

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

Sistemi di trasmissione a base di nanotubi di carbonio per uso biosensoristico



Relatori

firma dei relatori

prof. Alberto Tagliaferro (DISAT) _____

prof.ssa Patrizia Savi (DET) _____

prof. Mauro Giorcelli (DISAT) _____

Candidato

firma del candidato

Edoardo Bronzini

Dicembre 2017

Indice

1. Introduzione	1
2. Principi di biosensoristica	3
2.1 Specie chimiche di interesse biologico	3
2.1.1 Metaboliti	4
2.1.2 Amminoacidi	4
2.1.3 Peptidi e proteine	5
2.1.4 DNA e RNA	6
2.2 Il biosensore: composizione e principi di funzionamento.	7
2.3 Tipologie di molecole rilevabili e di sonde utilizzabili.	9
2.3.1 DNA → DNA complementare	9
2.3.2 Antigene → Anticorpo	10
2.4 Immobilizzazione delle molecole sonda alla superficie del biosensore.	11
2.4.1 Modello di Langmuir	11
2.4.2 Modello di Kisliuk	12
2.4.3 Modello dell'ingombro sterico	13
2.4.4 Spreading model	13
2.5 Esempi di reazioni di adsorbimento	14
3. I nanotubi di carbonio: caratteristiche, metodi di sintesi e applicazioni	17
3.1 Caratteristiche dei nanotubi di carbonio	18
3.2 CNT: metodi di sintesi	19
3.3 Metodi di deposizione dei nanotubi	20
4. Antenne in Microstriscia.	21
5. Il lattato: metabolismo cellulare e rilevanza dei suoi livelli nel contesto medico e diagnostico	25
6. Preparazione antenne: screen printing e funzionalizzazione	27
6.1 Test preliminari per il tipo e la percentuale di binder ottimali	27
6.2 Misure sulle antenne non funzionalizzate	29
6.2.1 Misure elettriche (DC e in frequenza)	30
6.2.2 Microscopia FESEM	34
6.2.3 Spettroscopia XPS	38
6.3 Funzionalizzazione	41

7. Misure sulle antenne funzionalizzate	43
7.1 Microscopia FESEM	43
7.2 Misure elettriche con soluzioni titolate.	45
7.2.1 Antenna M17.2	45
7.2.2 Antenna M33.0	47
7.3 Analisi risultati	49
9. Conclusioni	51
Riferimenti bibliografici	53
Ringraziamenti	55

1. Introduzione

La scienza e la tecnologia dei materiali nascono da necessità legate al contesto della produzione navale, automobilistica e, più in generale, manifatturiera, dove grande importanza viene data alle caratteristiche strutturali dei materiali analizzati. In seguito allo sviluppo dell'elettronica e delle tecnologie informatiche, questo studio è stato integrato da quello incentrato su altre caratteristiche, come le proprietà chimiche del materiale stesso (anzi, si può dire che molte delle tecnologie informatiche tuttora in uso abbiano tratto vantaggio dagli avanzamenti che ha avuto nel corso dei decenni l'ingegneria dei materiali).

In particolar modo, la sempre maggiore presenza di apparecchiature elettroniche o più in generale tecnologiche nell'ambiente quotidiano, con la contemporanea tendenza verso la miniaturizzazione dei circuiti e la drastica riduzione dei costi relativi al loro sviluppo, ha portato alla moltiplicazione dei campi di applicazione dell'ingegneria dei materiali, dalle comunicazioni, al packaging intelligente, e non ultimi, al campo medico e delle biotecnologie.

In questi ultimi settori, l'ingegneria dei materiali si pone come un ponte tra elettronica e biotecnologia, studiando, tra le altre, le caratteristiche di biocompatibilità dei materiali congiuntamente con quelle elettriche. Grazie ai suddetti progressi, la tendenza in campo medico va verso una gestione della sanità sempre più localizzata, attraverso l'uso di strumenti diagnostici piccoli, leggeri, poco costosi e che permettano una risposta rapida e sempre più affidabile, direttamente sul sito dove il paziente è in cura (Point of care), e che si adattino alle necessità del singolo paziente.

In quest'ottica, lo scopo di questa tesi è quello di analizzare le potenzialità dell'utilizzo dei nanotubi di carbonio per lo sviluppo di un sensore biochimico, coniugando le loro peculiari caratteristiche elettriche e la loro inerzia biologica.

Si è scelto di basare lo sviluppo del sensore su un risonatore in microstriscia (patch antenna), per la sua facilità di fabbricazione e il suo basso costo. L'argomento è estremamente vasto, e per questi motivi, dopo una fase di confronto della precedente letteratura, e in conformità con le logistiche e le tempistiche di un lavoro di tesi, si è scelto di focalizzare la parte sperimentale di questo lavoro su una specifica combinazione di:

- layout del circuito;
- molecola rilevabile;
- metodo di funzionalizzazione;
- proprietà elettrica, che varia in funzione della concentrazione di analita e che viene utilizzata per la misura.

Tuttavia, l'utilizzo della variazione della frequenza di risonanza caratteristica di un risonatore in microstriscia è un metodo di rilevazione su cui si rinvengono ancora pochi esempi in letteratura. Questo metodo potrebbe essere applicato alla misura di differenti molecole (glucosio, antigeni, marcatori tumorali, ecc...), operando un diverso iter di funzionalizzazione; per questi motivi ci si aspetta che questa ricerca sia il primo passo verso lo sviluppo, in futuro, di un sensore biologico che permetta, una volta identificato il metodo di funzionalizzazione ottimale, di analizzare e rilevare diverse molecole di interesse medico.

2. Principi di biosensoristica

Nel campo delle biotecnologie, per biosensoristica si intende quell'insieme di cognizioni e metodologie volte alla rilevazione di specie chimiche di origine organica o di interesse biologico o biomedico. Essa condivide ovviamente alcune caratteristiche con la sensoristica in senso lato (inclusi i sensori di metalli, di molecole elementari e di altre specie chimiche inorganiche). Alcune caratteristiche, tuttavia, contraddistinguono la biosensoristica, quale ad esempio la necessità di effettuare la misura in un ambiente che permetta l'interazione tra la specie chimica che si vuole analizzare e le molecole utilizzate per la sua rilevazione.

Un sensore biochimico deve soddisfare alcuni requisiti fondamentali, quali avere:

- una sensibilità elevata e coerente, tra una misura e la successiva: il sensore deve restituire un segnale ben definito in corrispondenza di una specifica concentrazione e dare, per tale concentrazione, la stessa risposta, anche dopo un elevato numero di cicli di iterazione della misura;
- una risposta selettiva (il segnale trasmesso deve dipendere esclusivamente dalla specie chimica oggetto della misura, senza essere influenzato dalla presenza delle altre specie in sospensione);
- un basso limite di rilevamento (LOD);
- un intervallo di risposta lineare quanto più esteso possibile, meglio se in un intervallo di concentrazioni simile ai valori nominali riscontrati per l'analita nei campioni da analizzare;
- una durevole stabilità della funzionalizzazione sul lungo termine.

Caratteristiche preferenziali del sensore sono inoltre:

- la sua facilità di utilizzo e di lettura, per minimizzare errori di misura dovuti ad imperizia e, ove possibile, permetterne l'utilizzo anche da parte del paziente stesso;
- un ridotto costo di fabbricazione;

2.1 Specie chimiche di interesse biologico

Un biosensore è un particolare sensore, in cui la grandezza misurata è la concentrazione di una specifica specie chimica di interesse biologico. Le molecole analizzate sono classificabili in quattro gruppi principali:

- metaboliti;
- amminoacidi;
- peptidi.
- DNA o RNA.

2.1.1 Metaboliti

I metaboliti sono degli intermedi di reazioni biochimiche che si svolgono nell'ambiente cellulare, e possono essere: endogeni o esogeni. Si definiscono endogeni quegli intermedi che vengono generati naturalmente dal metabolismo cellulare, mentre si definiscono esogene quelle molecole che, pur non essendo naturalmente presenti nel corpo, entrano a far parte delle reazioni metaboliche, modificandole o controllandone l'andamento (inibendo o stimolando alcune reazioni). Alcuni esempi di metaboliti endogeni sono il glucosio, il colesterolo o l'adenosin-trifosfato. Tra i metaboliti esogeni figurano i principi attivi della maggior parte dei farmaci che agiscono sul metabolismo, come, ad esempio, la benzfetamina (uno stimolante utilizzato per trattare l'obesità patologica), la ciclofosfamide (un chemioterapico ad effetto antineoplastico ed immunosoppressore) oppure il destrometorfano (un antitussivo ad azione serotoninergica).

2.1.2 Amminoacidi

Gli amminoacidi sono delle molecole organiche contenenti al loro interno sia gruppi amminici ($-NH_2$, gruppo N) sia gruppi carbossilici ($-COOH$, gruppo C). Nello specifico, in biochimica, quando si parla di amminoacidi ci si intende riferire agli L- α -amminoacidi, ovvero a quegli amminoacidi in cui il gruppo amminico si trova in posizione α rispetto al gruppo carbossilico, e sono legati in configurazione chirale L (figura 2.1).

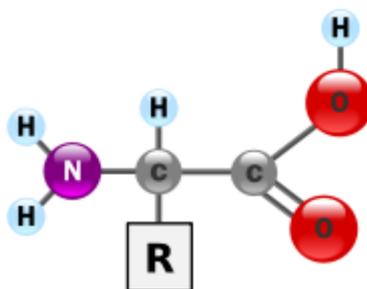


Figura 2.1: rappresentazione generica di un L- α -amminoacido (si differenziano in base al gruppo sostituito R)

Pur essendo centinaia gli amminoacidi noti, solo 20 di essi rivestono un'importanza in campo biomedico, nella sintesi delle proteine (amminoacidi proteinogenici). Dato che la maggior parte dei metodi di rilevazione sfruttano le differenze di carica elettrica delle specie in soluzione o la formazione di domini idrofobici, gli amminoacidi vengono generalmente raggruppati in cinque categorie:

- 1) carichi positivamente: sono carichi positivamente tutti gli amminoacidi che presentano un numero di gruppi N maggiore dei gruppi C presenti: arginina, istidina e lisina.
- 2) carichi negativamente: risultano carichi negativamente tutti gli amminoacidi che presentano più gruppi C rispetto ai gruppi N: acido aspartico e acido glutammico.
- 3) polarmente non carichi: gli amminoacidi di questo gruppo presentano un ugual numero di gruppi C e di gruppi N: serina, treonina, asparagina, glutammina.

4) con gruppi idrofobici: questi amminoacidi devono le loro proprietà alla presenza di catene alchiliche stericamente ingombranti: alanina, fenil-alanina, isoleucina, leucina, metionina, triptofano, tirosina, valina.

5) amminoacidi con caratteristiche speciali (presenza di eteroatomi o di gruppi funzionali specifici): in quest'ultimo gruppo si accorpano tutti gli amminoacidi che derivano le loro proprietà dalla presenza di particolari gruppi funzionali (solfidrici, selenolici, pirrolidinici) o dalla loro assenza (come nel caso della glicina, in cui il gruppo R corrisponde ad un idrogeno). Di quest'ultima categoria fanno parte: cisteina, selenocisteina, glicina e prolina.

Questi amminoacidi possono essere presenti in campioni organici di interesse biomedico. Tuttavia, la loro proprietà chimica più interessante è la loro tendenza a legarsi fra loro attraverso il cosiddetto “legame peptidico” (figura 2.2); questo si forma attraverso la reazione tra un gruppo amminico e un gruppo carbossilico appartenenti a due diversi amminoacidi, con il rilascio di una molecola d'acqua, con un processo omologo a quello utilizzato nelle reazioni di policondensazione, in ambito industriale, per la sintesi di alcuni tipi di polimeri.

2.1.3 Peptidi e proteine

La combinazione di più legami peptidici porta alla formazione di un polipeptide. Questi possono essere immaginati come dei “nastri”, con domini organizzati in maniera più o meno ordinata: possono assumere una conformazione: α -helix (figura 2.3a), β -sheet (figura 2.3b), oppure random coil. Più peptidi, tenuti insieme da legami idrogeno, idrofobici o da legami polari, vanno a formare le proteine.

Le proteine risultano, quindi, come delle particolari catene polipeptidiche, organizzate in strutture di ordine crescente:

- primaria (la successione degli amminoacidi che costituiscono il singolo polipeptide);
- secondaria (i domini del polipeptide: β -sheet, α -helix o random);
- terziario (l'organizzazione spaziale dei domini secondari).

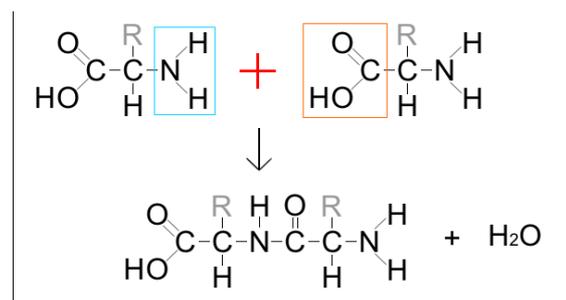


Figura 2.2 : Formazione del legame peptidico.

A volte, per molecole molte complesse, vi è un livello di organizzazione strutturale anche di questi ultimi, detta struttura quaternaria. Ad esempio, l'enzima lattato ossidasi è costituito da due domini terziari che si affacciano tra loro ruotati di 180° (figura 2.3ⁱ)

2.1.4 DNA e RNA

Un'altra categoria di molecole fondamentali in campo biologico è costituita dal DNA e dall'RNA. Il DNA è una catena a doppia elica (figura 2.4a), costituita da uno scheletro di deossiribosio e di ponti fosfato, su cui si montano e si alternano con un preciso ordine 4 basi azotate, a 2 a 2 complementari tra loro: adenina-timina (figura 2.4b) e guanina-citosina (figura 2.4c). L'RNA è una catena, generalmente più corta, a singola elica, in cui, al posto del deossiribosio, è presente il ribosio, e in cui la base accoppiata con l'adenina, invece di essere la timina, è l'uracile (si differenzia per la mancanza del gruppo metile, figura 2.4d).



Figura 2.3: struttura tridimensionale dell'enzima lattato ossidasi¹.

¹Fonte immagine: Database Brenda. Immagine utilizzata a scopo non commerciale, nel rispetto della licenza d'uso. https://www.brenda-enzymes.org/Mol/jsmol/index.php?selectedPos=265_265&pdb=2nli&ecno=1.13.12.4&colorScheme=0

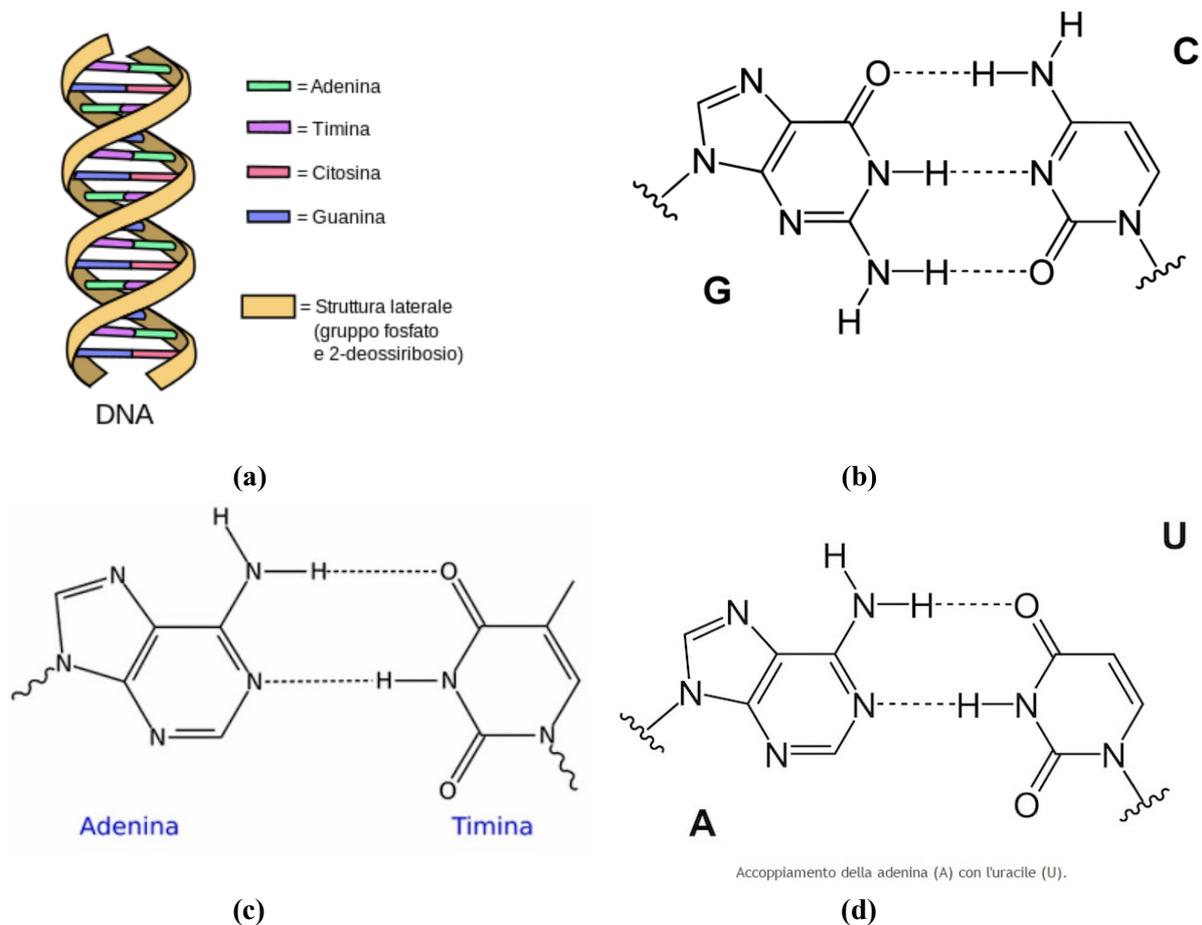


Figura 2.4 : struttura a doppia elica del DNA (a); legami tra le basi azotate: guanina-citosina (b), adenina-timina (c), adenina-uracile (nell'RNA) (d)

2.2 Il biosensore: composizione e principi di funzionamento.

Un sensore è definito come un dispositivo volto ad interfacciarsi in un ambiente e a misurarne alcune grandezze fisiche, interagendo con l'ambiente e trasformando la variazione di una sua (del sensore) proprietà fisica in un segnale, interpretabile dall'operatore. In base a questa definizione, un sensore deve essere costituito da: un elemento sensibile, che è influenzato dalla grandezza fisica dell'ambiente, modificando una sua proprietà fisica (dimensione, temperatura, colore, proprietà elettriche...); un trasduttore, che ha il compito di trasformare la variazione della proprietà fisica dell'elemento sensibile in un segnale visionabile ed elaborabile; se il funzionamento del sensore richiede che venga fornita dell'energia dall'esterno, è anche presente un alimentatore; a volte, quando questo segnale, nella maggior parte dei casi di tipo elettrico, risulta troppo debole, il sensore è provvisto anche di un amplificatore di segnale.

In genere, queste misure vengono effettuate in soluzione. Spesso, le concentrazioni degli analiti nei fluidi da analizzare (sangue, urine, ecc...) sono tali da essere incompatibili con la misura; possono essere, ad esempio, troppo elevate, per cui superano l'intervallo per cui il sensore scelto ha una risposta lineare. In questi casi, i campioni da analizzare devono essere

diluiti in una soluzione che, pur riducendo la concentrazione delle specie da rilevare, ne mantengano inalterate le proprietà chimiche e la conformazione tridimensionale. Per questi motivi, queste analisi vengono condotte in soluzioni saline a pH controllato: il pH permette alla molecola di mostrarsi al sensore nello stesso stato che avrebbe nell'ambiente biologico, mentre gli ioni positivi e negativi in soluzione in opportune concentrazioni le offrono un supporto sterico. Alcune soluzioni tampone usate in analisi biomedica sono la soluzione PBS (pH=7,4) e il buffer TE (pH=8.0). La soluzione PBS viene generalmente utilizzata nell'analisi di metaboliti delle cellule e per le proteine, mentre il buffer TE è una soluzione che utilizza delle molecole con una particolare stericità (figura 2.5) per dare supporto alle molecole di DNA e dell'RNA. In tabella 2.1 sono riportate le composizioni di questi due tamponi.

Tabella 2.1: alcune soluzioni buffer usate in biologia

Nome:	PBS	TE
pH	7.4	8.0
Composizione:	8g NaCl 0,2g KCL 1,44g Na ₂ HPO ₄ 0,24g KH ₂ PO ₄ HCl (fino al pH richiesto)	10mM TRIS (fig. 2.5) 1mM EDTA (fig. 2.5) HCl (fino al pH richiesto)
Disciolti in:	1 l d'acqua	in 100 ml d'acqua
Usi:	con cellule e proteine.	con DNA ed RNA

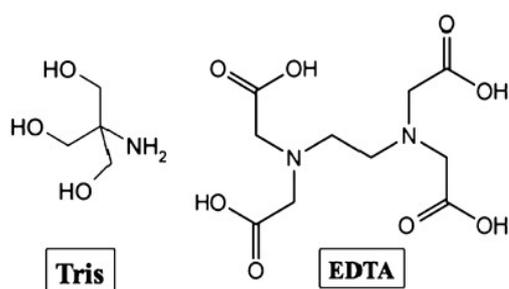


Figura 2.5: agenti chelanti presenti nel buffer TE.

Alcuni biosensori elettronici di tipo FET si basano su un “effetto gate”: la presenza di specie cariche in soluzione (ioni) modifica la risposta elettrica del FET, aumentando o riducendo il segnale trasmesso. La misura viene svolta analizzando questo segnale.

