POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

CORSO di LAUREA SPECIALISTICA in INGEGNERIA BIOMEDICA

Tecnologie fotolitografiche e *soft*-litografiche per la realizzazione di *patterns* biomolecolari su superfici *antifouling* di perfluoropolieteri

Relatore: Prof. STEFANO TURRI

Correlatore: Ing. CATERINA CREDI

Tesi di Laurea Magistrale di:

MARTINA MONGELLI 804518 A.A. 2013/2014

FRANCESCA MORENA 804288 A.A. 2014/2015

Ringraziamenti

Il nostro primo ringraziamento va ovviamente al Professor Turri, che ci ha permesso di lavorare all'interno del suo gruppo di ricerca, ci ha sempre dimostrato grande disponibilità, e ci ha prontamente fornito consigli utili al nostro lavoro.

Il grazie più sentito va al nostro "Boss" Caterina Credi, che ci ha guidate passo per passo durante quest'ultimo anno, trasmettendoci tutte le sue conoscenze, non solo teoriche, insegnandoci l'amore per la ricerca e la dedizione che essa richiede, e incoraggiandoci a non perdere mai l'ottimismo, rendendo la nostra esperienza più che piacevole.

Un particolare ringraziamento a Carmela De Marco, nonostante il poco tempo trascorso insieme, ci ha fornito preziosissimi insegnamenti e consigli, che abbiamo molto apprezzato.

Grazie a Elena, che avendo lavorato su argomenti affini ai nostri, ci ha fornito un punto di partenza dal quale proseguire.

Un grazie a tutti i tecnici incontrati durante il nostro lavoro per la loro disponibilità, in particolar modo a Gilly, che ci ha tenuto sotto la sua ala protettrice in questo anno di tesi. Grazie a Gianmarco, Giovanni Iannaccone e Carmen per aver sopportato le nostre innumerevoli incursioni in ufficio, e a Raffaella per averci aiutato con pazienza a svolgere tutte le prove necessarie.

Ringraziamo tutti gli altri membri del Lab, Giovanni Postiglione, Nelly, Oriana, Riccardo, Ludovico e Valeria per avere condiviso con noi questa esperienza, venendo in nostro soccorso al momento del bisogno.

Infine ringraziamo tutte le persone che hanno contribuito al nostro lavoro di tesi, la Professoressa Levi, che ci ha permesso di lavorare nei suoi laboratori, la Professoressa Raimondi per averci indirizzato verso questo progetto di ricerca, il CRESIB e l'IBEC per aver svolto alcune prove fondamentali al nostro lavoro all'interno dei loro laboratori.

