riga si trovano (a) mappa in modulo e (b) mappa in fase di elettrodo 19 in soluzione elettrolitica, nella seconda riga si trovano (c) mappa in modulo e (d) mappa in fase di elettrodo 3 in soluzione elettrolitica con stampa di pozzetti di idrogel. L'acquisizione è stata fatta ad una frequenza di $f = 5.77 \text{ kHz}$ con la sonda fissata a $z = 250 \mu\text{m}$.

Per rendere più chiara la comprensione delle mappe è presentata nella figura 27 una ricostruzione della posizione effettiva dell'elettrodo al momento dell'acquisizione. L'elettrodo non risulta centrato nelle mappe presentate, questo è dovuto a un difetto del sistema di misura che ha portato una deviazione sistematica della posizione della sonda durante le acquisizioni. Un secondo aspetto che emerge dalle mappe di potenziale sono zone con valori di modulo insolitamente alti (o bassi se si fa riferimento alla fase); questa zona anomala la si identifica a destra dell'elettrodo nella configurazione senza Idrogel (a) (b) e a sinistra nella configurazione con Idrogel (c) (d). L'alta conducibilità è dovuta allo scarso schermaggio delle feedlines in oro a causa di una delaminazione di photoresist negativo a sua volta causata dall'utilizzo ripetuto del campione.

La prima differenza che emerge è invece la forma del modulo di potenziale che appare più piccata e confinata nella configurazione con pozzetti di idrogel rispetto a quella senza, in linea con quello previsto teoricamente. Si nota come l'acquisizione senza pozzetti di idrogel (a) (b) risulta più decentrata di quella con la stampa di pozzetti. Questo significa che durante l'acquisizione la sonda ha assunto posizioni più distanti dall'elettrodo 19 (a) (b) rispetto all'acquisizione con elettrodo 3 (c) (d). Sono stati quindi acquisiti valori in modulo più bassi (in fase più alti) a causa della distanza fra la sonda e l'elettrodo, si è dunque creata una diversa scala cromatica per i valori di modulo nelle due configurazioni sperimentali.

Il potenziale misurato, come descritto precedentemente, va interpretato come soluzione dell'equazione di Laplace ed in quanto tale è stata simulata la creazione della mappa di modulo di potenziale risolvendo l'equazione (5) con i parametri sperimentali. In figura 28 è mostrato il confronto fra mappa generata (a) e mappa ottenuta sperimentalmente (b).

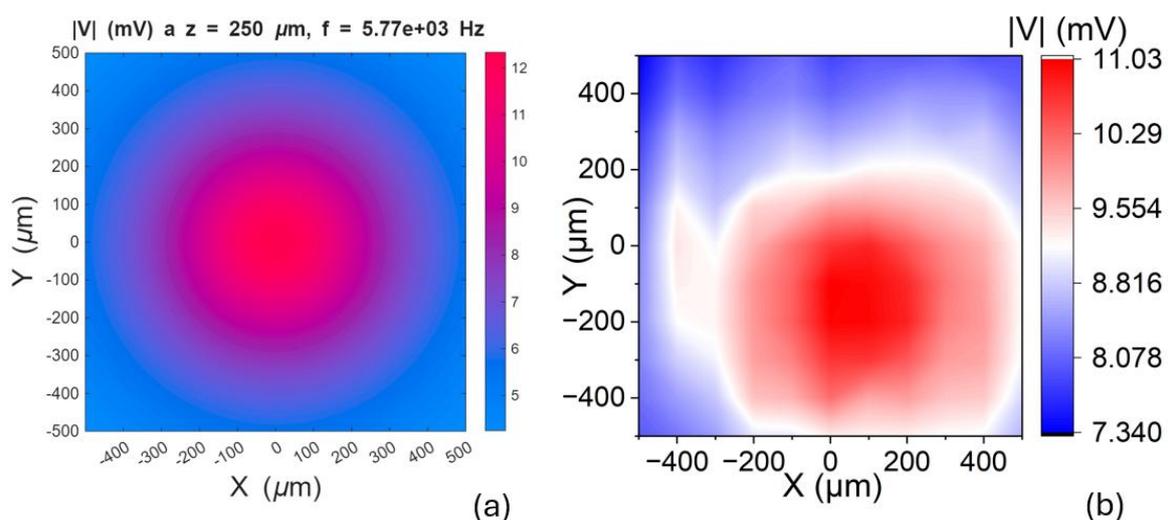


Figura 28: (a) mappa di modulo di potenziale generata risolvendo l'equazione di Laplace, risoluzione è stata effettuata con l'utilizzo di parametri sperimentalmente utilizzati: $Z = 250 \mu\text{m}$, $V_0 = 100 \text{ mV}$, $a = 50 \mu\text{m}$. (b) mappa di modulo di potenziale ottenuta sperimentalmente in assenza di idrogel.