Un altro metodo di rilevazione di specie chimiche in soluzione è la cella elettrolitica: in essa, la risposta elettrica della cella ad uno specifico potenziale è dato da alcuni fattori, tra cui, in maniera più o meno diretta, dalla concentrazione delle specie ioniche in soluzione. Noti i potenziali di ossidoriduzione delle specie che si vogliono analizzare, si può, utilizzando

opportuni potenziali, rilevare la concentrazione degli analiti richiesti. Tuttavia, la risposta ottenuta non è sempre linearmente proporzionale alla concentrazione della specie ionica in soluzione: infatti, oltre una certa concentrazione di specie ioniche, avviene la formazione in soluzione di coppie ioniche, che si legano con un legame debole, ma sufficiente per schermarle reciprocamente nei confronti del potenziale applicato. Un altro effetto di cui tenere conto è la formazione, in soluzione, in corrispondenza della superficie dell'elettrodo, del doppio strato ionico. Si distinguono due strati: quello interno (inner Helmholtz plane, IHP), costituito da ioni non solvatati; e quello esterno (outer Helmholtz plane, OHP), costituito da ioni solvatati. A seguito del gradiente di carica presente, tra la superficie dell'elettrodo e il bulk della soluzione, si definisce la lunghezza di Debye (LD), che è lo spessore dello strato entro cui l'effetto di carica del doppio strato di Helmholtz influenza significativamente il moto delle particelle in soluzione. Quest'ultimo può influenzare positivamente o negativamente la misura.

La rilevazione di biomolecole si basa, nella maggior parte dei casi, sull'adsorbimento di queste su di una superficie, per mezzo di molecole complementari (sonde) depositate su quest'ultima. Le interazioni che legano queste specie sono di tipo:

- Van der Waals
- Legame Idrogeno
- Idrofobico
- Elettrostatico

Nel computo di queste forze, un contributo non trascurabile è quello dato dal solvente.

2.3 Tipologie di molecole rilevabili e di sonde utilizzabili.

Caratteristica di fondamentale importanza per un biosensore è la complementarità, ovvero la capacità dell'elemento sonda di legarsi selettivamente con la molecola d'interesse e, possibilmente, solo con quella, restando inerte anche nei confronti di molecole simili, ma che differiscano di poco da essa.

2.3.1 DNA → DNA complementare

L'energia di un legame è definita dall'ENERGIA LIBERA DI GIBBS:

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S$$

L'energia relativa all'IBRIDIZZAZIONE di due catene di DNA (o di una di DNA con una di RNA) dipende in maniera critica dalla corrispondenza delle rispettive basi azotate:

$$\Delta G = \sum_{\forall i} n_i \Delta G_i + \Delta G_{i, \text{init term } A-T} + \Delta G_{i, \text{init term } G-C} + \Delta G_{\text{system}}$$

Con:

- ΔG_i = energia associata ad ogni singolo sistema di coppie vicinali di basi azotate;
- $\Delta G_{i, \text{init term } A-T}$ = energia associata al sistema di coppie vicinali quando la coppia iniziale è A-T;
- $\Delta G_{i, \text{init term } G-C}$ = energia associata al sistema di coppie vicinali quando la coppia iniziale è G-C;

- ΔG_{system} = valore empirico uguale a 1,80 kJ/mole se le catene sono tra loro perfettamente complementari, altrimenti è uguale a 0.

Nell'ibridizzazione di due catene di DNA, anche un solo mismatch tra le basi azotate riduce l'energia di legame di una quantità consistente (fino a 15 kJ/moleⁱⁱ).

2.3.2 Antigene → Anticorpo

Un altro tipo di interazione di interesse biomedico è quella tra antigene (target) ed anticorpo (sonda). Le zone di contatto tra queste due specie chimiche sono dette:

- Epitopo dell'antigene (o determinante antigenico);
- Paratopo dell'anticorpo (o sito di attacco).

In soluzione, la reazione espressa in figura 2.6a ha una costante di reazione:

$$K^0 = \frac{k_a^0}{k_d^0} = e^{\frac{-\Delta G^0}{RT}},$$

che dipende anche in questo caso dall'energia libera di Gibbs, definita in questo caso come:

$$\Delta G = \Delta H_{\Phi} + \Delta H_{EL} - T\Delta S_{CF} - T\Delta S_{TR} - T\Delta S_{ID},$$

Con:

- ΔH_{Φ} componente dovuta ai domini idrofobici (da -16 a -72 kJ/mole)
- ΔH_{EL} componente dovuta a legami di Van der Waals (da -88 a -160 kJ/mole);
- $T\Delta S_{CF}$ contributo conformazionale dovuto alla limitazione dei residui (+2,3 kJ/mole per catena bloccata);
- $T\Delta S_{TR}$ contributo empirico (da 29 a 46 kJ/mole);
- $T\Delta S_{ID}$ contributo del solvente (-8,4 kJ/mole).

Le energie di legame tra un antigene ed il suo anticorpo corrispondente variano quindi, in genere, tra i -27,6 e i -60 kJ/mole.

Il processo di cattura dell'antigene (target) è molto complesso e lento, e può richiedere da pochi minuti ad alcune ore. La tendenza a legare gli antigeni da parte degli anticorpi decresce all'aumentare della concentrazione degli antigeni: questo perché avviene un processo di saturazione degli anticorpi presenti, e diventa sempre più difficile l'incontro tra un antigene residuo e un anticorpo non saturato (figura 2.6b). Bisogna, inoltre, considerare che paratopi diversi possono legare diversi siti di attacco sullo stesso antigene. Questo può portare a configurazioni di cattura più complesse, come i dimeri, in cui due anticorpi legano lo stesso antigene), i trimeri, ecc.

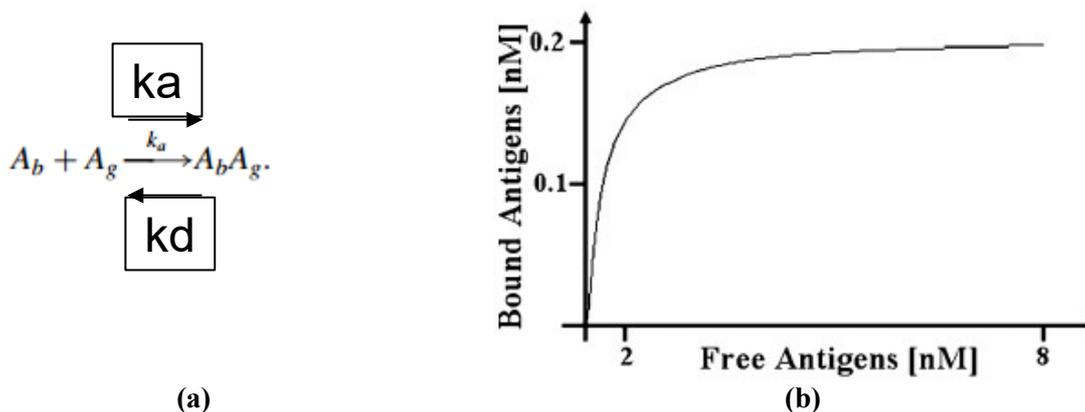


Figura 2.6: schema della reazione tra anticorpo Ab e antigene Ag (a); resa della reazione all'aumentare della concentrazione di antigene oltre il livello di saturazione degli anticorpi (b).

2.4 Immobilizzazione delle molecole sonda alla superficie del biosensore.

Finora abbiamo considerato le interazioni che avvengono, in soluzione, tra le molecole target (quelle di cui si vuole analizzare la presenza e la concentrazione) e delle molecole sonda (probe). Tuttavia, per ottenere un biosensore, è necessario che le molecole sonda interagiscono con la superficie del sensore, per trasmettere un segnale, che venga poi elaborato per essere, alla fine, letto. In questo paragrafo vengono descritte le reazioni che avvengono sulla superficie del sensore in fase di funzionalizzazione.

2.4.1 Modello di Langmuir

L'adsorbimento della specie sonda sulla superficie del sensore può essere simulato attraverso l'uso di alcuni modelli. Il primo modello, sviluppato da Langmuir per l'adsorbimento di specie in fase gassosa, parte da quattro presupposti fondamentali:

- 1) la superficie di adsorbimento è uniforme;
- 2) le molecole adsorbite non interagiscono tra loro;
- 3) vi è un unico meccanismo di adsorbimento;
- 4) l'adsorbimento continua fino alla formazione di un monolayer uniforme.

Con l'ultimo punto, si intende che viene esclusa la possibilità che si formi un secondo strato, finché il primo strato non è completo.

Definita una concentrazione di specie L, una densità di siti attivi BS e una concentrazione di molecole adsorbite A, vale la reazione:



Definita R_A la velocità di reazione per l'adsorbimento e R_D la velocità di reazione per il desorbimento da siti legati:

$$R_A = k_A p[BS_{free}] ,$$

$$R_D = k_D[A] ;$$

segue una costante di adsorbimento all'equilibrio:

$$K = \frac{k_A}{k_D} = \frac{[A]}{p[BS_{free}]},$$

con p pressione del gas che viene adsorbito sulla superficie. Attraverso semplici trasformazioni, si arriva a definire la resa dell'adsorbimento, intesa come la percentuale di superficie ricoperta, ovvero dei siti attivi disponibili che vengono legati:

$$Y = \frac{[A]}{[BS_0]} = \frac{pK}{1 + pK}$$

Analizzando la cinetica di questa reazione, si ricava la velocità di ricopertura della superficie come:

$$\begin{aligned} \frac{dY}{dt} &= \frac{R_a - R_d}{(BS_0)} = \frac{k_a p [BS_0 - A] - k_d [A]}{(BS_0)} = \frac{k_a p [BS_0 - YBS_0] - k_d [YBS_0]}{(BS_0)} = k_a p - k_a p Y - k_d Y = \\ &= k_a p - (k_a p - k_d) Y \end{aligned}$$

Nei primi istanti della reazione, la resa di copertura e la R_d sono nulle, perciò:

$$\frac{dY}{dt} = \frac{R_a}{BS_0} = k_a p.$$

All'equilibrio, $R_d - R_a = 0$, quindi $dY/dt = 0$. Da ciò, segue che:

$$Y = \frac{k_a p}{k_a p - k_d}$$

Per una qualunque reazione di adsorbimento, all'aumentare della pressione della specie da adsorbire, viene migliorata la resa. Per l'adsorbimento da soluzioni, nelle quali la pressione è molto maggiore che nei gas, si può affermare che, all'equilibrio, la resa Y tenda a 1. In questo caso si può con buona approssimazione escludere il contributo dovuto alla reazione di desorbimento e scrivere:

$$\frac{dY}{dt} = R_a(1 - Y).$$

2.4.2 Modello di Kisliuk

Il modello di Kisliuk perfeziona il precedente modello di Langmuir, introducendo il concetto di "stato precursore", ovvero la possibilità che una particella parzialmente adsorbita serva da superficie di adsorbimento per la formazione di un secondo layer. Questo modello, rispetto al precedente, considera anche la possibilità che ci sia una interazione tra le particelle adsorbite. La formazione di questo stato intermedio segue cinetiche comparabili col modello precedente:

$$\frac{dY'}{dt} = k_s Y' [R'_a(1 - Y)] ,$$

Se consideriamo $R_a \approx R'_a$, la somma dei due fenomeni dà:

$$\frac{dY}{dt} = R_a(1 - Y) + k_s Y [R_a(1 - Y)] = R_a(1 - Y)(1 + k_s Y) .$$

Da questa formula, appare evidente che in questo modello l'interazione tra le specie adsorbite agisce positivamente, aumentando la velocità di adsorbimento.

2.4.3 Modello dell'ingombro sterico

Il modello dell'ingombro sterico tiene conto della dimensione della molecola sonda, rispetto al sito superficiale su cui viene adsorbita; rispetto al precedente modello, il fattore sterico riduce la velocità stimata dal modello, all'aumentare della copertura:

$$\frac{dY}{dt} = R_A(1-Y) - \alpha Y [R_A(1-Y)] .$$

Una forma più generale considera questo contributo come un'espansione polinomiale:

$$\frac{dY}{dt} = R_A(1-Y) - \sum_{\forall n > 0} \alpha_n Y^n [R_A(1-Y)].$$

Il modello dell'ingombro sterico può essere considerato come una generalizzazione del modello di Kisliuk; infatti, se si impongono seguenti costanti:

$$\begin{cases} \alpha_1 = -k_S, \\ \alpha_n = 0, \forall n > 1, \\ \frac{dY}{dt} = R_A(1-Y) + k_S Y [R_A(1-Y)]. \end{cases}$$

si ricade nel modello di Kisliuk.

2.4.4 Spreading model

Contempla la possibilità che una molecola si “espanda“, occupando due siti attivi. La ricopertura totale risulta dalla sovrapposizione dei due contributi:

$$\frac{dY}{dt} = \frac{dY_1}{dt} + \frac{dY_2}{dt} , \text{ con } \frac{dY_1}{dt} = R_{A1}(1-Y_1 - \alpha Y_2) \text{ e } \frac{dY_2}{dt} = R_{A2}(1-Y_2 - \beta Y_1) .$$

In figura 2.7 vengono riportati gli andamenti teorici, a paità di costante K, per i quattro modelli considerati (per comodità di rappresentazione, viene visualizzata solo la metà del grafico relativa alle percentuali di ricopertura che vanno dal 50% al 100%).

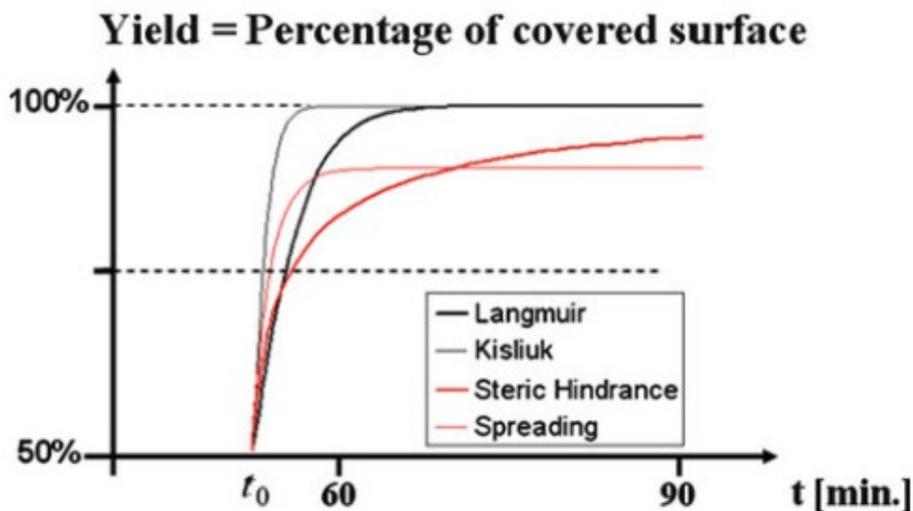


Figura 2.7: percentuali di ricopertura di una superficie durante una reazione di adsorbimento.

2.5 Esempi di reazioni di adsorbimento

Dopo che la soluzione contenente la specie sonda entra in contatto con la superficie del sensore, deve avvenire adsorbimento delle molecole sulla superficie. Questa reazione può avvenire attraverso la formazione di legami covalenti (self-assembly) o non covalenti (drop casting).

Nel metodo del drop casting vengono sfruttati i domini idrofobici e le forze di Van der Waals o elettrostatiche per legare proteine o enzimi. Ad esempio, in uno studio condotto da Lynam et al.ⁱⁱⁱ, sono state fissate delle immunoglobuline di ratto (IgG) alla superficie di nanotubi di carbonio funzionalizzati con gruppi -COOH, aggiungendo una soluzione delle immunoglobuline ad una dispersione di CNT-COOH, lasciando agire una notte e successivamente centrifugando.

Tuttavia, nello stesso studio viene evidenziato come una funzionalizzazione attraverso la formazione di legami covalenti (self-assembly) abbia dato una migliore resa nell'adsorbimento delle molecole sonda. Questi legami sono stati ottenuti attraverso la modifica dell'ibridizzazione del carbonio da C(sp²) a C(sp³), inserendo 4 mg di ethyl diaminocarbondiimide (EDC, uno zero-length crosslinker) alla dispersione iniziale, prima di aggiungere le immunoglobuline.

Un altro metodo considerato, descritto da Wohlstader et al.^{iv}, per ottenere la formazione di legami covalenti, utilizza una soluzione concentrata di acidi forti direttamente sulla superficie di un film composito CNT / EVA; la reazione con gli acidi porta alla formazione di gruppi carbossilici (-COOH) sulla superficie dei nanotubi. Su questi gruppi può essere immobilizzata, dopo un trattamento con EDC e con NHS (N-idrossi-succinimide, un reagente attivante specifico per la formazione di legami amidici), la streptavidina. Questo permette la funzionalizzazione della superficie con anticorpi biotinilati, sfruttando la formazione del complesso stabile biotina-streptavidina.

Si cita inoltre, come esempio di rilevazione di antigeni attraverso la formazione di dimeri, lo studio effettuato da Jing Yang et al.^v, per un sensore elettrochimico, consistente in un

elettrodo di carbon glass (CGE) su cui sono stati depositati nanotubi di carbonio, precedentemente funzionalizzati con anticorpi monoclonali anti-PSA attraverso il processo streptavidina-biotina, e che sfrutta in soluzione la presenza di nanoparticelle di oro, ottenute tramite metodo Turkevich^{vi} e successivamente funzionalizzate con un diverso anticorpo monoclonale secondario.

3. I nanotubi di carbonio: caratteristiche, metodi di sintesi e applicazioni

I nanotubi di carbonio sono delle particolari nanoparticelle, scoperte da S. Iijima^{vii} nel 1991, durante uno studio sulla possibilità dell'esistenza di altre strutture esotiche del carbonio, oltre al fullerene. I nanotubi sono costituiti da fogli di esagoni di carbonio, ibridizzati sp² (come la grafite, o il grafene, scoperto però successivamente), chiusi a formare un cilindro, chiuso alle due estremità da due calotte emifullereniche, costituite da atomi dello stesso tipo. I nanotubi di carbonio possono essere suddivisi in due categorie: nanotubi single-walled (SWCNT) e nanotubi multi-walled (MW-CNT). I primi hanno in genere un diametro di circa 2 nm ed una lunghezza che può arrivare a misurare qualche micrometro; a seconda della disposizione dei legami, possono avere un comportamento elettrico tipo metallico (conduttore) oppure comportarsi come un semiconduttore (figura 3.1-2). Si definisce infatti per ogni nanotubo un "vettore chirale" (n,m) e un angolo di arrotolamento θ , che definisce la direzione di arrotolamento della grafite rispetto all'asse del tubo. Da queste, dipendono alcune proprietà, come la conducibilità elettrica e l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche. I nanotubi di tipo "armchair" si comportano come dei conduttori, mentre i nanotubi di tipo "zig zag" si comportano come dei semiconduttori.

Più in generale, mostrano un comportamento metallico tutti i nanotubi per cui è soddisfatta la relazione:

$$|m-n|=3k,$$

con k intero, mentre mostrano un comportamento semiconduttore tutti gli altri.

I MW-CNT sono invece costituiti da più fogli di grafene arrotolati in cilindri concentrici, ed hanno un diametro che varia dai 10 ai 100 nm.

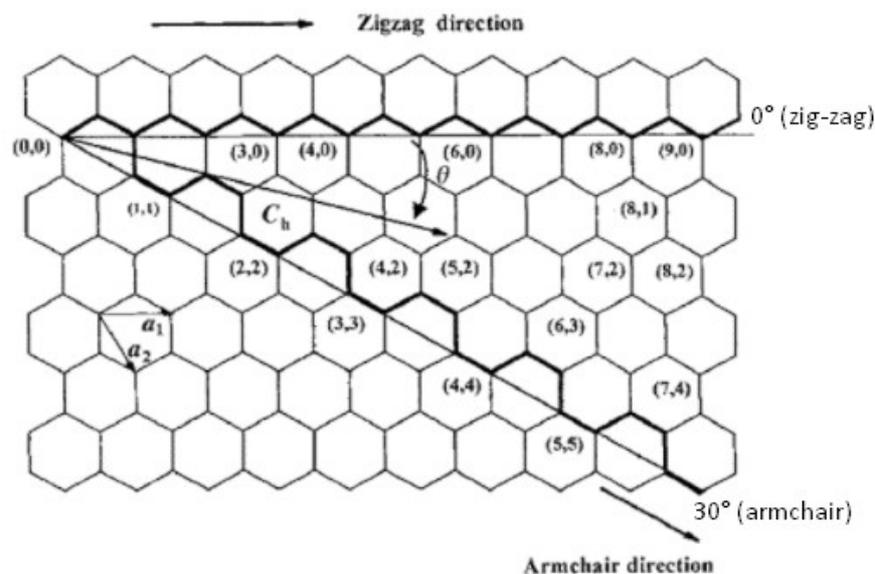


Figura 3.1: angoli di arrotolamento θ

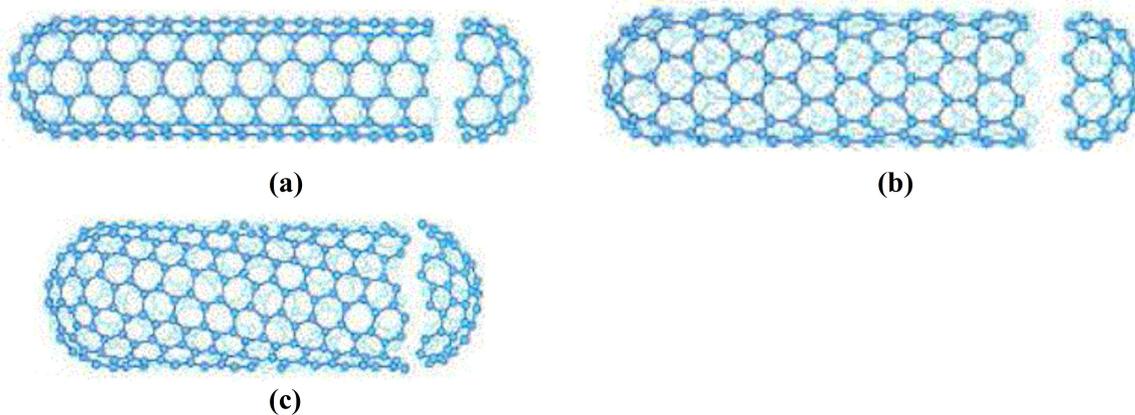


Figura 3.2: nanotubi di tipo armchair (a) o zigzag (b); per angoli intermedi, si ottengono nanotubi chirali (c).