Francesca & Martina

Indice

Indice **iii**

Indice delle figure **vi**

Indice dei grafici **xiv**

Indice delle tabelle **xvi**

Sommario **xvii**

Abstract **xxii**

Scopo della tesi **xxvii**

1 Introduzione **1**

1.1 Introduzione generale..... 2

1.2 *Patterning*..... 5

1.2.1 Tecnologie di *Patterning*..... 6

1.2.1.1 Fotolitografia..... 6

1.2.1.2 *Micro-contact printing* e *soft*-litografia..... 8

1.2.2 Biomolecole per il *Patterning*..... 12

1.2.2.1 Fotobiotina..... 12

1.2.2.2 Avidina..... 14

1.2.2.3 Eparina..... 15

1.2.2.3.1 Attività anti-malarica delle'eparina..... 17

1.3 Superfici *antifouling/fouling-release*..... 20

1.3.1 Proprietà *antifouling/fouling-release* dei PFPE-DMAs..... 23

1.4 Microfluidica..... 25

2 Attività sperimentale **30**

2.1 Sintesi e caratterizzazione dei substrati 31

2.1.1 Preparazione dei vetrini di supporto..... 31
2.1.2 PFPE-DMAs..... 33
2.1.2.1 PFPE-DMA 2000 34
2.1.2.2 PFPE-DMA 4000..... 36
2.1.2.3 Blend PFPE-DMA 4000:PFPE-DMA 2000=1:1..... 39
2.1.3 Metodi Analitici..... 39
2.1.3.1 Reazione di conversione-*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR*)..... 39
2.1.3.2 Cinetica di reticolazione..... 41
2.1.3.2.1 Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)..... 41
2.1.3.2.2 Fotocalorimetria (DSC-UV)..... 44
2.1.3.3 Caratterizzazione delle proprietà dei PFPE-DMAs..... 44
2.1.3.3.1 Analisi Dinamico-Meccanica (DMA)..... 44
2.1.3.3.2 Temperature di transizione termica..... 46
2.1.3.3.3 Angolo di contatto ed energia superficiale..... 46
2.1.4 Proprietà *antifouling* e *fouling-release*..... 50
2.2 *Patterning* di Biomolecole..... 52
2.2.1 *Micro-contact Printing* (μ-CP)..... 52
2.2.2 Fotolitografia..... 56
2.2.2.1 Reazione di sintesi dell'eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici..... 58
2.2.2.1.1 Analisi ^{1}H -NMR..... 61
2.2.3 Caratterizzazione del *Pattern*..... 63
2.2.3.1 Microscopio a contrasto di fase..... 63
2.2.3.2 Microscopio a fluorescenza..... 65
2.2.3.3 Microscopio a Forza Atomica (AFM)..... 67
2.2.3.4 Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)..... 69
2.2.3.5 Colorazione Alcian Blue..... 70
2.3 Test cellulari..... 72
2.4 Fabbricazione di microdispositivi fluidici in PFPE-DMA..... 73
2.4.1 Metodi di fabbricazione..... 74
2.4.1.1 Fotolitografia..... 74

2.4.1.2 *Soft*-litografia: Replica *Molding*..... 76
2.4.2 Caratterizzazione dei microcanali 78
2.4.2.1 Prove di *leakage*..... 78
2.4.2.2 Analisi al microscopio..... 79
2.4.3 Superfici in PFPE-DMAs microstrutturate..... 79
3 Risultati e Discussione 80
3.1 Sintesi e caratterizzazione dei substrati..... 81
3.1.1 Cinetica di reticolazione..... 81
3.1.1.1 Calorimetria differenziale a scansione - DSC..... 81
3.1.1.2 Fotocalorimetria - DSC-UV..... 85
3.1.2 Proprietà dei materiali..... 87
3.1.2.1 Temperature di transizione termica..... 87
3.1.2.2 Analisi dinamico meccanica-DMA..... 88
3.1.2.3 Angolo di contatto ed energia superficiale..... 91
3.1.2.4 *Proprietà antifouling* e *fouling-release*..... 96
3.2 *Patterning* di Biomolecole..... 99
3.2.1 Risultati preliminari..... 99
3.2.2 μ-*contact-printing* (μ-CP)..... 102
3.2.3 Fotolitografia..... 110
3.3 Test cellulari statici..... 117
3.4 Metodi di fabbricazione di microcanali..... 121
3.4.1 Fotolitografia..... 121
3.4.2 Replica *Molding*..... 122
3.4.3 Superfici in PFPE-DMA microstrutturate..... 125
Conclusioni e sviluppi futuri 128
Bibliografia 133

Indice delle figure

Figura 1.1.1: Esempio di applicazione di *microarrays* di cellule viventi. Componenti della matrice extracellulare (ECM) possono essere utilizzati come molecole esca e selettivamente immobilizzati sulla superficie di un biomateriale per differenti scopi: studiare il ruolo delle componenti ECM sull'adesione e nei meccanismi di differenziamento cellulare; isolare singole cellule per controllare la forma cellulare durante l'adesione e il conseguente orientamento lungo gli assi di divisione [5,7]..... 3

Figura 1.2.1: Schema del processo fotolitografico per i due tipi di *photoresist*. A sinistra, un *resist* negativo diventa meno solubile quando esposto a raggi UV (per esempio il SU-8); a destra, PMMA è un esempio di *resist* positivo, che diventa più solubile quando esposto alla radiazione UV [31]..... 7

Figura 1.2.2: Stampo in PDMS realizzato come replica di un master in silicio..... 8

Figura 1.2.3: Struttura del PDMS..... 9

Figure 1.2.4: Possibili deformazioni subite dalla microstrutture sulla superficie a causa della natura elastomerica del PDMS: a) *Pairing*, b) *sagging*, c) *shrinking*..... 10

Figure 1.2.5: Stampo in PDMS usato per trasferire un inchiostro su un substrato..... 10

Figura 1.2.6: Struttura chimica della biotina..... 12

Figure 1.2.7: EZ-link TFPA PEG3-Biotin (Thermo-scientific) costituita da il gruppo aril azide fotoattivo e da una testa di biotina..... 13