La previsione teorica prevede una caduta di potenziale leggermente più rapida allontanandosi dall'elettrodo rispetto a quella sperimentalmente ottenuta. Si nota infatti che si prevede teoricamente un valore di 7 – 8 mV ad una distanza compresa fra i 200 e 300 μm mentre questo valore di modulo di potenziale lo si ottiene sperimentalmente a distanza di oltre 500 μm . I valori registrati sperimentalmente come massimi valori del modulo sono invece compatibili con la teoria. La previsione teorica della mappa con idrogel che andrebbe confrontata con quella sperimentale è anch'essa risolvibile numericamente; il livello di complessità aumenta ed esula dallo scopo del lavoro.

3.4 Discussione e Conclusioni

Le mappe ottenute in modulo e in fase presentano il comportamento atteso in modo qualitativo: valori di modulo piccati nella regione dell'elettrodo e diminuzione del modulo di potenziale in regioni limitrofe. Con il modello teorico presentato è presente un discreto accordo quantitativo, il valore massimo di modulo sperimentale è compatibile con la previsione teorica. Non risultano compatibili invece i valori di modulo a distanze superiori di $250\ \mu\text{m}$ (ma l'accordo qualitativo rimane valido). Emergono alcuni difetti nella acquisizione ottenuta. Il primo è una deviazione sistematica della posizione della sonda, questo ha causato il decentramento delle mappe di modulo e fase (in particolar modo nella configurazione senza pozzetti di idrogel). Il motivo risiede in un difetto strumentale, in parte corretto fra le due acquisizioni (con e senza idrogel) ma sempre presente. Il secondo sono regioni di conducibilità anomala, la causa possibile di questo è la delaminazione di photoresist negativa causata dall'usura del campione. Questo porta a uno schermaggio della feedline non ottimale e di conseguenza a una conducibilità elevata. In conclusione, il comportamento indagato di confinamento di potenziale da parte di pozzetti di idrogel è stato verificato: la mappa in presenza di pozzetti presenta alti valori in modulo di potenziale in una regione più ristretta dello spazio rispetto alla mappa presentata senza idrogel. Dato il riscontro positivo ottenuto, il lavoro può essere utilizzato come punto di partenza per un nuovo dispositivo di monitoraggio in tempo reale di aggregati cellulari 3D. Il set-up presentato rappresenta il primo step per la verifica dell'ipotesi di confinamento di potenziale da parte di idrogel. Risultati più ottimali possono essere ottenuti tramite l'automazione del sistema di acquisizione e l'aumento della risoluzione spaziale delle misure.

Appendice

Risoluzione dell'equazione di Laplace in mezzo elettrolitico

Si consideri il semispazio $z > 0$ occupato da un conduttore ionico omogeneo di conducibilità σ . Nel piano $z = 0$ viene posto un sottile elettrodo circolare di raggio a , centrato nell'origine. La faccia dell'elettrodo (un disco definito in coordinate cilindriche $(\rho, \theta, 0)$ con coordinata radiale $0 \leq \rho \leq a$) viene attraversata da una differenza di potenziale AC a basso voltaggio $V(t) = \Re\{V_0 e^{j(\omega t + \varphi_0)}\}$. La faccia dell'elettrodo è ricoperta da un sottile film di OMIEC. Il resto del piano $z = 0$ è isolante (nessun flusso di corrente normale). Si cerca quindi la distribuzione stazionaria del potenziale $\phi(\rho, z)$ che soddisfi l'equazione di Laplace (dal momento che la densità di carica nel mezzo è nulla):

$$\nabla^2 \hat{\phi} = 0 \quad \text{con} \quad z > 0 \quad (1)$$

Si definisce la densità di corrente normale come $J_n = -\sigma \partial_z \hat{\phi}$ con σ la *conduttività dell'elettrolita (S/m)*.