3.1 Caratteristiche dei nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio (CNT) hanno delle caratteristiche fisiche, chimiche ed elettriche notevoli. In alcuni studi, Yu et al.^{viii} hanno dimostrato che, lungo la direzione longitudinale, i MW-CNT possono arrivare a possedere un modulo di Young dell'ordine del Terapascal, con resistenze a trazione di qualche decina di Gigapascal (per i nanotubi single-walled si ottengono valori ancora superiori). Tuttavia, per applicazioni in campo della biosensoristica, risultano più determinanti le loro caratteristiche elettrochimiche. Il loro altissimo rapporto superficie/volume garantisce una conducibilità elettrica notevole, superiore al rame (ci si riferisce, ovviamente, ai nanotubi con comportamento metallico). Questo è dovuto alle caratteristiche microtopologiche dei nanotubi stessi. Infatti, per nanotubi privi di difetti, è statisticamente probabile che gli elettroni possano spostarsi lungo la superficie dei nanotubi con effetti di scattering negligenabili. Si parla in questo caso di “conduttività balistica”^{ix}. Dal punto di vista chimico, differenti studi hanno dimostrato un'affinità tra i nanotubi e alcune proteine, che ha permesso una efficace immobilizzazione di queste ultime sulla loro superficie^x; inoltre, a causa del loro diametro, molto ridotto, è stata riscontrata la presenza di effetti quantici^{xi} che migliorano nello specifico l'accoppiamento con le proteine, favorendo il trasferimento elettronico (dovuto alla reazione in soluzione tra l'enzima ed il target) direttamente dal sito attivo dell'enzima all'elettrodo del trasduttore (ad esempio, nel biosensing del glucosio^{xii}). In uno studio del 2012, Taurino, Carrara, Giorcelli, Tagliaferro, e De Micheli^{xiii} hanno evidenziato che questo accoppiamento è più efficace quando i nanotubi mostrano la superficie laterale (walls) esposta, e se la bagnabilità è stata opportunamente incrementata attraverso un trattamento dei nanotubi con acido solforico.

3.2 CNT: metodi di sintesi

I principali metodi per la fabbricazione di nanotubi di carbonio sono: la scarica ad arco, la vaporizzazione tramite laser della grafite e la chemical vapour deposition (CVD).

Nella scarica ad arco, che è il metodo utilizzato da Iijima per la produzione di MW-CNT, è basato sulla generazione di una scarica elettrica tra due elettrodi di grafite in atmosfera inerte di elio o argon, a circa 500 torr. L'elevata temperatura che si raggiunge tra anodo e catodo durante il processo causa la sublimazione del carbonio, che in seguito condensa generando i nanotubi.

La vaporizzazione laser di grafite è il metodo originariamente utilizzato da Smalley per la generazione e l'analisi di cluster di carbonio, che portò nel 1985 alla scoperta del fullerene. In questo metodo, un disco di grafite viene posto in una camera con atmosfera controllata di elio e fatto ruotare; viene quindi insufflato dell'elio sulla superficie del disco, e contemporaneamente un fascio laser provoca la vaporizzazione della grafite; le nanoparticelle vaporizzate vengono convogliate in una coppa di integrazione, e inviate ad uno spettrometro di massa, che le separa in base al peso molecolare.

Entrambi i metodi fin qui descritti funzionano provocando un drastico ma localizzato aumento della temperatura. La sintesi di nanotubi a bassa temperatura è invece strettamente legata alla presenza di particelle metalliche di taglia nanometrica, avente la funzione di promotori del processo di crescita. Un aspetto di base del meccanismo è che il carbonio è adsorbito sulla superficie libera del catalizzatore e diffonde all'interno della particella per alimentare la crescita del tubo. Questi metodi si distinguono a seconda che la particella metallica resti al suo posto o si allontani dal supporto. Nel primo caso, avrà la funzione di "base" per la crescita del tubo (meccanismo "base-growth"): il risultato finale sarà un tubo chiuso da una calotta in carbonio. Nel secondo caso, la particella resta collegata tramite il tubo (meccanismo "tip-growth"): il risultato finale sarà un tubo chiuso dalla particella di catalizzatore (lei stessa spesso ricoperta di carbonio). Vi sono inoltre casi "intermedi", in cui la particella di metallo catalizzatore funge inizialmente da base, ma resta successivamente adesa alle pareti laterali del nanotubo, venendo quindi da essa sollevata durante la crescita: in quest'ultimo caso, il risultato finale è un nanotubo con entrambe le calotte in carbonio, al cui interno resta intrappolata la particella metallica. La formazione di SWNT piuttosto che di MWNT dipende dalla tappa cineticamente determinante nel processo di crescita: se la tappa determinante (cioè la più lenta) è quella della diffusione del carbonio all'interno della particella, si avrà crescita preferenziale di MWNT, mentre se la tappa più lenta è l'alimentazione di carbonio alla particella di catalizzatore, si ha formazione preferenziale di SWNT.

Il processo di chemical vapor deposition consiste nell'espore delle particelle di metallo (ferro, nichel o cobalto), deposte su un substrato, ad una fonte di carbonio in un ambiente ad alta temperatura (circa 700 °C). Il carbonio condensa sul lato della particella esposto alla fonte, diffonde all'interno e precipita sul lato a contatto con il substrato, dando luogo a un tubo circolare di grafite il cui diametro è determinato dalla dimensione della particella metallica. Questo metodo risulta essere il più promettente per la produzione su larga scala di nanotubi. Tuttavia, dato che le temperature utilizzate sono significativamente più basse, i nanotubi prodotti con questo metodo hanno strutture di grafene meno definite (più difetti).

3.3 Metodi di deposizione dei nanotubi

I nanotubi possono essere depositati sull'elettrodo (nel caso di un sensore elettroanalitico di tipo voltammetrico) o, più in generale, sull'elemento sensibile del sensore, attraverso diversi metodi. Un possibile metodo consiste nel far crescere i nanotubi direttamente sulla superficie del substrato^{xiv}. Alternativamente, è documentata la deposizione di nanotubi per self-assembly su opportune superfici, preventivamente modificate attraverso l'uso di tioli o altri gruppi funzionali^{xv}. Una terza via, tecnologicamente più semplice, consiste nel depositare i CNT dopo averli dispersi in un opportuno solvente.

In una ricerca del 2011, Cecilia Occhiuzzi et al.^{xvi} hanno sviluppato un sensore di gas basato su un loop di rame accoppiato ad un'antenna attraverso un foglio di SWCNT (buckypaper), ottenuto per dispersione degli stessi in acqua e facendo in seguito evaporare a 70° la dispersione su una membrana di poliammide, fino ad ottenere il film. A causa della elevata superficie volumica, il film di nanotubi è molto sensibile alle impurezze presenti nell'aria; variando l'impedenza del film, viene fatta variare la frequenza dell'antenna.

Di quest'ultimo metodo tratteremo più estesamente nel capitolo relativo all'antenna oggetto di questo lavoro.

4. Antenne in microstriscia

È riportato in letteratura l'uso di nanotubi di carbonio per sostituire il canale di trasmissione nei transistor ed effetto di campo (FET) usati a scopo biosensoristico. Nel caso di biosensori elettrochimici, si può fare adsorbire la molecola sonda direttamente sulla superficie dei nanotubi, e successivamente questa reagisce in soluzione con l'analita, modificando la conduttività del gate, e quindi il segnale, in maniera proporzionale con la concentrazione dell'analita stesso^{xvii}.

L'obiettivo di questo studio è stato invece quello di indagare la possibilità di sviluppare un sensore in cui la grandezza fisica modificata non fosse la resistenza o la conduttività, ma la variazione del comportamento in frequenza di un risonatore o di un'antenna.

E' stata analizzata una antenna planare perché questa tipologia di antenne:

- presenta un basso costo di produzione;
- è di facile sviluppo;
- è facilmente riproducibile in serie;
- semplifica le successive fasi di deposizione dei nanotubi e di funzionalizzazione di questi ultimi.

Alcune delle geometrie considerate sono state il risonatore rettangolare, a disco circolare^{xviii} e ad anello aperto (SRR)^{xix}

Lee e al. hanno svolto un esteso lavoro sull'uso di risonatori ad anello aperto (split ring resonator, SRR)^{xx}. Il circuito considerato nello studio è costituito da una microstriscia millimetrica in rame realizzata su un supporto dielettrico in allumina, con una sezione centrale ad alta impedenza, a cui viene accoppiato lo split ring resonator, anch'esso in rame, ma con successive deposizioni di uno strato micrometrico di nichel (3-5 μm) e successivamente di uno strato nanometrico (0,05 μm) in oro. Per impedire che, durante la misura, la soluzione da analizzare bagni la microstriscia, tra quest'ultima e l'SRR viene deposto uno strato maschera impermeabile, dello spessore di 10-20 μm . La superficie in oro del risonatore viene trattata con proteina G mediata con cisteina3 in tampone PBS e poi funzionalizzata con anticorpo anti-PSA. In questo studio è stata sfruttata la particolare geometria del risonatore per migliorare la sensibilità del sensore, rispetto ad un risonatore con configurazione circolare o quadrata.

In precedenti studi, lo stesso Lee ha indagato le potenzialità dell'uso dei nanotubi di carbonio come elementi biosensoristici, utilizzando substrati di Cu con microdeposizioni di Au. Lee ha sviluppato nel 2008^{xxi} un risonatore con un circuito LC interdigitato, sul cui gap, di lunghezza di 10 μm , vengono depositi via CVD dei nanotubi di carbonio, che fungono da bridge per il risonatore. Lo studio ha dimostrato l'efficacia dei CNT nel legare, una volta funzionalizzati, complessi organici (es: biotina + streptavidina). Tuttavia, i diversi passaggi coinvolti nel processo (la costruzione di un circuito LC interdigitato con successiva microdeposizione CVD di oro con opportuna maschera, la deposizione via CVD di singoli nanotubi orientati, utilizzati come "ponte" elettrico del gap) rendono il sistema tecnologicamente complesso e costoso.

In uno studio del 2012, Mohammadi e al.^{xxii} hanno mostrato la possibilità di utilizzare un'antenna circolare per lo sviluppo di un sensore. L'antenna è costituita da due strati di materiale dielettrico (FR-4) posti a contatto.

Sullo strato superiore è ricreato un risonatore circolare senza collegamento di ground. Tra i due strati è ricavata una linea di trasmissione conduttiva, come feedline. Infine, sullo strato inferiore vi è il piano di ground, conduttivo. Un connettore SMA è collocato tra i due strati, e uno strato di MW-CNT (5-10 μ m di spessore) è deposto fisicamente tramite *conductive epoxy method*. L'antenna, con una frequenza di lavoro pari a 4,8 GHz quando il risonatore circolare è esposto all'aria, ha mostrato uno shift di 100 MHz dopo aver coperto il risonatore con etanolo.

Uno dei vantaggi di questa configurazione è che il circuito non entra in contatto diretto col risonatore ed il suo ambiente, quindi è più semplice far lavorare l'antenna in ambiente umido (per permettere l'isolamento fisico del risonatore dal resto del circuito, sul circuito viene incollata una maschera di plastica di spessore 2 cm e forma circolare). Tuttavia, il lavoro presentato non dà alcuna informazione sullo stato reale dei nanotubi nella matrice di resina epossidica. Non essendo stata riportata nessuna microscopia della superficie dei CNT, non c'è nessuna prova che i nanotubi siano esposti, e che possano quindi essere funzionalizzati per i nostri scopi.

In questo lavoro di tesi, si considera un'antenna in microstriscia sviluppata nel 2016 da Savi, Naishadham, Bayat e Giorcelli^{xxiii}, basato su uno studio teorico sul tuning di antenne in microstriscia condotto da Naishadham nel 2014^{xxiv}. L'antenna (Fig.4.1) è realizzata su FR4 di spessore 1,56 mm (isolante composito a base di resina epossidica e fibra di vetro), a doppia faccia. Sullo strato superiore è realizzata, tramite un processo litografico con maschera, l'antenna, costituita da un patch rettangolare, la linea di alimentazione inset-feed^{xxv}, ed una linea con una apertura (gap) su cui viene depositato il film di nanotubi di carbonio con la tecnica dello screen printing. L'estremità dello stub è in cortocircuito.

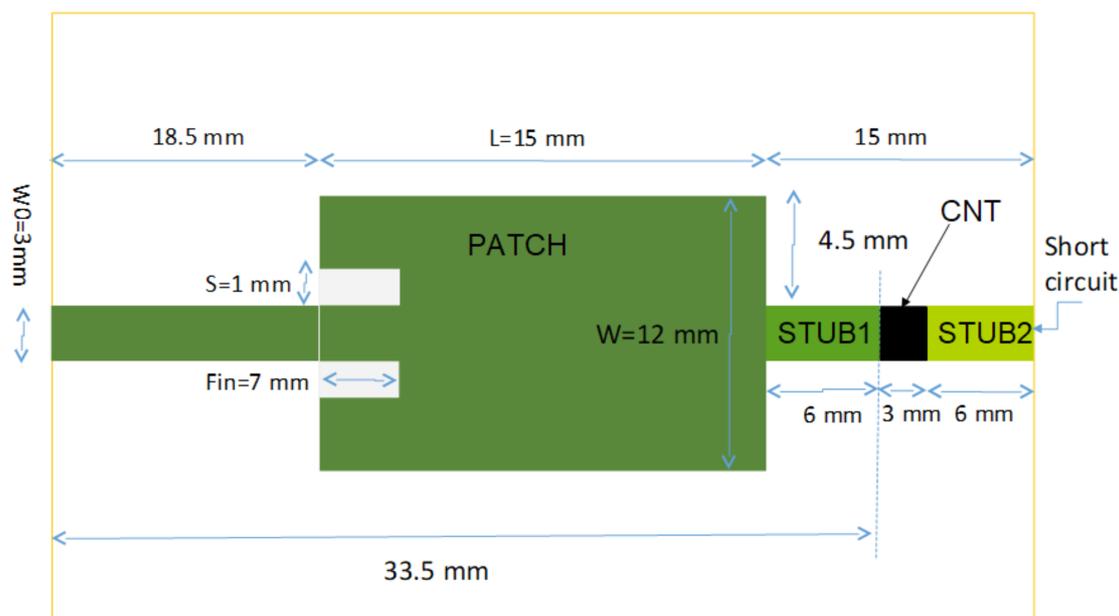


Figura 4.1: Layout dell'antenna utilizzata.

L'inchiostro per il film di CNT è stato ottenuto seguendo una procedura introdotta da J.H. Park^{xxvi} nel 2008. L'inchiostro è ottenuto disperdendo dell'etil-cellulosa (Sigma Aldrich, viscosità 10 cP, 5% toluene/etanolo, 48% etossi, utilizzata come binder), del terpineolo (usato come solvente, per garantire la necessaria viscosità all'inchiostro), e nanotubi multi-walled, produttore Nanothinx (Grecia), con diametro 25-45 nm e lunghezza superiore ai 10 µm. La dispersione è stata quindi mescolata per 2 ore e sonicata per 15 ore. Infine, per ottenere la corretta viscosità, l'etanolo è stato fatto evaporare a bassa pressione. La composizione finale dell'inchiostro è: MW-CNT (12,5%), etil-cellulosa (9,4%) e terpineolo (78,1%). Dopo la deposizione del film di CNT, la frequenza di risonanza dell'antenna ha una variazione di 230MHz, pari al 5% rispetto alla frequenza iniziale (da 4,36 GHz a 4,13 GHz).

Nel presente lavoro, partendo da questi risultati, si è analizzata la possibilità di funzionalizzare i nanotubi depositati sull'antenna ed utilizzare quindi tale antenna come biosensore.

Si è scelto di basarsi su uno studio preesistente, per poter focalizzare il lavoro sullo studio dei risultati che dipendono esclusivamente dalla funzionalizzazione; infatti, essendo già stata precedentemente dimostrato e studiato il comportamento di questa antenna, ogni variazione rispetto al modello può essere più facilmente ricondotta alle reazioni avvenute in fase di funzionalizzazione o di misura.

5. Il lattato: metabolismo cellulare e rilevanza dei suoi livelli nel contesto medico e diagnostico

L'acido lattico è una molecola di fondamentale importanza nel metabolismo cellulare anaerobico. In assenza di ossigeno, o quando le sue concentrazioni ematiche sono inferiori alla richiesta metabolica aerobica, subentra infatti il metabolismo anaerobico lattacido, del quale l'acido lattico è un sottoprodotto. Nel metabolismo anaerobico, il glucosio viene scisso in piruvato, dopo di che il piruvato viene ridotto a L-lattato durante una reazione redox mediata da enzimi, che contemporaneamente ossida la nicotinammide adenina dinucleotide (NADH), rigenerandola. A pH fisiologici, l'acido lattico si presenta sotto forma di ione L-lattato. Il livello medio di lattato nel sangue varia in genere tra gli 0,5 agli 1,5 mmol/l, a riposo, ma in caso di esercizio intenso può arrivare fino a 25 mmol/l^{xxvii}. Il lattato è un composto tossico per le cellule: per questo motivo, l'organismo ha sviluppato dei meccanismi di difesa per ridurre i livelli, come la possibilità di riconvertirlo in glucosio, all'interno del fegato; inoltre, il miocardio può metabolizzarlo direttamente a scopo energetico. Per questi motivi, anche in caso di attività fisica intensa, i valori ematici vengono ristabiliti dopo 1-2 minuti, mentre i livelli di acido lattico muscolare possono permanere per alcune ore. Un suo aumento rispetto ai valori di riferimento, oltre ad essere un indice di affaticamento muscolare, può essere correlato alla presenza di patologie a livello epatico o di altro genere. Inoltre, la sua misura può essere utilizzata come un indice dell'equilibrio acido-base del sangue, nei casi di iperlattatemia, di sepsi, arresto cardiaco, per la diagnosi dell'insufficienza renale, dell'ipossia, infarto intestinale (per citarne alcuni). La sua misura rientra inoltre tra i controlli di routine nell'industria della lavorazione dei prodotti caseari, per rilevare lo stato di conservazione del latte. Appare quindi evidente l'importanza del controllo dei suoi livelli ematici, nel contesto medico, diagnostico e della produzione di prodotti derivati dal latte^{xxviii}.

Tra i possibili metodi, i più utilizzati, fino a pochi anni fa, erano quelli cromatografici. Tuttavia, questi presentano molti svantaggi: sono poco specifici, hanno una bassa sensibilità, sono costosi, richiedono molto tempo e personale specializzato. Per questi motivi, nel corso dell'ultimo decennio sono state sviluppate diverse alternative, attraverso l'uso di biosensori di tipo elettrochimico. In media, questi metodi hanno mostrato tempi di misura variabili dai 3 ai 180 s, lavorando a temperature comprese tra i 22°C e i 37°C e pH 5,5-8,5, e capaci di misurare concentrazioni che vanno dai 10 ai 2000 mM^{xxix}.

Sono stati sviluppati diversi sensori, capaci di rilevare concentrazioni nell'ordine dei millimolari: in uno studio del 2007, Huang et al.^{xxx} hanno sviluppato un sensore per il lattato basato su un elettrodo di carbonio vetroso su cui è stato depositato un film di MW-CNT attraverso un metodo sol-gel, ottenendo un limite di rilevamento di 0,3 μMol , con un range lineare fino a 1,5mMol; tuttavia, la sensibilità ottenuta è stata di solo 2.1 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

In uno studio del 2011, Boero, Carrara et al.^{xxxi} hanno effettuato la funzionalizzazione, con enzima lattato ossidasi, di MWCNT depositati attraverso una sospensione in cloroformio su un elettrodo di carbonio vetroso, ottenendo una sensibilità di 40 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

In uno studio del 2003, Taurino, Reiss et al.^{xxxii} hanno dimostrato la possibilità di effettuare l'adsorbimento diretto di enzima lattato ossidasi, senza l'uso di intermedi chimici, su MWCNT modificati con gruppi carbossilici, i quali erano a loro volta adsorbiti non covalentemente su un elettrodo di grafite. È stato riscontrato che i migliori risultati in termini di stabilità

dell'adsorbimento e di limite di rilevamento (LOD) si ottengono con enzimi etichettati con istidina (hanno una maggiore affinità con i gruppi carbossilici dei CNT). Nel loro studio, l'elettrodo funzionalizzato è stato utilizzato come biosensore di tipo amperometrico.

Nel presente lavoro, invece, viene studiata la resa della funzionalizzazione dei nanotubi per un sensore basato su un differente metodo di trasduzione del segnale, ovvero un risonatore elettrico basato sullo schema di un'antenna in microstriscia.

6. Preparazione antenne: screen printing e funzionalizzazione

La percentuale di CNT nello slurry utilizzato per lo screen printing del dispositivo è limitata dalle caratteristiche reologiche e di stabilità dell'inchiostro stesso. Infatti, per garantire un valore ottimale di viscosità e contemporaneamente evitare l'agglomerazione dei nanotubi di carbonio, è richiesta una percentuale minima di binder. Le proporzioni in gioco possono variare a seconda delle caratteristiche di affinità chimica dei componenti coinvolti, delle loro viscosità intrinseche e, non ultimo, del tipo di applicazione per cui viene prodotto lo slurry. In genere, per lo screen printing di un inchiostro contenente nanotubi di carbonio, la carica può oscillare dallo 0,1% ad un massimo del 40%, in peso, considerando la viscosità richiesta durante il suo stampaggio, e per garantire una corretta adesione al substrato (inteso in senso elettronico, ovvero il rame dell'antenna e la base di FR4); è stato inoltre dimostrato che l'uso di solventi basso bollenti migliora le caratteristiche finali di adesione del film; questo perché un solvente con un basso punto di ebollizione permette di essere rimosso anche a temperature minori, per le quali la viscosità degli altri componenti (nello specifico, del binder) subisce variazioni minori^{xxxiii}. Il risultato finale, quindi, è che con un solvente basso bollente la viscosità netta complessiva dell'inchiostro aumenta molto più rapidamente, garantendo quindi una migliore stabilità dimensionale del film. Lo stesso studio ha dimostrato che un solvente con un basso punto di ebollizione porta alla formazione di film che mostrano una migliore conducibilità superficiale.

6.1 Test preliminari per il tipo e la percentuale di binder ottimali

Per determinare la composizione ottimale dell'inchiostro a base di nanotubi di carbonio, sono state confrontate diverse combinazioni di binder e di solventi, per differenti concentrazioni di nanotubi.

Sono state effettuate delle deposizioni di film di forma quadrata, a base di nanotubi di carbonio, su piastre di FR4 (Fig.6.1; i film utilizzati per questo lavoro sono quelli contrassegnati dai numeri 1 e 3 del batch A e dai numeri 1 e 3 del batch B).

Per i test sono stati utilizzati dei nanotubi MW6 (nanothinx NTX-1, diametro 18-35 nm, lunghezza nominale superiore ai 10 micron).

Si riportano in tabella 6.1 le composizioni per alcuni dei test, correlate da analisi FESEM delle superfici, svolte dopo il processo di fissaggio. Il fissaggio del film alle piastre è stato ottenuto attraverso un curing di 150 minuti a 120° C.

L'uso di acidi grassi (olio di ricino, acido linoleico) o di surfattanti (Tween 20) ha uno scopo emulsionante nei confronti del binder (Etil-cellulosa, poli-metil-metacrilato) e dei nanotubi.

Sia la dimetil-formammide che l' α -terpineolo sono solventi, che servono a garantire all'inchiostro le giuste caratteristiche di viscosità e bagnabilità del substrato, e vengono eliminati durante il curing. Una viscosità troppo elevata può rendere più difficile una corretta stampa del film. Peraltro, anche una viscosità troppo bassa può essere deleteria, perché causa la perdita della stabilità dimensionale della figura stampata. Per questo motivo bisogna anche tenere conto di come varia la viscosità dell'inchiostro nelle diverse fasi dello stampaggio e del curing.

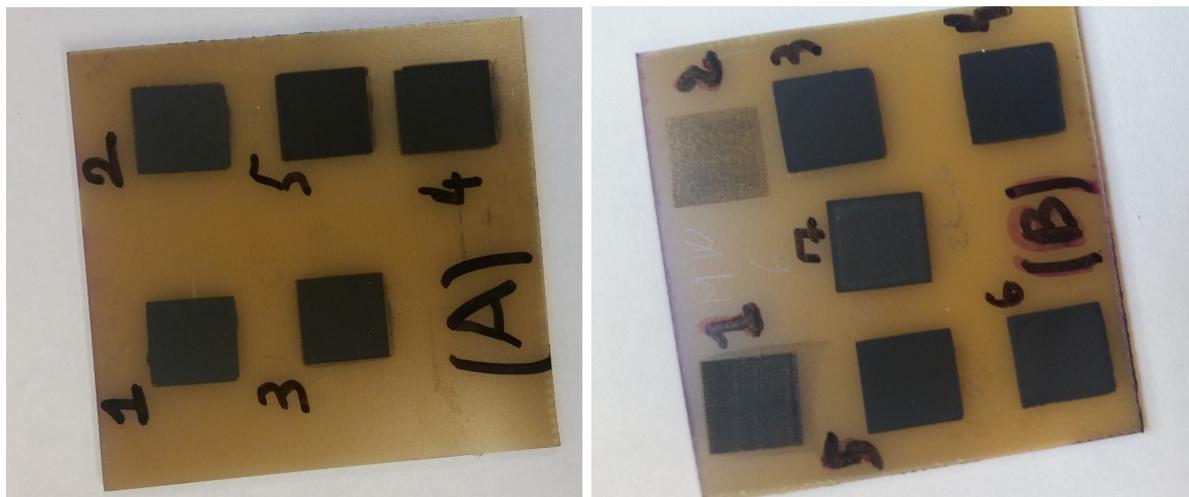


Figura 6.1: film contenenti nanotubi NTX-1, depositati su piastre FR4.

Tabella 6.1: composizione degli inchiostri per screen printing utilizzati nei test preliminari.

	Fig. 6.2a	Fig. 6.2b	Fig. 6.2c	Fig. 6.2d
CNT-MW6	8,8 wt%	12,5 wt%	3,0 wt%	12,5 wt%
Olio di ricino*	11,6 wt%	-	-	-
Ac. linoleico	-	4,5 wt%	-	-
PMMA	-	-	12 wt%	-
Tween 20	8,5 wt%	-	-	-
Etil-cellulosa (10 cP)	7,1 wt%	8,3 wt%	-	9,5 wt%
Dimetil-formammide	-	-	85 wt%	-
α -Terpineolo	64 wt%	74,2 wt%	-	78 wt%
Co (NO ₃) ₂	-	0,5 wt%	-	-
Tempo di sonicazione	16 h	16 h	4 h	16 h
Osservazioni	dispersione uniforme	agglomerati	fori nel film (cattiva adesione)	dispersione uniforme

La temperatura di ebollizione dell' α -Terpineolo è di 80-81.5 ° C ad una pressione di 5 mmHg, mentre la sua temperatura di fusione è di -36,4 °C^{xxxiv}. La temperatura di fusione della DMF è invece di -60,3 °C, e la sua temperatura di ebollizione è di 152,8 °C^{xxxv}. È ipotizzabile, sulla base delle osservazioni riportate nel paragrafo precedente, che a causa di queste differenze

*Composizione olio di ricino: trigliceridi dell'acido ricinoleico + acido linoleico + acido α -linoleico + acido oleico + acido stearico

l'inchiostro per l'antenna in fig.6.2c abbia raggiunto una viscosità molto bassa in fase di curing, prima che la reticolazione del binder fosse completata, e che questo abbia potuto causare una dispersione disomogenea del binder lungo la superficie dell'FR4, causando i fori nel film evidenziati in figura.

Per quanto riguarda gli altri campioni, si nota dalle immagini al FESEM (figure 6.2a-b) che, pur in presenza di un buon livello di dispersione dei nanotubi, il loro spessore appare maggiore del previsto. Questo si spiega con l'adsorbimento, da parte dei nanotubi, degli acidi grassi presenti nella composizione dell'inchiostro. Per una corretta funzionalizzazione dei nanotubi, è preferibile che questi ultimi siano esposti il più possibile. Per questo motivo, è preferibile evitare l'uso di disperdenti, perché si legano alla superficie dei nanotubi e potrebbero interferire con la successiva funzionalizzazione.

Per lo screen printing delle antenne, si è quindi preferito basare la composizione dell'inchiostro su quella del test in figura 6.2d; è stato cioè utilizzato il 9,5 wt% di etilcellulosa 10 cP, come binder, mentre sono state utilizzate diverse percentuali di nanotubi, per indagare quale fosse l'intervallo di concentrazione utile per ottenere le caratteristiche elettriche richieste per il corretto funzionamento dell'antenna.

6.2 Misure sulle antenne non funzionalizzate

Sono state analizzate quattro antenne, a differenti concentrazioni di nanotubi. I nanotubi utilizzati sono stati, in 3 casi, del tipo MW6 (Nanothinx NTX-1) ed in un caso, del tipo E15 (Nanothinx-3). Le caratteristiche dei due tipi di nanotubi sono riportate in tabella 6.2.

Tabella 6.2: caratteristiche dei nanotubi utilizzati.

Sigla	Nanotubi	Diametro (nm)	Lunghezza (μm)
MW6	Nanothinx NTX-1	18-35	> 10
E15	Nanothinx NTX-3	25-45	> 10

Per comodità di esposizione, d'ora in avanti ci riferiremo alle antenne con un codice identificativo, composto dalla sigla dei nanotubi presenti e dalla loro percentuale in peso nella composizione dell'inchiostro utilizzato per il film. Ad esempio, per riferirci all'antenna su cui è stata effettuata una deposizione con un inchiostro contenente CNT di tipo MW6 al 12,5 w%, useremo il codice M12.5, mentre ci si riferirà all'antenna con deposizione di inchiostro con nanotubi E15 al 4,0 w% con il codice E04.0.

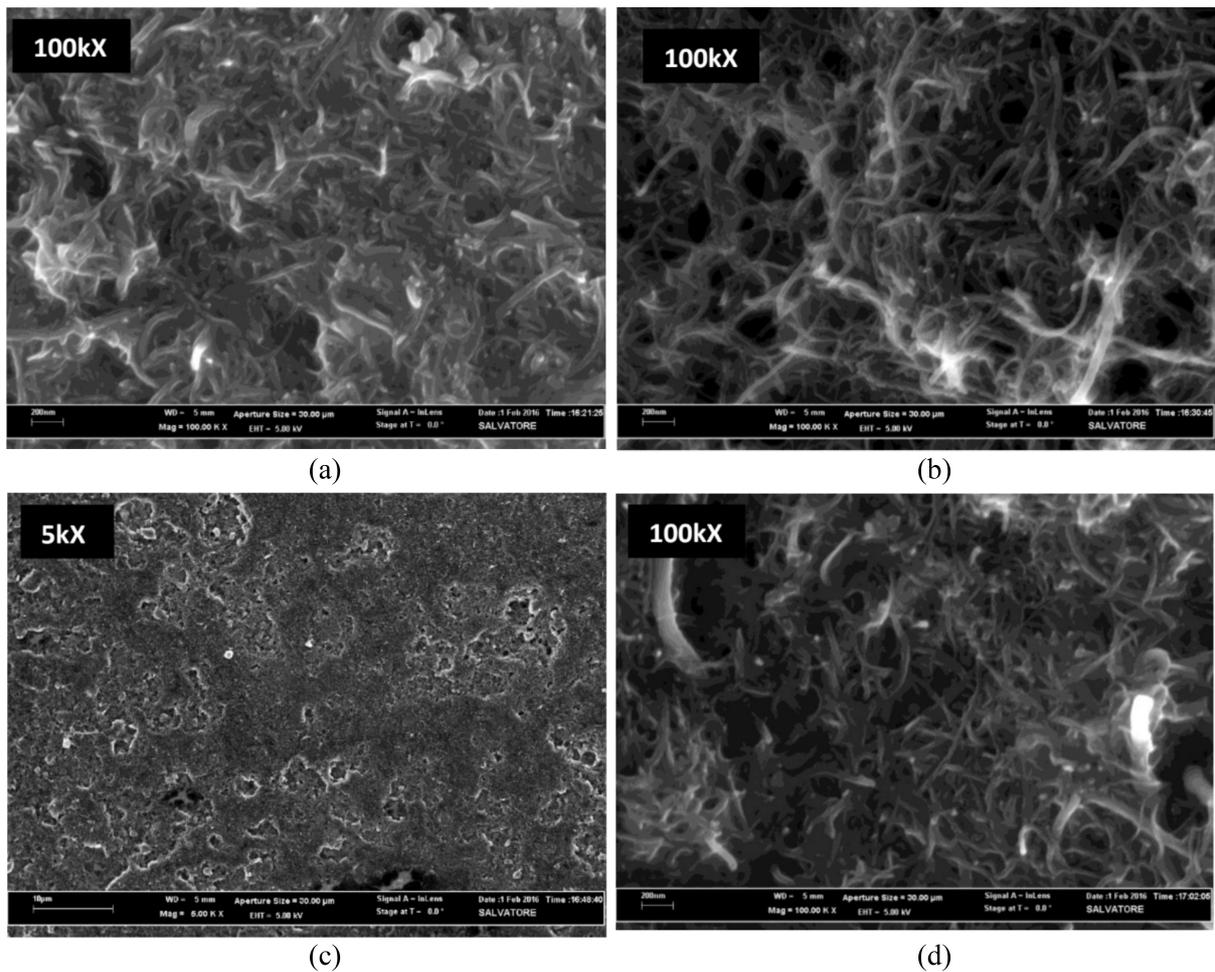


Figura 6.2: Immagini FESEM dei film analizzati nelle fasi preliminari di questo lavoro. Le composizioni degli inchiostri utilizzati sono riportate in tabella 6.1.

6.2.1 Misure elettriche (DC e in frequenza)

Per prima cosa, è stata misurata per ciascuna antenna, la resistenza in corrente continua (DC), utilizzando un multimetro digitale Agilent 34401a. Quindi sono state effettuate le misure in frequenza, utilizzando un analizzatore di rete, per monitorare come variava il profilo di risonanza al variare della carica di nanotubi. I valori ottenuti sono stati quindi confrontati con quelli che si hanno per alcuni modelli di circuito, senza nanotubi: circuito solo patch, circuito patch + stub, circuito patch + stub + binder. In figura 6.3 vengono comparati i grafici relativi alle differenti configurazioni, mentre i valori numerici relativi ai rispettivi picchi sono sintetizzati nelle tabelle 6.3 e 6.4.

Il solo patch presenta una risonanza di -16 dB a $4,87 \pm 0,01$ Ghz. L'antenna costituita da patch + stub mostra una risonanza di pari entità, ma a $4,12 \pm 0,01$ GHz. Con l'aggiunta del binder etil-cellulosa, senza nanotubi, l'antenna mostra un'ulteriore diminuzione della frequenza di risonanza di 70 ± 10 MHz, e di $-12,8$ dB di intensità.

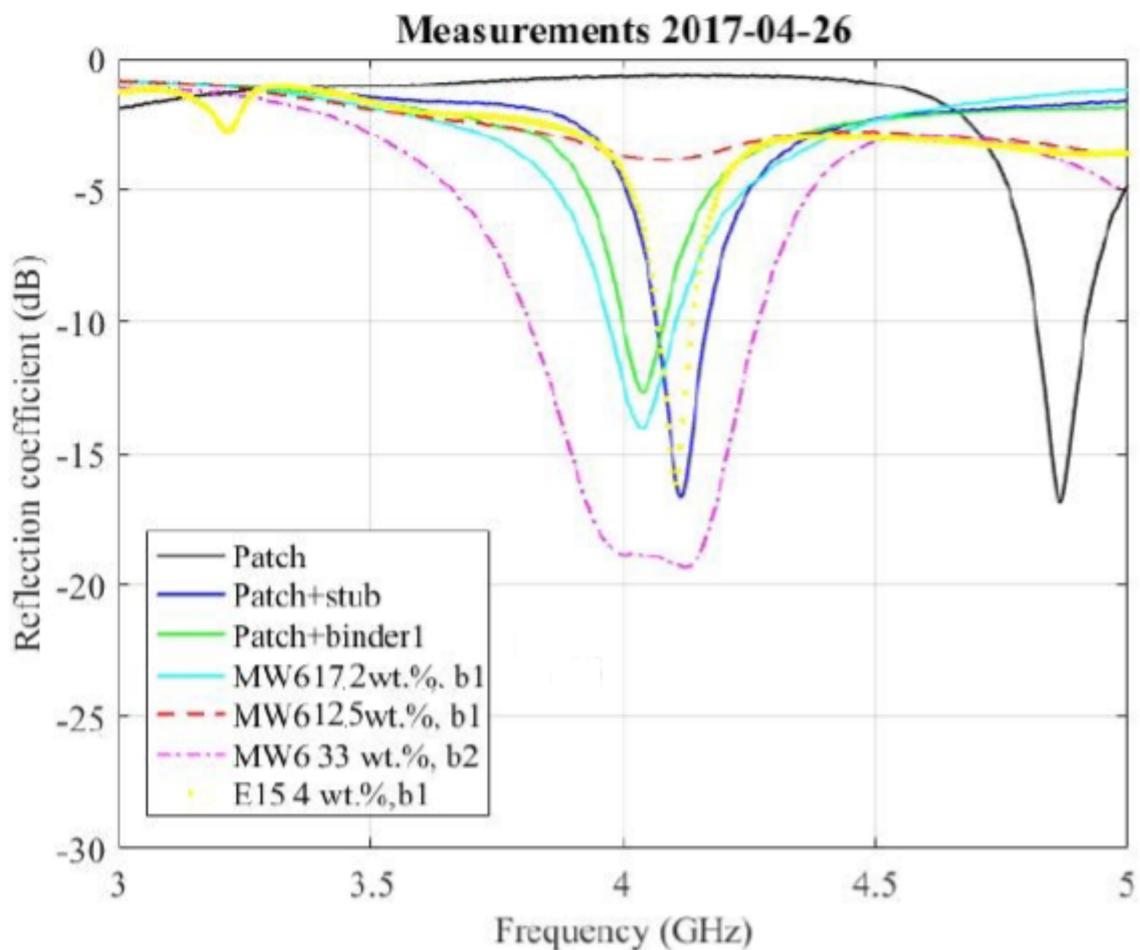


Figura 6.3: Grafico del coefficiente di riflessione in funzione della frequenza per le antenne con i film di nanotubi, confrontati con i modelli di antenna senza film.

L'antenna M17.2 (quella con il 17,2 % in peso di nanotubi MW6) ha riportato una resistenza di 136 k Ω , mentre quella con carica iniziale del 33% ha riportato una resistenza di 3,9 k Ω (35 volte inferiore). Come prevedibile, una maggiore percentuale di nanotubi nell'inchiostro per screen printing si risolve in un abbassamento della resistenza in regime continuo (ovvero, in un aumento della conducibilità). Ciò è anche confermato dall'antenna E04.0: in questa antenna, la carica iniziale di nanotubi di tipo E15 è pari al 4 % in peso; in questo caso non è stato possibile misurare la resistenza in regime DC, perché è risultata essere superiore al fondo scala (circuito aperto). Per ultimo, l'antenna M12.5, pur riportando nominalmente una carica inferiore alle precedenti, ha mostrato una resistenza in regime DC di soli 0,4 k Ω .

L'analisi in frequenza ha confermato il comportamento delle antenne E04.0 e M12.5.

L'antenna E04.0, di cui la risposta in frequenza è riportata con puntini blu in figura 6.4, si comporta come un circuito aperto: mostra infatti una risonanza primaria di 15 dB, a frequenza invariata rispetto a quella del circuito costituito da solo patch + stub di 6 mm (in nero nella suddetta figura). Si osserva inoltre la presenza di risonanze secondarie.

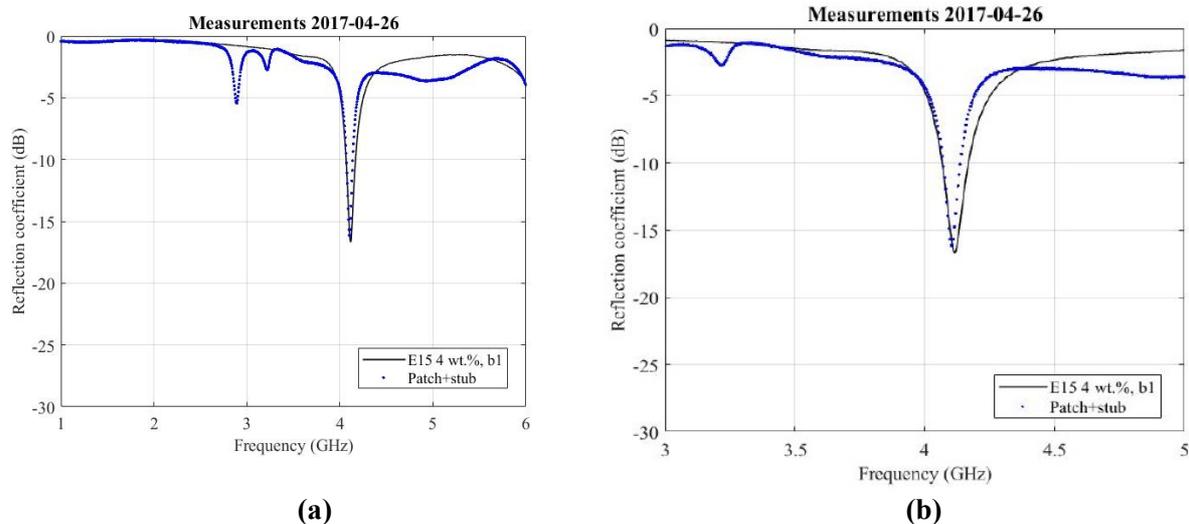


Figura 6.4: Grafico del coefficiente di riflessione in funzione della frequenza per l'antenna E04.0, confrontata con il modello patch + stub (a); particolare dei picchi di risonanza (b).

Come evidenziato dalla risposta in frequenza in figura 6.3, L'antenna M17.2 mostra uno shift nella risonanza, rispetto alla frequenza di risonanza del modello patch + stub, comparabile con la frequenza di risonanza propria del modello patch + stub + binder non caricato (etil-cellulosa). Rispetto a quest'ultimo modello, la risonanza (ovvero l'attenuazione del coefficiente di riflessione) aumenta in intensità di circa 1 dB.

Rispetto all'antenna M17.2, la M33.0 ha un picco molto più intenso, che risulta però molto allargato. Dal confronto delle risposte in frequenza, in figura 6.5b, è evidente che quest'ultimo risulta probabilmente dalla sovrapposizione di almeno due contributi. Inoltre, anche in questo caso si evidenziano picchi di risonanza secondari, non previsti.