Un sottile film di OMIEC di spessore t con capacità volumetrica C_v ha una ammettenza pari a

$$Y_s(\omega) = G_s + i\omega C_A \quad \text{con} \quad C_A = C_v t \quad (2)$$

G_s rappresenta il contributo conduttivo (in fase) dell'ammettenza. Nel caso affrontato sperimentalmente G_s è trascurabile e l'interfaccia viene considerata unicamente come capacitiva.

La condizione mista (di Robin) al contorno sul disco è:

$$\sigma \partial_z \hat{\phi}(\rho, 0^+) + Y_s \hat{\phi}(\rho, 0) = Y_s V_0 e^{i\varphi_0} \quad \text{per} \quad \rho < a \quad (3)$$

Mentre si ha la condizione di nessun flusso all'esterno:

$$\partial_z \hat{\phi}(\rho, 0^+) = 0 \quad \text{per} \quad \rho > a \quad (4)$$

Risolvendo il problema con le trasformate di Hankel si arriva all'ampiezza spettrale

$$A(k) = \frac{2V_0}{\pi} \frac{\beta}{k + \beta} \frac{\sin(ka)}{k} \quad \text{con} \quad \beta = \frac{Y_s}{\sigma} \quad (5)$$

E al fasore del potenziale

$$\phi(\rho, z) = \int_0^\infty A(k) J_0(k\rho) e^{-kz} dk \quad (6)$$

Il comportamento del sistema è governato dal parametro βa :

- $\beta a \ll 1$: l'interfaccia è quasi isolante (il flusso è fissato a ~ 0), si ha una piccola ampiezza di potenziale e alto ritardo in fase
- $\beta a \sim 1$: regime misto, si ha una diminuzione dell'ampiezza e un ritardo di fase non trascurabile
- $\beta a \gg 1$: l'impedenza è trascurabile, l'ampiezza si avvicina all'approssimazione di campo lontano (riportata di seguito) e la fase è circa uniforme.

Data l'alta frequenza di acquisizione il sistema si ritrova nel terzo caso. Si ha quindi una alta ammettenza e una bassa impedenza, che diventa trascurabile. Grazie all'alta frequenza del potenziale AC in input lo screening ionico non avviene, di conseguenza il double layer non si carica mai completamente. Passa quindi corrente di spostamento all'interfaccia elettrodo elettrolita e questa si comporta come corto circuito.

Il potenziale AC ad alte frequenze ha, quindi, le stesse conseguenze nel sistema di un potenziale DC applicato all'elettrodo senza film di OMIEC. È quindi possibile ricondurre il sistema ad un caso "statico" con condizioni al contorno semplificate.

Per il potenziale AC si ha un potenziale della forma

$$\hat{\phi}(\rho, z) = e^{i\phi_0} \frac{2V_0}{\pi} \int_0^\infty \frac{\sin(t)}{t} J_0\left(\frac{\rho}{a}t\right) e^{-\left(\frac{z}{a}\right)t} \frac{\beta a}{t+\beta a} dt \quad \text{con } t = ka \quad (7)$$

Se si impone $k = t/a$ si ottiene

$$\hat{\phi}(\rho, z) = e^{i\phi_0} \frac{2V_0}{\pi} \int_0^\infty \frac{\sin(ka)}{k} J_0(k\rho) e^{-kz} \frac{\beta a}{ka+\beta a} dk \quad (8)$$

Mentre per il potenziale DC, ottenuto anch'esso attraverso trasformate di Hankel, si ha

$$\phi(\rho, z) = \frac{2V_0}{\pi} \int_0^\infty \frac{\sin(ka)}{k} J_0(k\rho) e^{-kz} dk \quad (9)$$

L'unica differenza fra i 2 è il termine $\frac{\beta}{k+\beta}$. Se si impone la condizione $\beta \gg 1$ si ottiene

$$\hat{\phi}(\rho, z) = \phi(\rho, z).$$

Sotto queste condizioni anche la condizione a contorno di Robin (3) viene semplificata.

Essendo valido l'integrale

$$\int_0^\infty \frac{\sin(ka)}{k} J_0(k\rho) dk = \frac{\pi}{2} \quad \text{con } 0 \leq \rho < a \quad (10)$$

L'equazione (3) si riduce a

$$\hat{\phi}(\rho, z) = \phi(\rho, z) = V_0 \quad (11)$$

Ci si è ricondotti alla condizione a contorno per il caso DC in cui sulla superficie dell'elettrodo si ha un potenziale fisso.