L'antenna M12.5, che in regime continuo aveva mostrato una resistenza molto ridotta (0,4 k Ω), riporta all'analisi in frequenza una risonanza praticamente indistinguibile con il rumore di fondo, comportandosi a tutti gli effetti come un corto circuito.

Tabella 6.3: caratteristiche di risonanza dei modelli di antenne senza CNT.

	Patch	Patch + stub	Patch + stub + binder
F. risonanza (GHz)	4,87 \pm 0,01	4,12 \pm 0,01	4,05 \pm 0,01
Gain (dB)	-16,8 \pm 0,2	-16,8 \pm 0,2	12,8 \pm 0,2

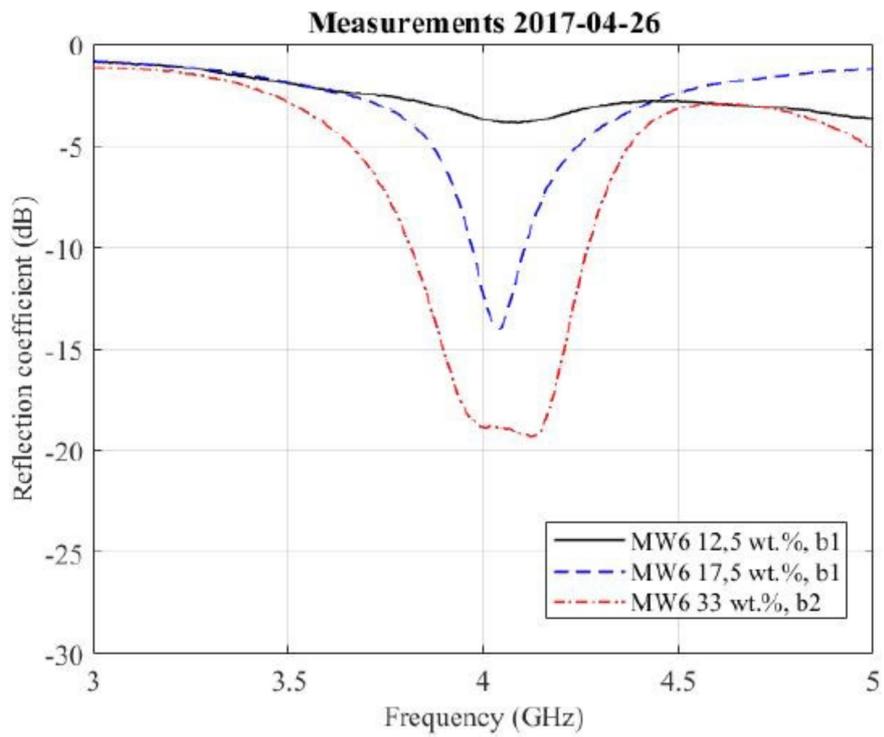
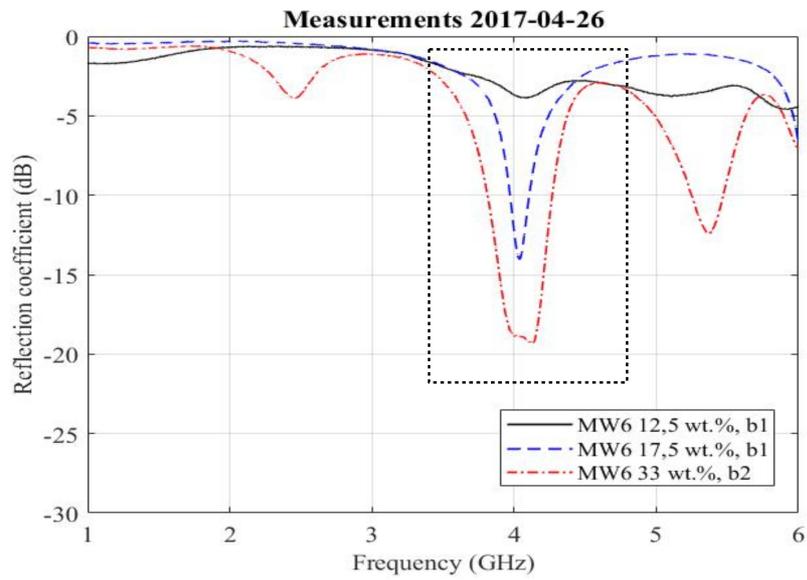


Figura 6.5: Grafico del coefficiente di riflessione in funzione della frequenza per le antenne M12.5, M17.2 ed M33.0(a); particolare dei picchi di risonanza (b).

Tabella 6.4: composizione del film deposto sulle antenne e caratteristiche di risonanza.

ID	M17.2	M12.5	M33.0	E04.0
CNT	MW6	MW6	MW6	E15
w% CNT	17,2w%	12,5w%	33w%	4w%
Binder	Etil-cellulosa	Etil-cellulosa	P.-vinilbutirrale	Etil-cellulosa
w% Binder	9,5w%	9,5w%	6w%	9,5w%
Resistenza (k Ω)	136 k Ω	0,4 k Ω	3,9 k Ω	(superiore al fondo scala)
F. risonanza (GHz)	4,05 \pm 0,01 GHz	assente	4,07 \pm 0,07 GHz	4,11 \pm 0,01GHz
Gain	-14,1 \pm 0,2dB	assente	-19,3 \pm 0,2dB	-16,5 \pm 0,2dB
Note	Risonanza definita.	Corto circuito.	Risonanza allargata: (-15dB) probabile sovrapposizione di due picchi.	Circuito aperto, risonanza identica al modello PATCH + STUB.

6.2.2 Microscopia FESEM

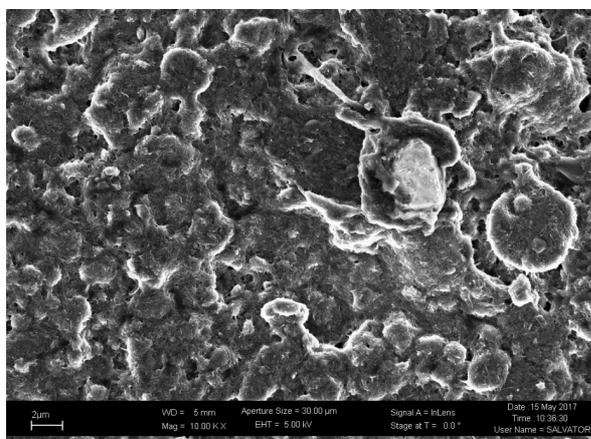
Attraverso le misure elettriche, è stato possibile individuare quali antenne presentano le caratteristiche di risposta in frequenza necessarie per il loro utilizzo come sensori bioelettronici. Le immagini ottenute attraverso la microscopia FESEM hanno confermato, giustificandole, le proprietà riscontrate, e aprendo uno spunto per alcune considerazioni qui di seguito enunciate e che verranno poi riprese nel capitolo conclusivo di questo lavoro.

Con un primo ingrandimento di 10 kX è stato possibile osservare la morfologia del film a livello microscopico (figura 6.6) e selezionare il punto più adatto per l'analisi della dispersione dei nanotubi, da effettuare con un ingrandimento superiore, tale da poter apprezzare lo spessore dei nanotubi, dell'ordine di pochi nanometri. I film presentano una superficie rugosa ma continua, composta da agglomerati del binder. L'antenna M12.5 mostra a questo ingrandimento delle crepe micrometriche nella matrice (larghezza 10 μ m, lunghezza 100-200 μ m).

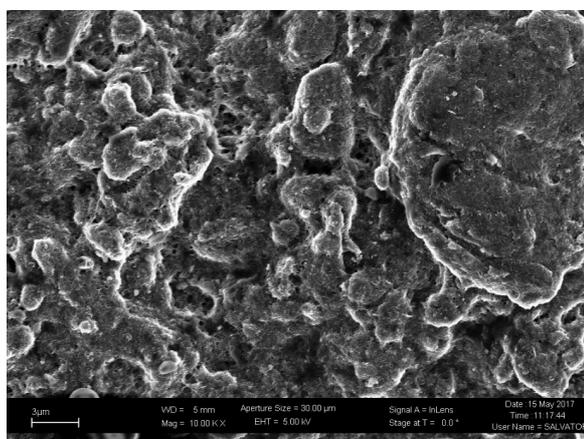
L'analisi al FESEM dei film deposti sulle antenne M17.2 e M33.0 ha mostrato una fitta presenza, sulla superficie, di nanotubi esposti, di diametro variabile tra i 20 e i 50nm (figura 6.8a-b). Come prevedibile, l'antenna con carica iniziale maggiore nell'inchiostro utilizzato mostra una concentrazione superiore di nanotubi; questi, inoltre, mostrano esposti sia le superfici laterali che le punte: questo fattore è preferibile, in linea teorica, perché la funzionalizzazione è più efficace in corrispondenza di difetti, che sono più numerosi sulle punte dei nanotubi.

La superficie del film dell'antenna E04.0 (figura 6.7) mostra pochi CNT, radi, esposti solo parzialmente, più fitti solo in corrispondenza del bordo del film, probabilmente per effetto della maggiore degradazione del binder ai bordi, oppure dovuto ad una segregazione anisotropa dei nanotubi col binder. Tale concentrazione di nanotubi risulta insufficiente per permettere la

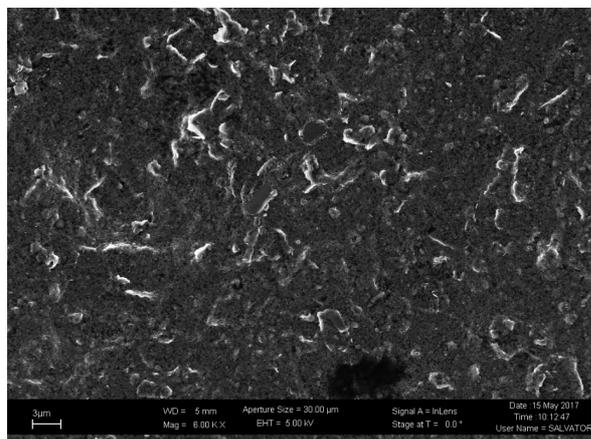
percolazione elettronica. Questo risultato collima perfettamente con quello ottenuto attraverso le misure elettriche: l'antenna funziona come un circuito aperto, ed il film non ne altera le caratteristiche elettriche.



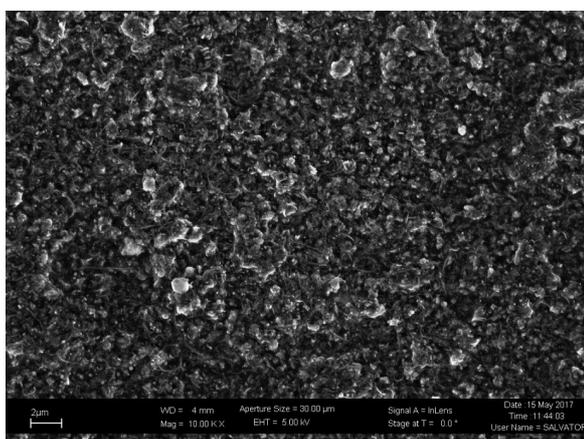
(M12.5)



(M17.2)



(E04.0)



(M33.0)

Figura 6.6: Immagini dei film depositi sulle quattro antenne, ottenuti con il microscopio ottico.

Il film depositato sull'antenna M12.5 (mostrato in figura 6.9) evidenzia zone molto ricche di nanotubi superficiali e la quasi totale assenza di polimero. I nanotubi esposti hanno in media uno spessore apparente inferiore rispetto agli altri film (15-30 nm), ulteriore segnale della minore presenza di binder polimerico residuo. Anche questo risultato concorda con il comportamento elettrico registrato per l'antenna. A causa della concentrazione così elevata di nanotubi, l'antenna si comporta come un cortocircuito. Questo abbassa il picco di risonanza, rendendo l'antenna non utile per i nostri studi. Possiamo notare che, per questa antenna, la concentrazione iniziale di nanotubi nell'inchiostro usato per lo screen printing era inferiore alle concentrazioni utilizzate per le antenne M17.2 ed M33.0. Ci si sarebbe aspettata una correlazione tra la carica iniziale, prima del curing, e la densità superficiale di nanotubi alla fine del trattamento. Questa discrepanza può essere dovuta ad una differente degradazione del binder in fase di curing, oppure ad una diversa distribuzione dei nanotubi (che potrebbero essersi, in questo caso, concentrati maggiormente sulla superficie del film). Quest'ultima opzione richiederebbe un'analisi distruttiva sulle antenne, per controllare che la densità di

nanotubi non vari lungo lo spessore del film. Si è scelto quindi di proseguire l'indagine sulle due antenne che presentano buone caratteristiche elettriche ed una sufficiente densità di nanotubi esposti sulla superficie.

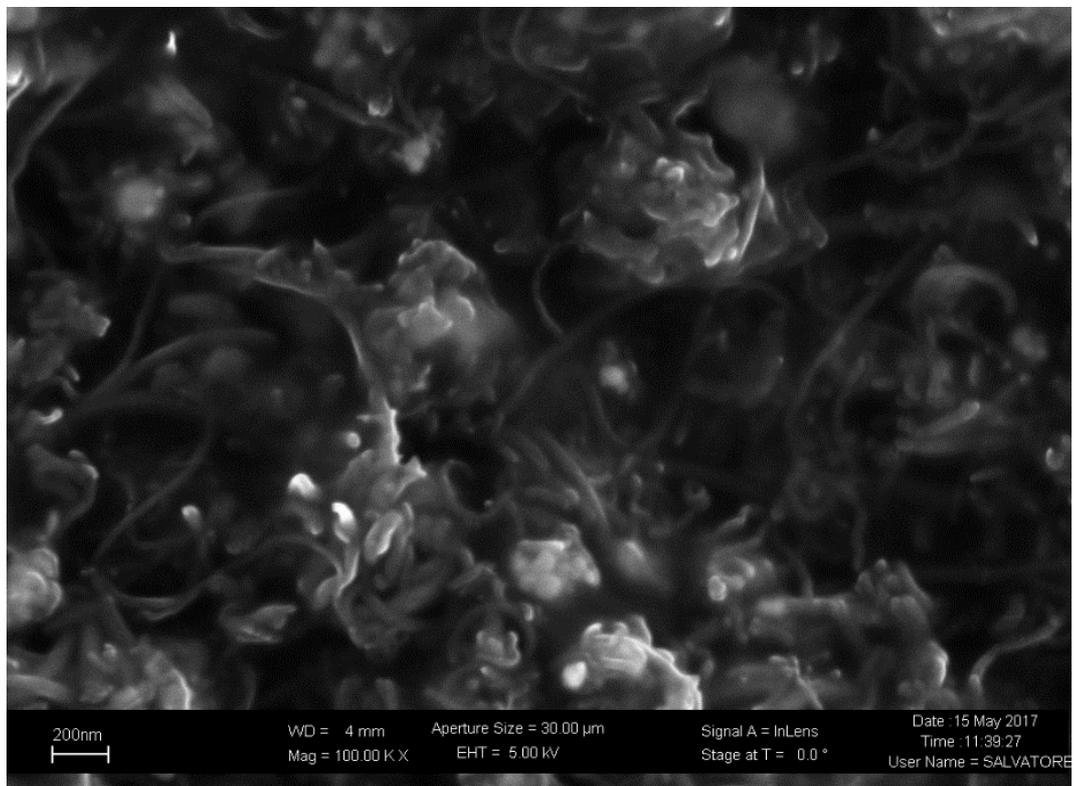
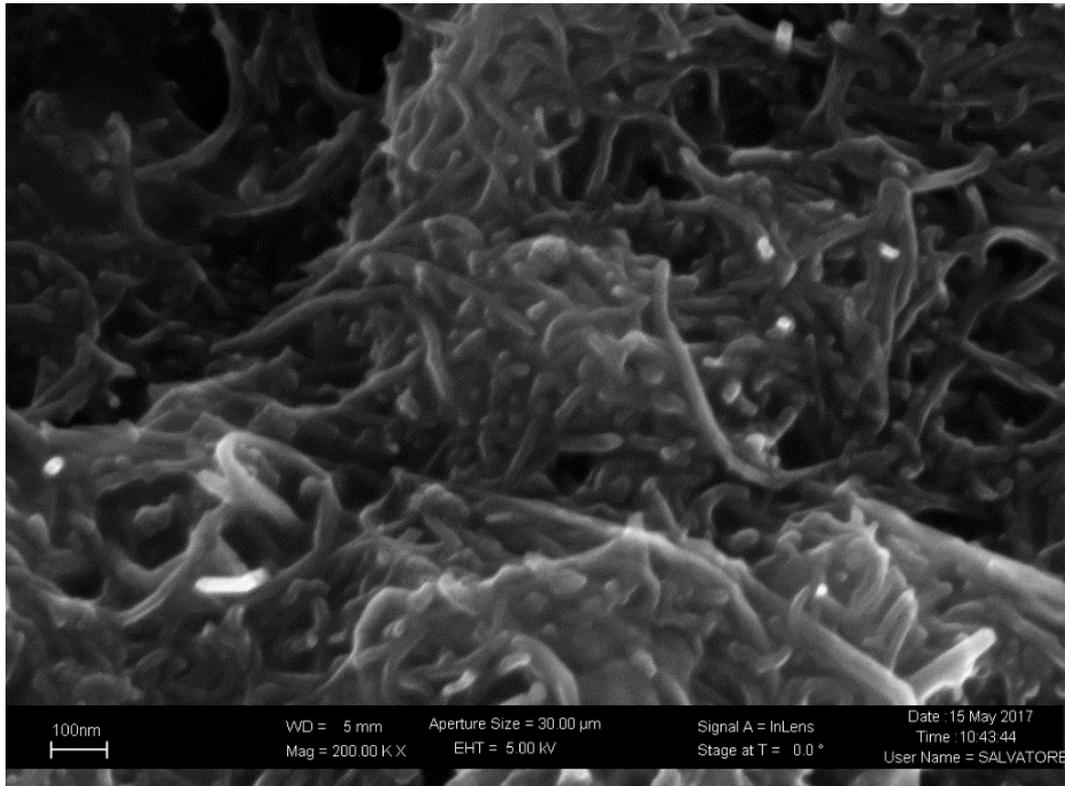
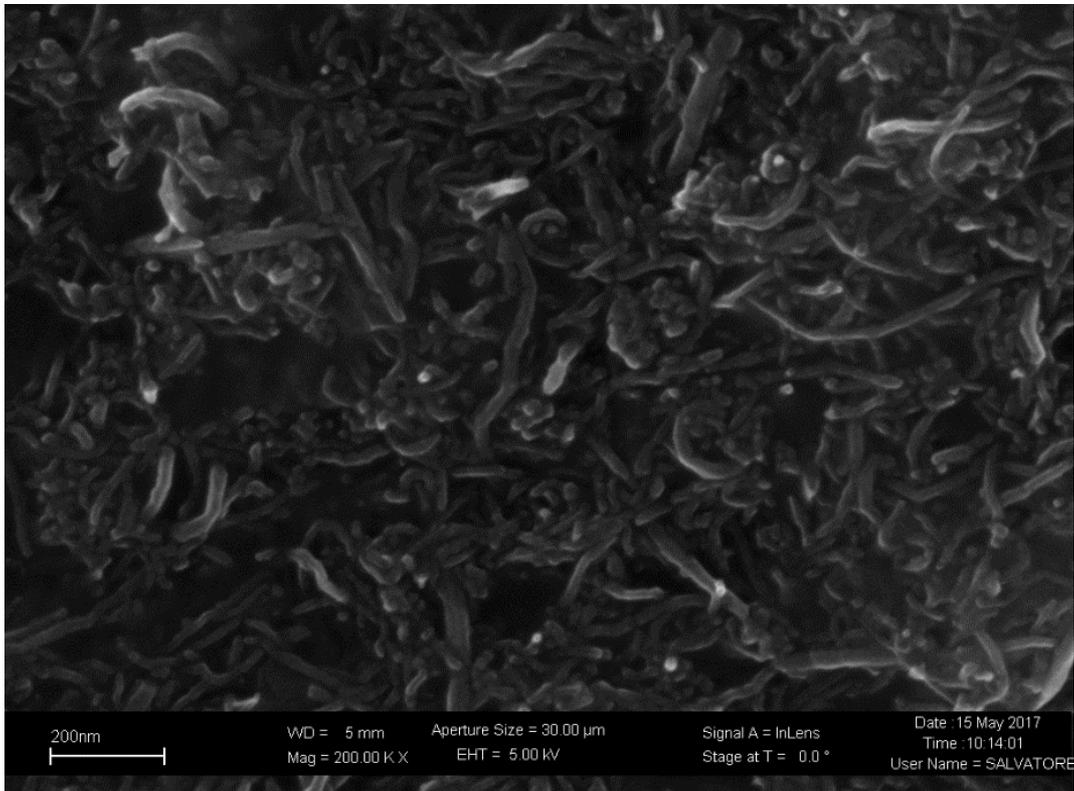


Figura 6.7: Immagine FESEM dei film depositi sull'antenna E04.0.



(a) M17.2



(b) M33.0

Figura 6.8: Immagini FESEM dei film depositi sulle antenne M17.2 (a) e M33.0 (b).

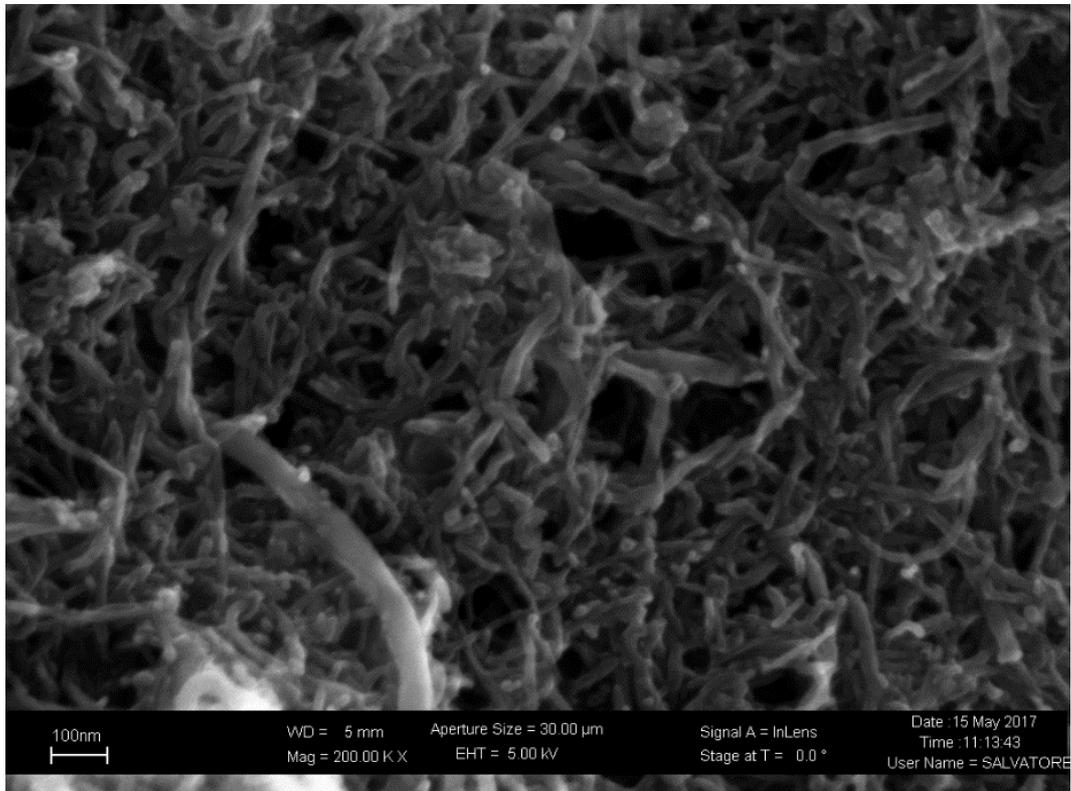


Figura 6.9: Immagine FESEM del film depositato sull'antenna M12.5.

6.2.3 Spettroscopia XPS

L'analisi al FESEM ha evidenziato la presenza di nanotubi sulla superficie dei film delle antenne. Attraverso la spettroscopia XPS è stata analizzata la composizione elementare della superficie, al fine di evidenziare l'eventuale presenza di difetti sulla superficie dei nanotubi. Una sufficiente concentrazione di siti con difetti è fondamentale per una corretta funzionalizzazione dei nanotubi.

L'analisi "survey" della superficie del film per l'antenna M33.0 (figura 6.10) ha rilevato la presenza dei seguenti elementi:

- Carbonio (73 ± 1 at%)
- Ossigeno (24 ± 1 at%)
- Silicio (3 ± 1 at%)

Si nota l'assenza di un segnale relativo all'azoto in superficie (figura 6.13).

L'analisi fine, con relativa deconvoluzione, del picco relativo al C1s, riportata in figura 6.11, ha rilevato la presenza di

- gruppi C-C (catene alchiliche);
- gruppi C-O-C (possibile presenza di gruppi etere o di ossigeno adsorbito);

- gruppi O-C=O (gruppi carbossilici o esteri)

Le percentuali relative ai diversi segnali sono riportate in tabella 6.5.

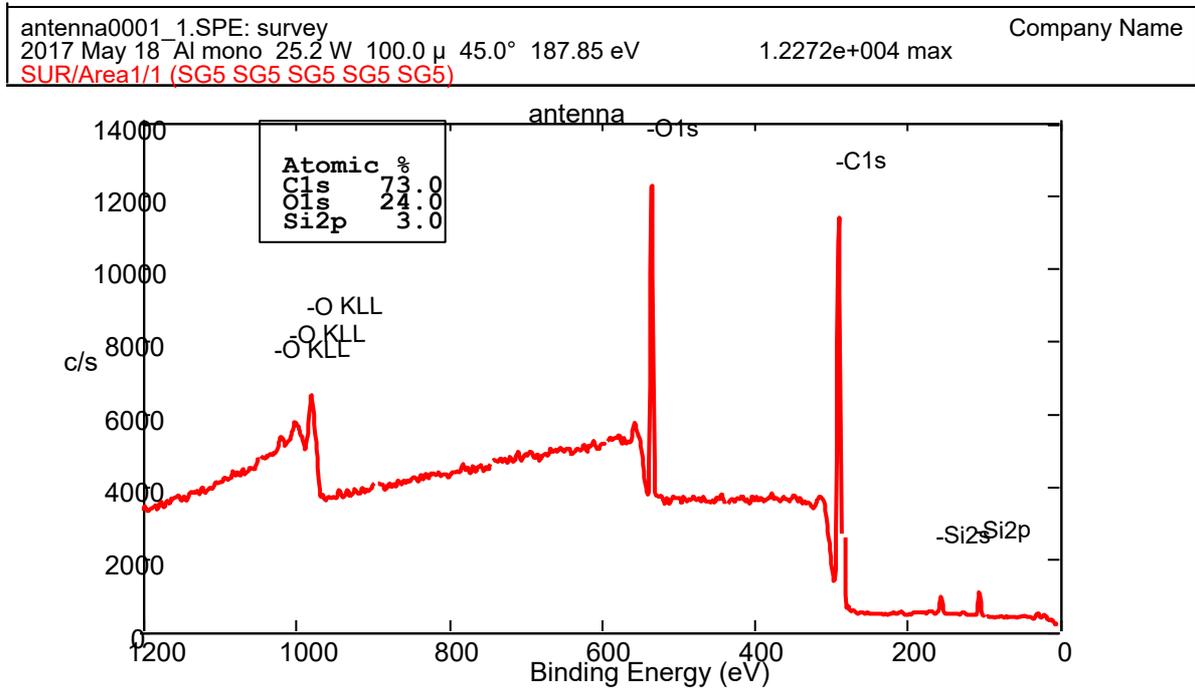


Figura 6.10: Spettro XPS Survey del film relativo all'antenna M33.0

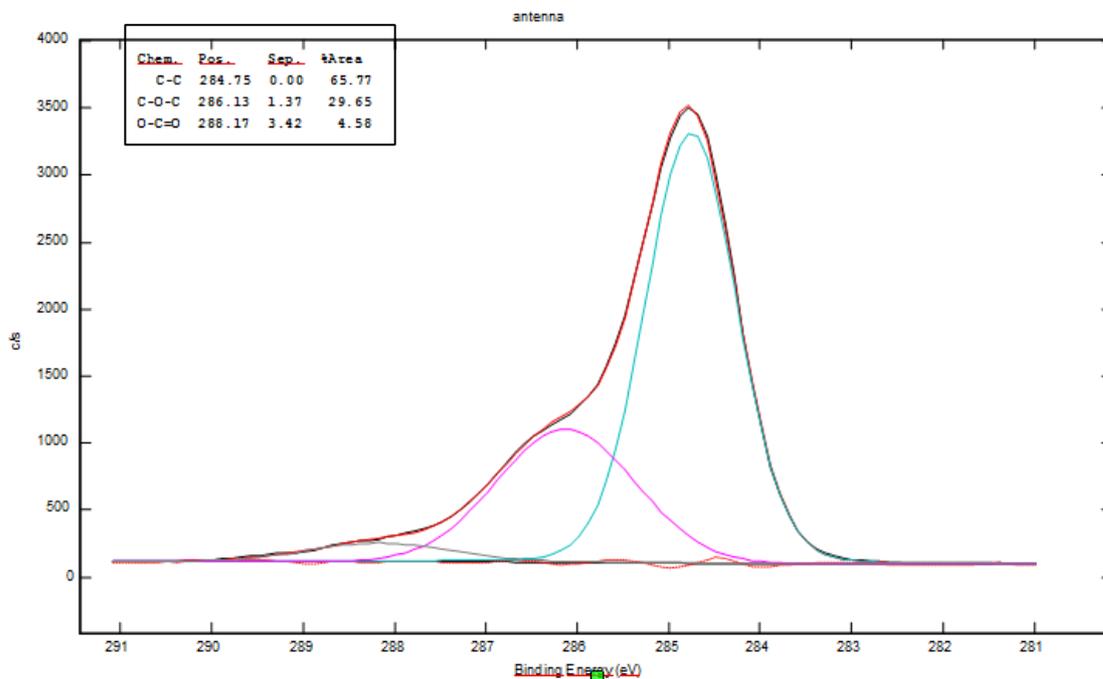


Figura 6.11: Spettro fine XPS del picco C1s del carbonio, relativo all'antenna M33.0

Secondo lo spettro C1s, il 30% dei carboni presenti in superficie lega un ossigeno con un legame singolo di tipo (-COC-), mentre circa il 5% lega due Ossigeni con legame di tipo carbossilico (-COO-).

Fatto 100 il numero di carboni presenti, considerando solo i carboni che legano con ossigeni, ci aspetteremmo di avere:

- 100 C
- $30/2 = 15$ ossigeni legati con due carboni (ogni due carboni, viene legato un ossigeno);
- $4,5*2 = 9$ ossigeni legati in un gruppo -COO- (ogni carbonio lega 2 ossigeni).

Il Silicio (3%, rilevato nel survey) denota l'influenza, nella misura, del substrato di FR4 (un tessuto di fibre di vetro intrecciato in una matrice di resina epossidica). Questo potrebbe derivare da una parziale diffusione delle fibre di vetro in superficie, oppure, più probabilmente, è dovuto al distacco di frammenti granulari del substrato, avvenuto durante la preparazione dell'antenna. Qualunque sia la sua origine, anche in assenza di analisi fine del picco del silicio, è verosimile credere che quel 3 % atomico di silicio, riscontrato in superficie, si trovi nella forma di SiO₂; al computo totale delle parti vanno quindi aggiunti:

- $3*100/73 = 4$ Si
- $(3*100/73)*2 = 8$ Ossigeni legati a Si (SiO₂).

Quindi in totale si evidenziano 32 atomi di ossigeno ogni 100 atomi di carbonio ed ogni 4 atomi di silicio. Riportando tutto in percentuale, si hanno i valori espressi in tabella 6.6. Come si può notare, le percentuali ottenute dall'analisi fine del picco C1s corrispondono, entro gli errori strumentali, con le percentuali atomiche ottenute dallo spettro survey.

Tabella 6.5: analisi XPS del picco C1s

C(C1s)	at%
C-C	66 ± 1 at%
C-O-C	30 ± 1 at%
O-C=O	4 ± 1 at%

Tabella 6.6: confronto tra survey e percentuali estrapolate dal picco C1s.

	at% (Survey)	at% (C1s)
C	73±1at%	73±1at%
O	24±1at%	23±1at%
Si	3±1at%	3±1at%

L'analisi fine del picco O1s dell'ossigeno (figura 6.12) ha confermato la presenza di:

- legami semplici C-O (eteri, ossigeni adsorbiti, 9 ± 1 at%);
- legami doppi C=O (gruppi carbossilici o carbonilici, 91 ± 1 at%)

In questo caso, ci si aspetterebbe di avere più atomi di ossigeno legati con doppi legami; questo contrasta con i risultati ottenuti dall'analisi dei precedenti picchi. Tuttavia la decomposizione del picco O1s risulta molto più complessa, e non sempre è possibile ottenere una risoluzione completa dello spettro, perché molti segnali si sovrappongono (ad esempio, il segnale relativo agli eventuali ossigeni legati con gli atomi di silicio si sovrappone perfettamente con il picco relativo al gruppo carbossile).

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti con la spettroscopia XPS, possiamo affermare la presenza di gruppi carbonilici e carbossilici sulla superficie del film, ovvero la presenza di una preesistente ossidazione superficiale dei nanotubi; questo particolare risulta fondamentale per la scelta del metodo di funzionalizzazione descritto nel prossimo paragrafo.

6.3 Funzionalizzazione

L'analisi XPS ha rilevato la presenza di siti attivi (gruppi carbossilici e carbonilici) sulla superficie dei nanotubi. Per questo motivo, in questo lavoro si è scelto di operare una funzionalizzazione diretta, evitando step di ossidazione intermedia. Questi step, pur migliorando la resa del processo di funzionalizzazione, risultano tecnologicamente complessi da operare su nanotubi già depositati, come nel nostro caso, sulle antenne. Le problematiche sollevate sono soprattutto il rischio di corrodere lo stub di rame, rendendo le antenne inutilizzabili, e le ridotte possibilità di bagnare in maniera ottimale i nanotubi, già inglobati nella matrice polimerica.

Dato che le precedenti analisi elettriche (sezione 6.2.1) hanno mostrato che le antenne M12.5 e E04.0 non sono utilizzabili come risonatori (la prima si comporta come un cortocircuito, la seconda come un circuito aperto), le funzionalizzazioni sono state effettuate sulle antenne M17.2 ed M33.0.

Per la funzionalizzazione, è stata depositata una goccia da 20 microlitri di enzima lattato ossidasi (LOD) 15 mg/ml in tampone fosfato salino (PBS, figura 6.14), che è stata lasciata tutta la notte a +4°C, trovata asciugata il mattino dopo, quindi risciacquata con PBS per rimuovere l'enzima non adsorbito.

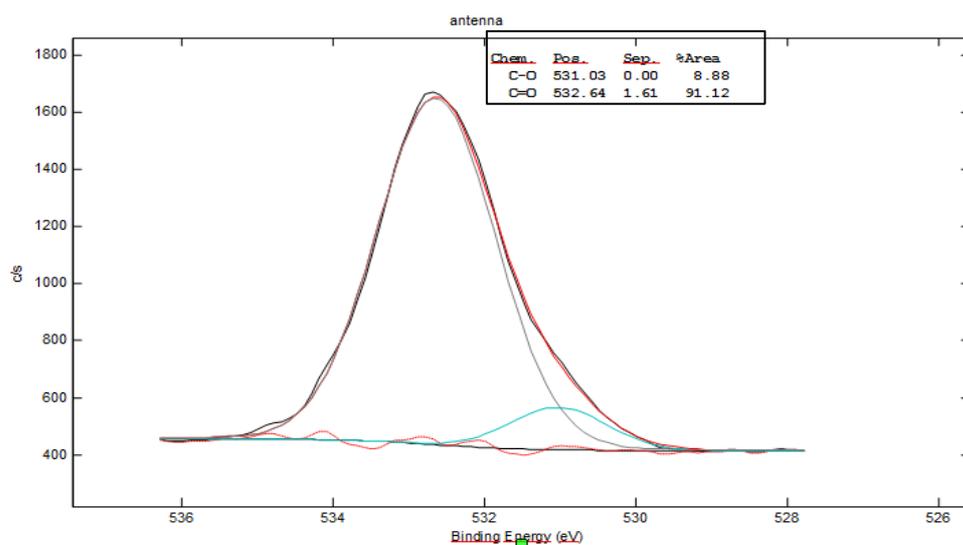


Figura 6.12: Spettro fine XPS del picco O1s dell'ossigeno, relativo all'antenna M33.0

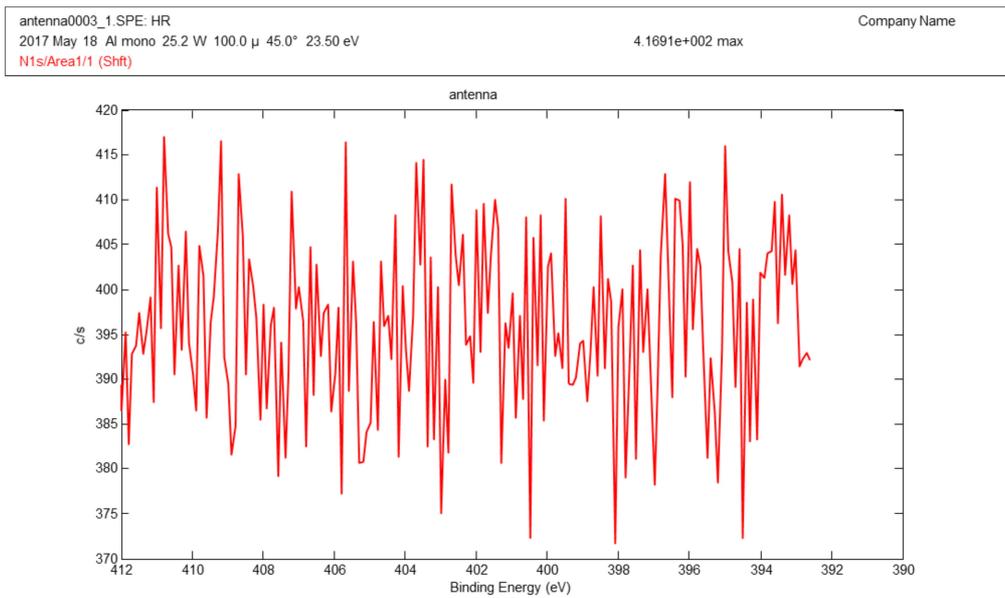


Figura 6.13: Spettro fine XPS del picco N1s dell'azoto, relativo all'antenna M33.0

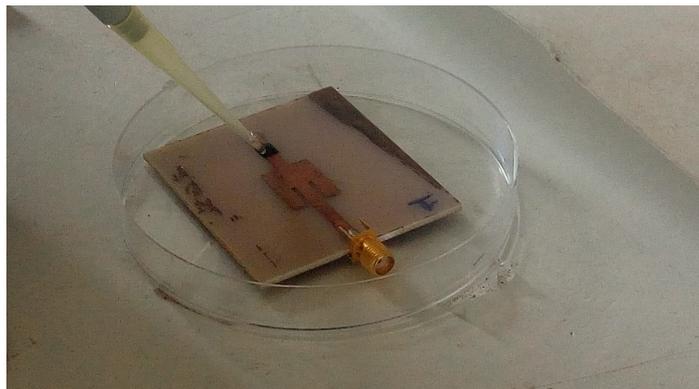


Figura 6.14: Deposizione lattato ossidasi sul film di CNT, antenna M17.2.

7. Misure sulle antenne funzionalizzate

La reazione tra enzima e L-lattato, in ambiente acquoso con O₂ disciolta genera H₂O₂, il quale va incontro ad una reazione di degradazione che libera ossigeno, ioni idrogeno ed elettroni (figura 7.1)^{xxxvi}.

Le misure riportate in questo capitolo sono volte ad analizzare come il rilascio di elettroni e la variazione di pH (dovuta agli ioni idrogeno liberati) modifichino le caratteristiche elettriche delle antenne.

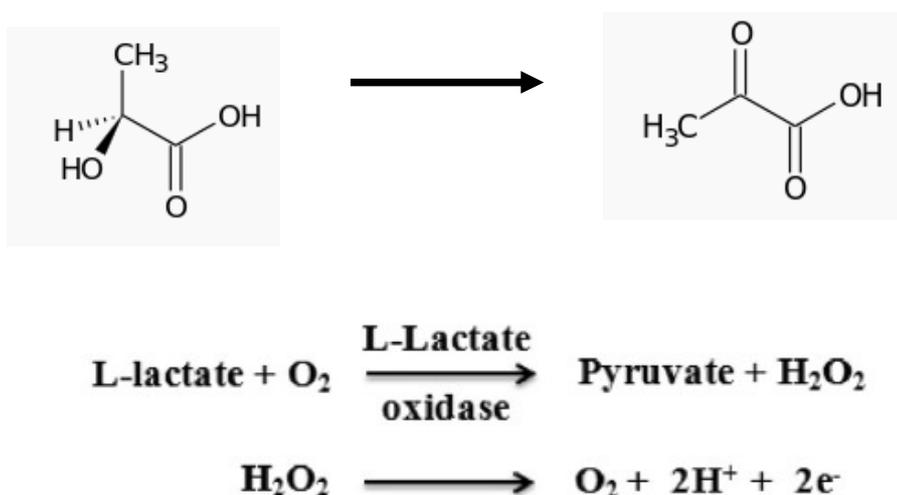


Fig. 1. Electrochemical reactions involved in LOD biosensors.

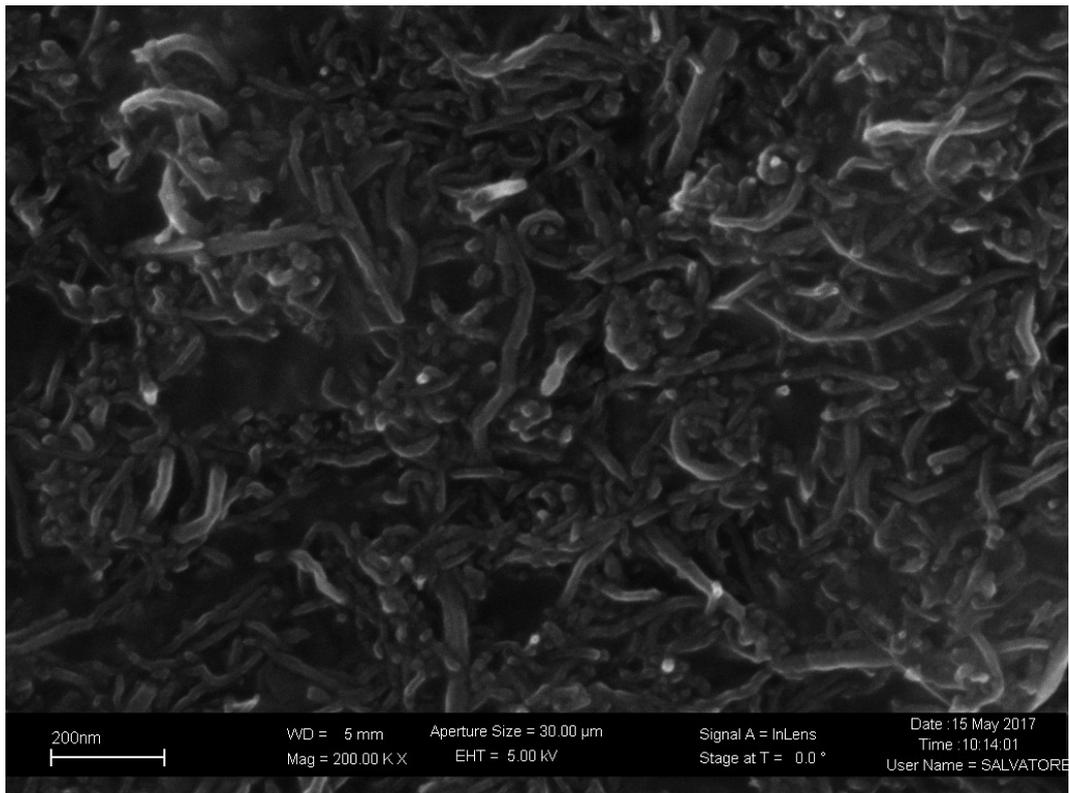
Figura 7.1: Schema delle reazioni che coinvolgono l'enzima specifico LOD e l'L-lattato, in soluzione.