Trattiamo di seguito l'approssimazione per campo lontano. A grande distanza dal disco ($r = \sqrt{\rho^2 + z^2} \gg a$), l'elettrodo si comporta come una sorgente puntiforme di corrente nel semispazio conduttore. La corrente si diffonde sulla semisfera di area $2\pi r^2$ quindi la densità di corrente radiale è $J_r \approx I/2\pi r^2$, il campo elettrico radiale è dunque $E_r = J_r/\sigma$. Integrando il campo si ottiene il potenziale che decade come

$$\phi(r) \approx \frac{2V_0 a}{\pi r} \quad (12)$$

Bibliografia

- [1] M. Kapałczyńska *et al.*, «2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures», *Arch. Med. Sci. AMS*, vol. 14, fasc. 4, pp. 910–919, giu. 2018, doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [2] N. T. Elliott e F. Yuan, «A Review of Three-Dimensional *In Vitro* Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies», *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, fasc. 1, pp. 59–74, gen. 2011, doi: 10.1002/jps.22257.
- [3] X. Dou, P. Li, e H. Schönherr, «Three-Dimensional Microstructured Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Platform for the Controlled Formation of Multicellular Cell Spheroids», *Biomacromolecules*, vol. 19, fasc. 1, pp. 158–166, gen. 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.7b01345.
- [4] J. Walker-Daniels, «Live Cell Imaging Methods Review», *Mater. Methods*, vol. 2, lug. 2012, doi: 10.13070/mm.en.2.124.
- [5] R. Alford *et al.*, «Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review», *Mol. Imaging*, vol. 8, fasc. 6, pp. 341–354, dic. 2009.
- [6] Y. Xu, X. Xie, Y. Duan, L. Wang, Z. Cheng, e J. Cheng, «A review of impedance measurements of whole cells», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, pp. 824–836, mar. 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.027.
- [7] I. Giaever e C. R. Keese, «Micromotion of mammalian cells measured electrically», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, fasc. 17, pp. 7896–7900, set. 1991, doi: 10.1073/pnas.88.17.7896.
- [8] I. O. K' Owino e O. A. Sadik, «Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring», *Electroanalysis*, vol. 17, fasc. 23, pp. 2101–2113, 2005, doi: 10.1002/elan.200503371.
- [9] S.-M. Lee *et al.*, «Real-time monitoring of 3D cell culture using a 3D capacitance biosensor», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, pp. 56–61, mar. 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.09.005.
- [10] F. Groeber *et al.*, «Impedance Spectroscopy for the Non-Destructive Evaluation of *In Vitro* Epidermal Models», *Pharm. Res.*, vol. 32, fasc. 5, pp. 1845–1854, mag. 2015, doi: 10.1007/s11095-014-1580-3.
- [11] S. Arman, R. D. Tilley, e J. J. Gooding, «A review of electrochemical impedance as a tool for examining cell biology and subcellular mechanisms: merits, limits, and future prospects», *The Analyst*, vol. 149, fasc. 2, pp. 269–289, 2024, doi: 10.1039/D3AN01423A.
- [12] F. Lisdat e D. Schäfer, «The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, fasc. 5, pp. 1555–1567, lug. 2008, doi: 10.1007/s00216-008-1970-7.
- [13] D. A. Koutsouras, P. Gkoupidenis, C. Stolz, V. Subramanian, G. G. Malliaras, e D. C. Martin, «Impedance Spectroscopy of Spin-Cast and Electrochemically Deposited PEDOT:PSS Films on Microfabricated Electrodes with Various Areas», *ChemElectroChem*, vol. 4, fasc. 9, pp. 2321–2327, set. 2017, doi: 10.1002/celec.201700297.
- [14] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan, e A. Mulchandani, «Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications», *Sensors*, vol. 21, fasc. 19, p. 6578, gen. 2021, doi: 10.3390/s21196578.