7.1 Microscopia FESEM

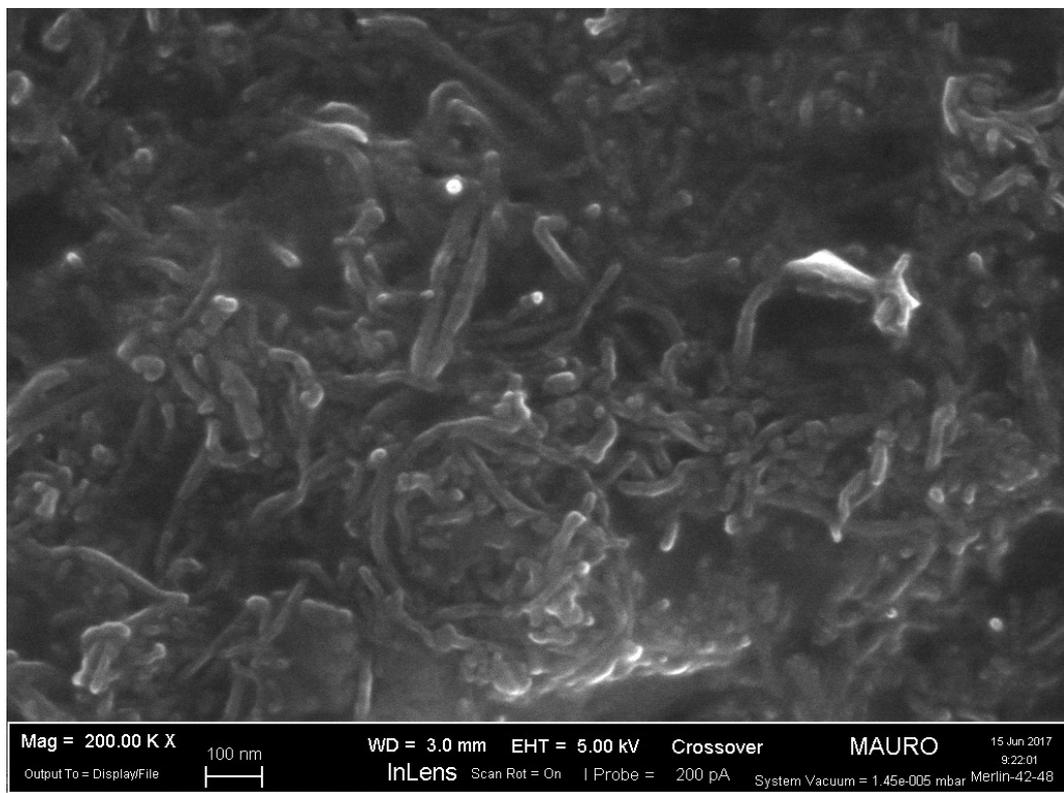
Sulla base di quanto riportato dalla dott.ssa Irene Taurino (che ha gentilmente offerto la sua consulenza per questo lavoro), e dal prof. Sandro Carrara, e come anche riportato in loro precedenti lavori^(xxxvii e xxxviii) l'avvenuto adsorbimento chimico dell'enzima dovrebbe poter essere rilevato dall'ingrossamento del diametro dei nanotubi al FESEM.

Nelle figure 7.2a-b vengono mostrate le immagini FESEM dei nanotubi prima e dopo la funzionalizzazione.

In seguito a discussione con il prof. Mauro Giorcelli, con il dott. Mauro Raimondo (FESEM) e il dott. Alessandro Chiadò (biologo) delle immagini ottenute, non è parso di apprezzare un ingrossamento sensibile dei nanotubi.



(a)



(b)

Figura 7.2: Immagini FESEM del film CNT sull'antenna M33.0, prima (a) e dopo (b) la funzionalizzazione.

7.2 Misure elettriche con soluzioni titolate

Per studiare l'avvenuta funzionalizzazione dei film depositi sulle antenne, sono state preparate delle soluzioni a concentrazione nota di litio-L-lattato. Per prima cosa, è stata preparata una soluzione madre 1 Mol. Il peso molare del litio-L-lattato è di 96,01 g/mole. Sono stati perciò disciolti 95 mg del sale in 989 μ l di tampone PBS. Da questa soluzione, per diluizioni successive in PBS, sono state ottenute soluzioni 10 mMol, 5 mMol e 0,5 mMol.

7.2.1 Antenna M17.2

L'antenna M17.2 è stata collegata all'analizzatore di rete. Dopo la funzionalizzazione, ma prima di effettuare le misure con le soluzioni titolate, l'antenna ha mostrato una risonanza a 4,025 GHz, di intensità -13 dB. Le misure sono state effettuate seguendo ogni volta la medesima procedura:

- è stata depositata una goccia (20 μ l) di soluzione di litio-L-lattato in PBS, a concentrazione nota;
- la goccia è stata lasciata a reagire per 15 minuti;
- è stata quindi misurata la risposta in frequenza;
- la goccia è stata rimossa;
- la superficie del film è stata lavata depositandoci sopra gocce di soluzione tampone PBS e rimuovendole, ripetendo per 3 volte questo passaggio;
- prima di passare alla misura successiva, si è aspettato che il film perdesse l'umidità superficiale e tornasse secco.

Al termine di quest'ultimo passaggio, l'antenna ha mostrato sempre la stessa risposta in frequenza “a secco”, nell'intervallo di frequenze considerato. La procedura è stata ripetuta per 6 volte, utilizzando soluzioni a diversa concentrazione di lattato. Le risposte in frequenza ottenute nei rispettivi casi sono mostrate in figura 7.3, mentre le informazioni relative allo spostamento (shift) del picco di risonanza sono riportate in tabella 7.1.

La risposta in frequenza per l'antenna a contatto con la soluzione mostra una certa proporzionalità (13,11 MHz/mMol) con la concentrazione della soluzione stessa, ma le misure raccolte sono insufficienti per potere affermare che la correlazione misurata sia corretta.

Per meglio interpretare il comportamento dell'antenna non ci si è limitati a considerare solo la presenza (o meno) di correlazione tra la concentrazione di lattato analizzata e la risposta dello strumento (shift della frequenza di risonanza). Risulta, invece, fondamentale considerare anche l'ordine in cui le misure sono state effettuate.

Dopo la misura dell'antenna “a secco”, sono state effettuate misure a concentrazione crescente, tranne una misura, relativa ad una stessa concentrazione (5 mMol), che è stata ripetuta due volte per controllare che la risposta ottenuta non dipendesse dalla misura precedente. Questa ha mostrato un'incertezza nella misura, la cui entità non può essere stimata con sufficiente precisione in questa sede, ma che meriterebbe ulteriori approfondimenti: trattandosi di una sola misura, potrebbe essere dovuta a qualche errore casuale avvenuto in fase di deposizione della goccia di soluzione da analizzare, o ad un non corretto lavaggio del film nello step precedente. Tuttavia, escludere questa possibilità richiederebbe di ripetere le

misure con un'antenna con la stessa risposta in frequenza, o comunque con una risposta in frequenza comparabile con questa.

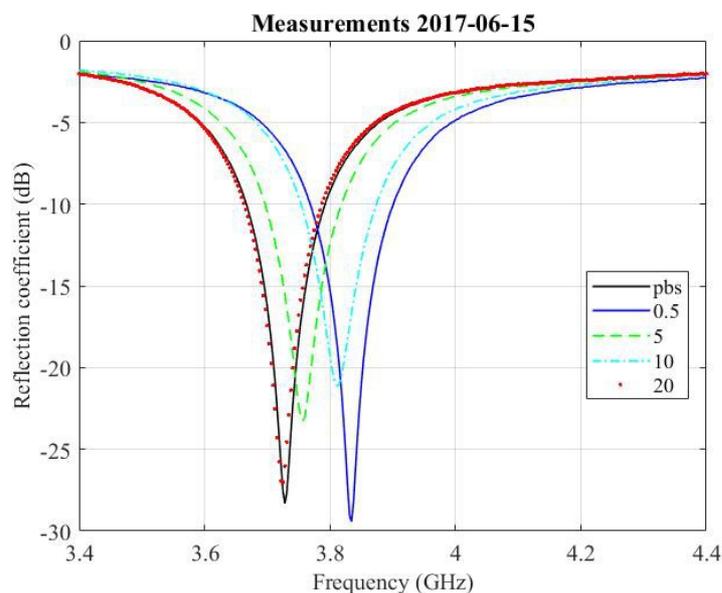


Figura 7.3: Risposta in frequenza del coefficiente di riflessione per l'antenna M17.2, esposta a soluzioni a differente concentrazione di lattato.

Dopo la misura con la goccia a concentrazione 10 mMol, si è pensato di misurare la risposta dell'antenna con una goccia di tampone PBS, senza lattato, per determinare quale fosse la risposta dell'antenna ad un campione “bianco”; la misura, ripetuta due volte, ha restituito la stessa risposta in frequenza ottenuta per la misura con la goccia a concentrazione 10 mMol. L'ipotesi è che una concentrazione di 10 mMol di lattato abbia provocato l'avvelenamento del substrato reattivo, e che quindi siano avvenute reazioni irreversibili sulla superficie dei nanotubi funzionalizzati. Purtroppo, questa evenienza limita ulteriori misure elettriche su questa antenna.

Tabella 7.1: Shift della f. di risonanza per l'antenna M17.2, a differenti concentrazioni di lattato.

Misura (n.)	Concentrazione lattato (mMol)	F. risonanza (GHz)	Shift (MHz)
1	Solo enzima (a secco)	4,025	0
2	0,5	3,850	-175
3	5	3,755	-270
4	5	3,810	-215
5	10	3,725	-300
6	0 (Solo PBS)	3,725	-300
7	0 (Solo PBS)	3,725	-300

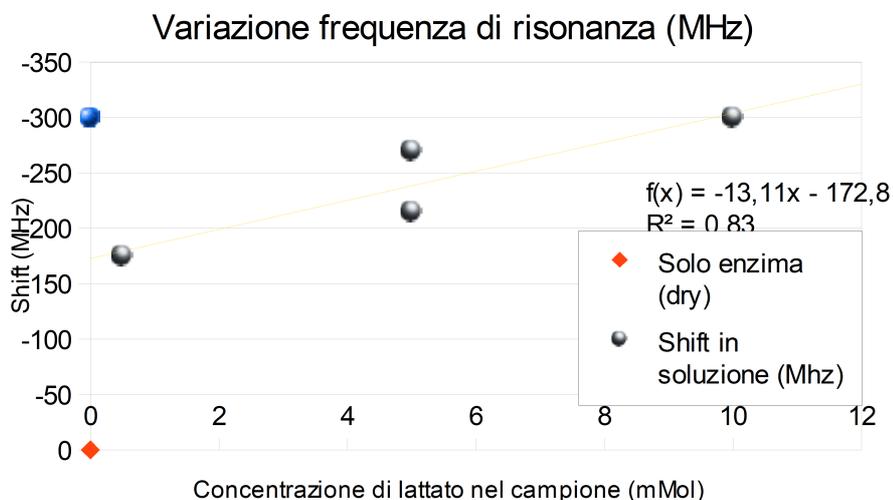


Figura 7.4: Shift della frequenza di risonanza per l'antenna M17.2, esposta a soluzioni a differente concentrazione di lattato.

7.2.2 Antenna M33.0

L'antenna M33.0 riporta, dopo la funzionalizzazione, una frequenza di risonanza a secco di 3,96 GHz. Per le misure della risposta in frequenza è stata seguita la stessa procedura usata per l'antenna M17.2. Prima delle misure con soluzioni di lattato, sono stati effettuati dei "bianchi", ovvero misure con:

- acqua distillata (20 μ l e 40 μ l);
- PBS (20 μ l e 40 μ l), in assenza di lattato.

Queste misure hanno evidenziato che gocce più grandi modificano maggiormente la frequenza di risonanza, e che l'acqua distillata (pH teorico 7,0) modifica la risonanza in maniera più significativa della soluzione PBS (pH 7,4). Anche in questo caso, la risposta in soluzione è proporzionale con la concentrazione di lattato nella soluzione misurata, ma mostra un andamento asintotico, segno che, alle concentrazioni utilizzate, siamo vicini alla saturazione; per questo motivo, non è stato possibile stabilire una correlazione valida per questa antenna, in quanto l'intervallo di concentrazioni considerato è presumibilmente superiore all'intervallo di linearità dell'antenna.

Gli shift della risonanza relativi alle misure preliminari senza lattato e alle misure successive sono riportati in tabella 7.2, mentre il grafico in figura 7.5 evidenzia l'ordine con cui sono state effettuate le misurazioni, e la rispettiva variazione della risposta; anche in questo caso, sembra esserci un fenomeno di avvelenamento del sensore, perché dopo la misura a concentrazione 1 mMol, l'antenna riporta una risonanza a 3,78 GHz anche in assenza di lattato, ovvero nella misura con solo PBS. Peraltro, questa misura si discosta di ben 100 MHz da quella preliminare, effettuata con una goccia della stessa soluzione tampone. Questa può essere vista come una ulteriore prova che sia avvenuta una reazione irreversibile sulla superficie dei nanotubi.

Tabella 7.2: Shift della f. di risonanza per l'antenna M17.2, a differenti concentrazioni di lattato.

Misura (n.)	Concentrazione lattato (mMol)	Risonanza (GHz)	Shift (MHz)
1	Solo enzima (a secco)	3,965	0
2	0 (H ₂ O 20μl)	3,830	-135
3	0 (H ₂ O 40μl)	3,600	-365
4	0 (PBS 20μl)	3,870	-95
5	0 (PBS 40μl)	3,750	-215
6	0,5	3,795	-170
7	1	3,775	-190
8	0,25	3,78	-185
9	0 (PBS 20μl)	3,77	-195

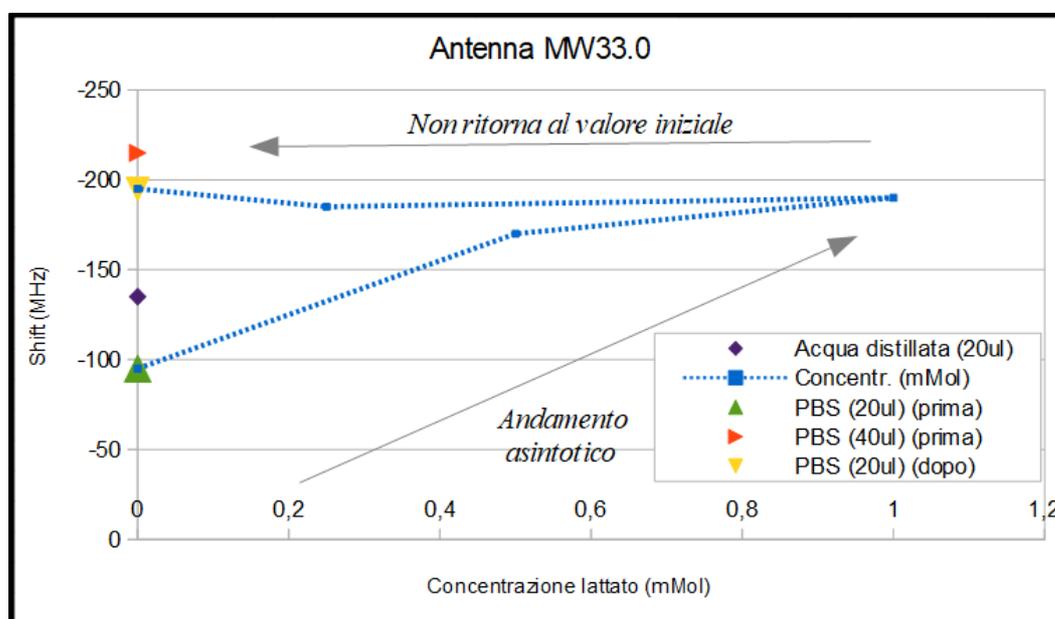


Figura 7.5: Shift della frequenza di risonanza per l'antenna M33.0 per soluzioni a differente concentrazione di lattato.

7.3 *Analisi dei risultati*

L'analisi al FESEM non mostra variazioni evidenti nello spessore dei nanotubi. Tuttavia, la variazione dello spessore è difficile da distinguere, in un campione che contiene nanotubi di vario spessore. Una controprova che si sarebbe potuta effettuare, ma che non è stato possibile condurre per motivi logistici, consisterebbe nel ripetere l'analisi con spettroscopia XPS del film delle antenne: prima della funzionalizzazione, la superficie non presentava tracce misurabili di azoto: essendo l'enzima lattato-ossidasi una molecola a base proteica, la sua adesione ai nanotubi potrebbe essere rilevata da un picco N1s, precedentemente assente.

Per quanto riguarda le risposte in frequenza, si è notato che, una volta raggiunte specifiche concentrazioni di lattato (10 mMol per l'antenna M17.2, 1mMol per l'antenna M33.0), ogni successiva misura, anche con solo PBS, mostra in soluzione una risposta identica alla misura precedente: ciò può essere spiegato ipotizzando la formazione di un legame forte tra enzima e lattato, fatto salvo il fatto che ad antenna asciutta non si notano differenze rispetto a prima della funzionalizzazione. Infatti, dopo lavaggio con PBS e asciugatura, la risposta delle antenne torna identica a come era prima della funzionalizzazione; appare quindi evidente, come prevedibile, l'importanza dell'ambiente acquoso, per il corretto funzionamento del sensore (in assenza di acqua, viene inibita la reazione descritta in figura 7.1).

Potrebbe essere anche possibile che, non avendo effettuato nessuno step intermedio prima della funzionalizzazione, i gruppi reattivi preesistenti sulla superficie dei nanotubi non siano stati sufficienti a garantire una corretta funzionalizzazione. D'altra parte, i fenomeni di avvelenamento del sensore sono difficilmente spiegabili, se non si suppone un legame tra la superficie del film e qualche molecola presente nelle soluzioni adoperate durante le misure in frequenza. Nel caso in cui effettivamente la funzionalizzazione non sia andata a buon fine, dobbiamo supporre che la reazione irreversibile sia avvenuta direttamente tra lattato e nanotubi (o altre molecole presenti sul film).

Ulteriori misure sulle antenne sarebbero auspicabili per avvalorare la tesi o dimostrare in maniera inconfutabile l'inefficacia del metodo usato; tuttavia, ciò richiederebbe di effettuare prima un processo chimico (con solventi specifici) o fisico (scaldando) per causare il desorbimento del lattato o la sua degradazione, e per rigenerare le antenne, fino a riportarle, in soluzione di PBS, ai valori iniziali. Non abbiamo alcuna garanzia che questi accorgimenti possano riportare le antenne al loro stato precedente.

Alternativamente, con un nuovo batch di antenne con percentuali di CNT comprese nell'intervallo discusso in questo lavoro, possono essere messi in atto processi intermedi per migliorare la funzionalizzabilità della superficie dei nanotubi, la loro bagnabilità e quindi l'adesione dell'enzima, per poi confrontare i risultati ottenuti in quest'ultimo caso.

8. Conclusioni

Nel corso di questo lavoro di tesi, sono state approfondite le potenzialità dell'applicazione dei nanotubi di carbonio come sistemi di trasmissione del segnale biochimico di un biosensore, alla luce della preesistente letteratura e delle sempre crescenti richieste di una diagnostica di tipo "point of care", economica, affidabile e di semplice utilizzo.

Sono stati sviluppati dei circuiti elettrici seguendo lo schema di un risonatore planare a microstriscia (patch antenna), che è stato analizzato microscopicamente al FESEM e tramite XPS e successivamente funzionalizzato in maniera diretta con enzima lattato-ossidasi (senza intermediatori chimici), quindi nuovamente analizzato al FESEM.

È stata riscontrata una correlazione diretta tra la percentuale di nanotubi presenti sul film e la conducibilità delle antenne in regime di corrente continua. Questa relazione è stata ottenuta dalle misure elettriche sulle antenne non funzionalizzate e dalle immagini al FESEM. È stata inoltre riscontrata una correlazione tra la percentuale di nanotubi nell'inchiostro utilizzato e la densità di nanotubi esposti osservati sulla superficie del film. Le percentuali di nanotubi che hanno portato ad avere delle sufficienti caratteristiche elettriche sono state quelle ottenute a partire da inchiostri con il 17,2% ed il 33% in peso di nanotubi, rispettivamente.

Tuttavia, in un caso (l'antenna ottenuta con un inchiostro con il 12,5 % in peso di CNT), pur essendo stato utilizzato un inchiostro con carica inferiore alle antenne M17.2 ed M33.0, le immagini FESEM hanno mostrato una densità di nanotubi superiore. Le misure elettriche hanno peraltro confermato un comportamento proprio di un film con una concentrazione superficiale di nanotubi molto elevata. Ciò evidenzia la necessità di un ulteriore approfondimento della variabilità dei risultati, con particolare attenzione alle reazioni che avvengono in fase di curing del film.

Le microscopie FESEM non sono riuscite a mostrare una significativa variazione nello spessore dei nanotubi, di fatto lasciando supporre che la funzionalizzazione non abbia avuto gli esiti sperati. Le misure elettriche sulle antenne funzionalizzate hanno mostrato una correlazione tra la concentrazione di lattato presente nei campioni analizzati e la variazione della frequenza di risonanza delle antenne, misurata attraverso la perdita del coefficiente di riflessione del segnale. Tuttavia, l'esiguo numero di misure che è stato possibile svolgere prima che le antenne si saturassero, ha impedito di stimare con criterio statistico la bontà di queste affermazioni.

I risultati ottenuti invitano ad approfondire questa ricerca, utilizzando un numero maggiore di antenne, con film ottenuti a partire da inchiostri con formulazioni uguali a quelli che si sono dimostrati più promettenti, in questo lavoro. Sarebbe inoltre interessante studiare il comportamento delle antenne utilizzando concentrazioni di CNT intermedie rispetto a quelle utilizzate in questo studio.

Un'altra interessante possibilità potrebbe essere l'uso di un substrato Rogers della serie RO3000, in sostituzione dell'FR4: questi hanno una temperatura di decomposizione (Td) di $500\text{ C}^{\text{xxxix}}$, mentre gli FR4 riportano una Td nell'intervallo $300\text{-}350\text{ }^{\circ}\text{C}^{\text{xli}}$. La Td corrisponde alla temperatura per cui il materiale ha perso il 5 % della massa iniziale, quindi vanno usati a temperatura più bassa. Bisognerebbe quindi effettuare prima dei test, per vedere quanto perdono in massa a 450° C , effettuando una termogravimetria di un substrato; altro fattore da

tenere in considerazione sarebbe la probabile ossidazione superficiale del rame, lavorando in aria e a temperature più elevate.

Riferimenti bibliografici

Le immagini utilizzate in questo lavoro sono autoprodotte o, dove non diversamente specificato, sono da intendersi di pubblico dominio o utilizzate col consenso dell'autore.

- i Fonte immagine: Database Brenda. Immagine utilizzata a scopo non commerciale, nel rispetto della licenza d'uso. https://www.brenda-enzymes.org/Mol/jsmol/index.php?selectedPos=265_265&pdb=2nli&ecno=1.13.12.4&colorScheme=0
- ii Sandro Carrara, "Bio/CMOS Interfaces and Co-Design", Springer, ISBN 978-1-4614-4689-7 ISBN 978-1-4614-4690-3 (eBook) DOI 10.1007/978-1-4614-4690-3
- iii Carol Lynam, Niamh Gilmartin, Andrew I. Minett, Richard O'Kennedy, Gordon Wallace, „Carbon nanotube-based transducers for immunoassays“, C A R B O N 4 7 (2 0 0 9) 2 3 3 7 – 2 3 4 3
- iv Wohlstadter JN, Wilbur JL, Sigal GB, Biebuyck HA, Billadeau MA, Dong L, et al., "Carbon nanotube-based biosensor", *Adv Mater* 2003;15:118 4–7.
- v Jing Yang1 & Wei Wen1 & Xiuhua Zhang1 & Shengfu Wang1, "Electrochemical immunosensor for the prostate specific antigen detection based on carbon nanotube and gold nanoparticle amplification strategy", *Microchim Acta* (2015) 182:1855–1861 DOI 10.1007/s00604-015-1523-7
- vi Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation of and growth processes in the synthesis of colloidal gold", *Discussion of the Faraday Society*, 1951. 11: pp. 55 - 75.
- vii S. Iijima, *Nature* (London), 354, 56, 1991
- viii M.-F. Yu; et al. (2000). "Strength and Breaking Mechanism of Multiwalled Carbon Nanotubes Under Tensile Load". *Science*. 287 (5453): 637–40. Bibcode:2000Sci...287..637Y. PMID 10649994. doi:10.1126/science.287.5453.637
- ix H. Li, W. Lu, J. Li, X. Bai, and C. Gu. "Multichannel ballistic transport in multiwall carbon nanotubes." *Phys. Rev. Lett.*, 95:086601, 2005.
- x C. Boero, S. Carrara, G. Del Vecchio, L. Calzá and, and G. De Micheli. Highly sensitive carbon nanotube-based sensing for lactate and glucose monitoring in cell culture. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 10(1):59 – 67, 2011.
- xi S. Carrara, C. Boero, and G. D. Micheli, "Quantum dots and wires to improve enzymes-based electrochemical bio-sensing," in *Proc. Nanonet*, 2009, vol. LNICTS 20, pp. 189–199, Berlin, Germany: Springer.
- xii C. Cai and J. Chen, "Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes," *Anal. Biochem.*, vol. 332, pp. 75–83, 2004.
- xiii Irene Taurino, Sandro Carrara, Mauro Giorcelli, Alberto Tagliaferro, and Giovanni De Micheli, "Carbon Nanotubes With Different Orientations for Electrochemical Biodevices", *IEEE SENSORS JOURNAL*, VOL. 12, NO. 12, DECEMBER 2012
- xiv J. Gooding. "Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing", *Electrochim. Acta*, 50(15):3049 – 3060, 2005.
- xv G. Rivas et al. "Carbon nanotubes for electrochemical biosensing". *Talanta*, 74(3):291 – 307, 2007.
- xvi A. Wanekaya, W. Chen, N. Myung, and A. Mulchandani. "Nanowire-based electrochemical biosensors". *Electroanal.*, 18(6):533–550, 2006.
- xvii Ingo Wolff and Norbert Knoppik, "Rectangular and Circular Microstrip Disk Capacitors and Resonators", *IEEE Transaction on Microwave Theory and Techniques*, VOL. MTT-22, NO. 10, October 1974, pp.857-864.
- xvii Ingo Wolff and Vijai K. Tripathi, "The Microstrip Open-Ring Resonator", *IEEE Transaction on Microwave Theory and Techniques*, VOL. Mn-32, NO. 1, January 1984, pp.102-107.

- xix Cecilia Occhiuzzi, Amin Rida, Gaetano Marrocco, and Manos Tentzeris, “RFID Passive Gas Sensor Integrating Carbon Nanotubes”, *IEEE Transaction on Microwave Theory and Techniques*, VOL.59, NO.10, October 2011, 2674-2684
- xx Hee-Jo Leea,1, Jung-Hyun Leeb,1, Hui-Sung Moonc, Ik-Soon Jangd, Jong-Soon Choid,e, Jong-Gwan Yookf, Hyo-II Jungb, “A planar split-ring resonator-based microwave biosensor for label-free detection of biomolecules”, *Sensors and Actuators B* 169 (2012) 26– 31
- xxi Hyun-Se ok Lee, Hee-Jo Lee, Hya ng Hee Choi, Jong-G wan Yook, Kyung-Hwa Yoo, "Carbon-Nanotube-Resonator-Based Biosensors", *small* 2008, 4, No. 10, 1723–1727
- xxii Ahmad Mohammadi, Alyani Ismail, Mohd Adzir Mahdi, Raja Syamsul Azmir Raja Abdullah, Maryam Mohd Isa, Amir Reza Sadrolhosseini, “Carbon-Nanotube-Based FR-4 Patch Antenna as a Bio-Material Sensor” *International Symposium on Robotics and Intelligent Sensors 2012 (IRIS 2012)*
- xxiii Patrizia Savi; Krishna Naishadham; Ahmad Bayat; Mauro Giorcelli, “Multi-Walled Carbon Nanotube Thin Film Loading for Tuning Microstrip Patch Antennas”, *IEEE* ; 2016
- xxiv Krishna Naishadham, “An Investigation on the Tuning of a Microstrip Patch Antenna Using Carbon Nanotube Thin Films”, *AP-S 2014* pp.900-901, 978-1-4799-3540-6/14/\$31.00 ©2014 IEEE
- xxv J.H. Park, P.S. Alegaonkar, S.Y. Jeon, J.B. Yoo, “Carbon nanotube composite: Dispersion routes and field emission parameters,” *Composites Science and Technology* 68, pp. 753–759, 2008.
- xxvi M.L. Goodwin,J.E.Harris,A.Hernandez,L.B.Gladden, “Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians”, *J.Diabetes Sci. Technol.*1(2007)558–569.
- xxvii KavitaRathee, VikasDhull, RekhaDhull, SandeepSingh, “Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review”, *Biochemistry and Biophysics Reports* 5 (2016) 35–54
- xxviii Chandra S.Pundir, Vinay Narwal,Bhawna Batra, “Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review”, *Biosensors and Bioelectronics* 86 (2016)777–790
- xxix J. Huang et al. “A highly-sensitive l-lactate biosensor based on sol-gel film combined with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) modified electrode”. *Mat. Sci. Eng. C*, 27(1):29 – 34, 2007.
- xxx Cristina Boero , Sandro Carrara, Giovanna Del Vecchio, Laura Calzà, and Giovanni De Micheli, Fellow, IEEE, “Highly Sensitive Carbon Nanotube-Based Sensing for Lactate and Glucose Monitoring in Cell Culture”, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, VOL. 10, NO. 1, March 2011
- xxxi Irene Taurino, Renate Reiss, Michael Richter, Michael Fairhead, Linda Thöny-Meyer, Giovanni De Micheli, Sandro Carrara, “Comparative study of three lactate oxidases from *Aerococcus viridans* for biosensing applications”, *Electrochimica Acta* 93 (2013) 72– 79, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.080>
- xxxii Eifion Jewell, Bruce Philip and Peter Greenwood, “Improved Manufacturing Performance of Screen Printed Carbon Electrodes through Material Formulation”, *Biosensors* 2016, 6, 30; doi:10.3390/bios6030030
- xxxiii O'Neil, M.J. (ed.). “The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals”. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001., p. 1637
- xxxiv Haynes, W.M. (ed.). “CRC Handbook of Chemistry and Physics”. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2013-2014, p. 3-210
- xxxv KavitaRathee, VikasDhull, RekhaDhull, SandeepSingh, “Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review”, *Biochemistry andBiophysicsReports*5(2016)35–54
- xxxvi Sandro Carrara, Camilla Baj-Rossi, Cristina Boero, Giovanni De Micheli, “Do Carbon Nanotubes contribute to Electrochemical Biosensing?”, *Electrochimica Acta* 128 (2014) 102–112
- xxxvii I. Taurino, et al., *Nano Letters*, vol. 14, num. 6, pp.3180-3184, 2014.
- xxxviii <https://www.rogerscorp.com/acs/products/39/RO3006-and-RO3010-Laminates.aspx>
- xxxix Mélanie Lé-Magda, Eric Dargent, Boulos Youssef, Alain Guillet, Jonathan Idrac and Jean-Marc Saiter, “Thermal Properties Evolution of PCB FR4 Epoxy Composites for Mechatronic During Very Long Ageing“, *Macromolecular Symposia Special Issue: Polychar-19 World Forum on Advanced Materials*, Volume 315, Issue 1, pages 143–151, May 2012

Ringraziamenti

Ringrazio la Dott.ssa Irene Taurino per l'aiuto fornitomi nelle fasi iniziali della ricerca, nella logistica correlata al viaggio e per le consulenze tecniche fornite.

Ringrazio il Dott. Simone Quaranta per aver fornito le tecnologie e il suo personale impegno per lo screen printing dei film di CNT.

Ringrazio Salvatore Guastella e Mauro Raimondo per la disponibilità e la prontezza nel fornire i dati relativi alle misure FESEM e XPS e per l'aiuto nella loro elaborazione.

Ringrazio il Dott. Alessandro Chiadò per la consulenza sui temi di carattere biologico e per i consigli relativi ai metodi di funzionalizzazione.

Ringrazio mia madre, per il sostegno fornito in ogni modo e campo a lei possibile, per permettermi di raggiungere questo risultato.

Ringrazio Mimma, per la forza che mi ha dato, per avermi sopportato ogni giorno, e senza la quale non ce l'avrei mai fatta.

Ringrazio Matteo, Roberto e Alessandro, per avermi aiutato nel corso di questo ciclo accademico ed avermi riempito gli uggiosi pomeriggi torinesi.

Ringrazio Marilisa, per ogni risata che mi ha strappato, anche nei momenti più tristi.

Ringrazio tutti coloro che hanno vegliato su di me, insegnandomi che tutto è possibile, quando si ha una ragione per farlo.

- i Fonte immagine: Database Brenda. Immagine utilizzata a scopo non commerciale, nel rispetto della licenza d'uso. https://www.brenda-enzymes.org/Mol/jsmol/index.php?selectedPos=265_265&pdb=2nli&ecno=1.13.12.4&colorScheme=0
- ii Sandro Carrara, "Bio/CMOS Interfaces and Co-Design", Springer, ISBN 978-1-4614-4689-7 ISBN 978-1-4614-4690-3 (eBook) DOI 10.1007/978-1-4614-4690-3
- iii Carol Lynam, Niamh Gilmartin, Andrew I. Minett, Richard O'Kennedy, Gordon Wallace, „Carbon nanotube-based transducers for immunoassays“, C A R B O N 4 7 (2 0 0 9) 2 3 3 7 – 2 3 4 3
- iv Wohlstadter JN, Wilbur JL, Sigal GB, Biebuyck HA, Billadeau MA, Dong L, et al. Carbon nanotube-based biosensor. *Adv Mater* 2003;15:118 4–7.
- v Jing Yangl & Wei Wenl & Xiuhua Zhangl & Shengfu Wangl, "Electrochemical immunosensor for the prostate specific antigen detection based on carbon nanotube and gold nanoparticle amplification strategy", *Microchim Acta* (2015) 182:1855–1861 DOI 10.1007/s00604-015-1523-7
- vi Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation of and growth processes in the synthesis of colloidal gold", *Discussion of the Faraday Society*, 1951. 11: pp. 55 - 75.
- vii S. Iijima, *Nature (London)*, 354, 56, 1991
- viii M.-F. Yu; et al. (2000). "Strength and Breaking Mechanism of Multiwalled Carbon Nanotubes Under Tensile Load". *Science*. 287 (5453): 637–40. Bibcode:2000Sci...287..637Y. PMID 10649994. doi:10.1126/science.287.5453.637
- ix H. Li, W. Lu, J. Li, X. Bai, and C. Gu. Multichannel ballistic transport in multiwall carbon nanotubes. *Phys. Rev. Lett.*, 95:086601, 2005.
- x C. Boero, S. Carrara, G. Del Vecchio, L. Calzá and, and G. De Micheli. Highly sensitive carbon nanotube-based sensing for lactate and glucose monitoring in cell culture. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 10(1):59 –67, 2011.
- xi S. Carrara, C. Boero, and G. D. Micheli, "Quantum dots and wires to improve enzymes-based electrochemical biosensing," in *Proc. Nanonet, 2009*, vol. LNICTS 20, pp. 189–199, Berlin, Germany: Springer.
- xii C. Cai and J. Chen, "Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes," *Anal. Biochem.*, vol. 332, pp. 75–83, 2004.
- xiii Irene Taurino, Sandro Carrara, Mauro Giorcelli, Alberto Tagliaferro, and Giovanni De Micheli, "Carbon Nanotubes With Different Orientations for Electrochemical Biodevices", *IEEE SENSORS JOURNAL*, VOL. 12, NO. 12, DECEMBER 2012
- xiv J. Gooding. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochim. Acta*, 50(15):3049 – 3060, 2005.
- xv G. Rivas et al. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta*, 74(3):291 – 307, 2007.
- xvi Cecilia Occhiuzzi, Amin Rida, Gaetano Marrocco, and Manos Tentzeris, RFID Passive Gas Sensor Integrating Carbon Nanotubes, *IEEE TRANSACTIONS ON MICROWAVE THEORY AND TECHNIQUES*, VOL.59, NO.10, OCTOBER 2011, 2674-2684
- xvii A. Wanekaya, W. Chen, N. Myung, and A. Mulchandani. Nanowire-based electrochemical biosensors. *Electroanal.*, 18(6):533–550, 2006.
- xviii INGO WOLFF AND NORBERT KNOPPIK, "Rectangular and Circular Microstrip Disk Capacitors and Resonators", *IEEE TRANSACTIONS ON MICROWAVE THEORY AND TECHNIQUES*, VOL. MTT-22, NO. 10, OCTOBER 1974, pp.857-864.
- xix INGO WOLFF, MEMBER, IEEE, AND VIJAI K. TRIPATHI, MEMBER, IEEE, "The Microstrip Open-Ring Resonator", *IEEE TRANSACTIONS ON MICROWAVE THEORY AND TECHNIQUES*, VOL. MTT-32, NO. 1, JANUARY 1984, pp.102-107.
- xx Hee-Jo Leea,1, Jung-Hyun Leeb,1, Hui-Sung Moonc, Ik-Soon Jangd, Jong-Soon Choid,e, Jong-Gwan Yookf, Hyo-Il Jungb, "A planar split-ring resonator-based microwave biosensor for label-free detection of biomolecules", *Sensors and Actuators B* 169 (2012) 26– 31
- xxi Hyun-Se ok Lee, Hee-Jo Lee, Hya ng Hee Choi, Jong-G wan Yook, Kyung-Hwa Yoo, "Carbon-Nanotube-Resonator-Based Biosensors", *small* 2008, 4, No. 10, 1723–1727
- xxii Carbon-Nanotube-Based FR-4 Patch Antenna as a Bio-Material Sensor Ahmad Mohammadi, Alyani Ismail, Mohd Adzir Mahdi, Raja Syamsul Azmir Raja Abdullah, Maryam Mohd Isa, Amir Reza Sadrolhosseini, *International Symposium on Robotics and Intelligent Sensors 2012 (IRIS 2012)*
- xxiii Savi, Patrizia; Naishadham, Krishna; Bayat, Ahmad; Giorcelli, Mauro, "Multi-Walled Carbon Nanotube Thin Film Loading for Tuning Microstrip Patch Antennas", *IEEE* ; 2016
- xxiv Krishna Naishadham, "An Investigation on the Tuning of a Microstrip Patch Antenna Using Carbon Nanotube Thin Films", *AP-S 2014* pp.900-901, 978-1-4799-3540-6/14/\$31.00 ©2014 IEEE
- xxv <http://www.antenna-theory.com/antennas/patches/patch3.php>
- xxvi J.H. Park, P.S. Alegaonkar, S.Y. Jeon, J.B. Yoo, "Carbon nanotube composite: Dispersion routes and field emission parameters," *Composites Science and Technology* 68, pp. 753–759, 2008.
- xxvii M.L. Goodwin, J.E. Harris, A. Hernandez, L.B. Gladden, Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians, *J. Diabetes Sci. Technol.* 1(2007)558–569.
- xxviii Kavita Rathee, Vikas Dhull, Rekha Dhull, Sandeep Singh, Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review, *Biochemistry and Biophysics Reports* 5 (2016) 35–54

- xxix Chandra S. Pundir n, Vinay Narwal, Bhawna Batra, "Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review", *Biosensors and Bioelectronics* 86 (2016) 777–790
- xxx J. Huang et al. A highly-sensitive L-lactate biosensor based on sol-gel film combined with multi-walled carbon nanotubes (mwcnts) modified electrode. *Mat. Sci. Eng. C*, 27(1):29 – 34, 2007.
- xxxi Cristina Boero, Sandro Carrara, Giovanna Del Vecchio, Laura Calzà, and Giovanni De Micheli, Fellow, IEEE, "Highly Sensitive Carbon Nanotube-Based Sensing for Lactate and Glucose Monitoring in Cell Culture", *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE*, VOL. 10, NO. 1, MARCH 2011
- xxxii Irene Taurino, Renate Reiss, Michael Richter, Michael Fairhead, Linda Thöny-Meyer, Giovanni De Micheli, Sandro Carrara, "Comparative study of three lactate oxidases from *Aerococcus viridans* for biosensing applications", *Electrochimica Acta* 93 (2013) 72– 79, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.080>
- xxxiii Eifion Jewell, Bruce Philip and Peter Greenwood, Improved Manufacturing Performance of Screen Printed Carbon Electrodes through Material Formulation *Biosensors* 2016, 6, 30; doi:10.3390/bios6030030
- xxxiv O'Neil, M.J. (ed.). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001., p. 1637
- xxxv Haynes, W.M. (ed.). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2013-2014, p. 3-210
- xxxvi Kavita Rathee a, Vikas Dhull b, Rekha Dhull a, Sandeep Singh a, n, Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review, *Biochemistry and Biophysics Reports* 5(2016)35–54
- xxxvii Sandro Carrara*, Camilla Baj-Rossi, Cristina Boero, Giovanni De Micheli, "Do Carbon Nanotubes contribute to Electrochemical Biosensing?", *Electrochimica Acta* 128 (2014) 102–112
- xxxviii I. Taurino, et al., *Nano Letters*, vol. 14, num. 6, pp.3180-3184, 2014.
- xxxix <https://www.rogerscorp.com/acs/products/39/RO3006-and-RO3010-Laminates.aspx>
- xI Mélanie Lé-Magda, Eric Dargent, Boulos Youssef, Alain Guillet², Jonathan Idrac and Jean-Marc Saiter, Thermal Properties Evolution of PCB FR4 Epoxy Composites for Mechatronic During Very Long Ageing, *Macromolecular Symposia Special Issue: POLYCHAR-19 World Forum on Advanced Materials*, Volume 315, Issue 1, pages 143–151, May 2012