- [15] M. Carminati, «Advances in High-Resolution Microscale Impedance Sensors», *J. Sens.*, vol. 2017, fasc. 1, p. 7638389, 2017, doi: 10.1155/2017/7638389.
- [16] S. Fratini, M. Nikolka, A. Salleo, G. Schweicher, e H. Siringhaus, «Charge transport in high-mobility conjugated polymers and molecular semiconductors», *Nat. Mater.*, vol. 19, fasc. 5, pp. 491–502, mag. 2020, doi: 10.1038/s41563-020-0647-2.
- [17] B. D. Paulsen, K. Tybrandt, E. Stavrinidou, e J. Rivnay, «Organic mixed ionic–electronic conductors», *Nat. Mater.*, vol. 19, fasc. 1, pp. 13–26, gen. 2020, doi: 10.1038/s41563-019-0435-z.
- [18] M. I. Hossain e S. Mansour, «A critical overview of thin films coating technologies for energy applications», *Cogent Eng.*, vol. 10, fasc. 1, p. 2179467, dic. 2023, doi: 10.1080/23311916.2023.2179467.
- [19] A. H. Malik, F. Habib, M. J. Qazi, M. A. Ganayee, Z. Ahmad, e M. A. Yattoo, «A short review article on conjugated polymers», *J. Polym. Res.*, vol. 30, fasc. 3, p. 115, feb. 2023, doi: 10.1007/s10965-023-03451-w.
- [20] P. Palani e S. Karpagam, «Conjugated polymers – a versatile platform for various photophysical, electrochemical and biomedical applications: a comprehensive review», *New J. Chem.*, vol. 45, fasc. 41, pp. 19182–19209, ott. 2021, doi: 10.1039/D1NJ04062F.
- [21] A. Elschner, S. Kirchmeyer, W. Lovenich, U. Merker, e K. Reuter, *PEDOT: Principles and Applications of an Intrinsically Conductive Polymer*. Boca Raton: CRC Press, 2010. doi: 10.1201/b10318.
- [22] A. Elschner, S. Kirchmeyer, W. Lovenich, U. Merker, e K. Reuter, *PEDOT: Principles and Applications of an Intrinsically Conductive Polymer*. Boca Raton: CRC Press, 2010. doi: 10.1201/b10318.
- [23] C.-Y. Lo *et al.*, «Influence of the molecular weight and size distribution of PSS on mixed ionic-electronic transport in PEDOT:PSS», *Polym. Chem.*, vol. 13, fasc. 19, pp. 2764–2775, 2022, doi: 10.1039/d2py00271j.
- [24] C. M. Proctor, J. Rivnay, e G. G. Malliaras, «Understanding volumetric capacitance in conducting polymers», *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 54, fasc. 15, pp. 1433–1436, 2016, doi: 10.1002/polb.24038.
- [25] M. Bianchi *et al.*, «Scaling of capacitance of PEDOT:PSS: volume vs. area», *J. Mater. Chem. C*, vol. 8, fasc. 32, pp. 11252–11262, ago. 2020, doi: 10.1039/D0TC00992J.
- [26] A. Wang, D. Jung, D. Lee, e H. Wang, «Impedance Characterization and Modeling of Subcellular to Micro-sized Electrodes with Varying Materials and PEDOT:PSS Coating for Bioelectrical Interfaces», *ACS Appl. Electron. Mater.*, vol. 3, fasc. 12, pp. 5226–5239, dic. 2021, doi: 10.1021/acsaelm.1c00687.
- [27] H. Yuk, B. Lu, e X. Zhao, «Hydrogel bioelectronics», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, fasc. 6, pp. 1642–1667, 2019, doi: 10.1039/C8CS00595H.
- [28] M. Kadlec, M. Pekař, e J. Smilek, «Mechanical properties of agarose hydrogels tuned by amphiphilic structures», *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 700, p. 134791, nov. 2024, doi: 10.1016/j.colsurfa.2024.134791.
- [29] F. Jiang *et al.*, «Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review», *Mar. Drugs*, vol. 21, fasc. 5, p. 299, mag. 2023, doi: 10.3390/md21050299.
- [30] O. Tartagni *et al.*, «Microstructured soft devices for the growth and analysis of populations of homogenous multicellular tumor spheroids», *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 80, fasc. 4, p. 93, apr. 2023, doi: 10.1007/s00018-023-04748-1.

- [31] M. Sypabekova, A. Hagemann, D. Rho, e S. Kim, «Review: 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) Deposition Methods on Oxide Surfaces in Solution and Vapor Phases for Biosensing Applications», *Biosensors*, vol. 13, fasc. 1, p. 36, gen. 2023, doi: 10.3390/bios13010036.