Figure 1.2.8: Descrizione semplificata della fotochimica del fenilazide: (1) espansione dell'anello; (2) reazione di addizione; (3) *intersystem crossing*. X è un simbolo generico che indica atomi di F o H..... 13

Figura 1.2.9: Struttura tetramerica dell'avidina..... 14

Figure 1.2.10: Strutture molecolari dell'unità maggiore e minore dell'eparina..... 16

Figura 1.2.11: Eparina biotinilata..... 16
Figura 1.2.12: Con l'attivazione tramite irraggiamento UV, tramite il quale il gruppo fenilazide diventa fenilnitrene, è possibile far reagire la fotobiotina con un substrato in PFPE-DMA. In seguito si lega avidina e eparina biotinilata..... 16
Figura 1.2.13: a) Struttura dell'eparina e b) dell'eparina metacrilata [58]..... 17
Figure 1.2.14: Ciclo vitale del parassita della malaria *P. falciparum*, il quale è in grado di raggiungere un alto grado di parassitemia grazie alla grande flessibilità del *pathway* dei recettori utilizzati per invadere i globuli rossi. La malattia si manifesta come risultato della stadio asessuato dopo che il parassita lascia il fegato e inizia a invadere gli eritrociti..... 18
Figura 1.2.15: Immagine al SEM del fenomeno del *rosetting*, in cui vi è la formazione di un coagulo nel quale eritrociti sani si legano ad un globulo rosso infetto..... 19
Figura 1.3.1: Schema di un film elastomerico tenuto tra un substrato rigido e un disco rigido. P = *peel force*; a = raggio di contatto; t = spessore del *coating*..... 23
Figura 1.3.2: PMMA, PEG, PFPE-DMA 2000 e 4000 messi a confronto dopo test statici con albumina fluorescente (ingrandimento 10x, tempo di esposizione 200ms, area presa in esame 650x500 μm2)..... 24
Figura 1.3.3: PMMA, PEG, PFPE-DMA 2000 e 4000 messi a confronto dopo test dinamici (tempo di esposizione 200ms)..... 24
Figura 1.3.4: Cellule MG-63 su un campione di PFPE-DMA 4000. Le cellule mostrano una tipica morfologia sferica che evidenzia la non adesione al substrato: a) immagine al microscopio a contrasto di fase dopo 2 h dalla semina; b) immagine al SEM 2 giorni dopo la semina (ingrandimento 500x, 50 pA, 20 kV), il campione è stato fissato con glutaraldeide secondo il protocollo standard..... 24
Figura 2.1.1: Plasma (GGK-RF20) presente nel nostro laboratorio..... 32
Figura 2.1.2: Schema di reazione di silanizzazione. Prima, i gruppi alcossilici del trialcossisilano vengono idrolizzati. Poi, si forma un oligomero da una reazione di condensazione. In seguito i gruppi idrossili formano legami a idrogeno con i gruppi OH della superficie del substrato e infine, durante l'asciugatura o la reticolazione, si forma un legame covalente con condensazione. Dopo l'idrolisi, gli altri *steps* accadono in simultanea..... 33

Figura 2.1.3: Struttura segmentata dei PFPE-DMAs. Rf è lo scheletro perfluorurato, Rh è il blocco idrogenato e G rappresenta il gruppo metacrilico che rende il polimero fotoreticolante..... 34
Figura 2.1.4: *Spin-coater* (WS-400-6NPP-Lite Spin Coater) presente nel nostro laboratorio..... 35
Figure 2.1.5: a) Bromografo MF1030 presente nel nostro laboratorio; b) alloggiamento della cameretta all'interno del bromografo utilizzata per inserire il campione in modo che si potesse ottenere un'atmosfera controllata grazie all'uso di un tubicino che mette in collegamento la bombola di azoto con l'alloggiamento..... 36
Figura 2.1.6: Sintesi e reticolazione di PFPE-DMAs fotoreticolabili. Il macrodiolo PFPE a) reagisce con IEM b) per dare il macromonomero PFPE-DMA macromonomero c), il quale viene fotoreticolato aggiungendo un fotoiniziatore d) ed esponendo alla luce UV..... 36
Figura 2.1.7: a) Componenti per la preparazione di PFPE 4000 assemblati. Apparato di reazione: il vessel di vetro con colonna refrigerante, sgocciolatore e *inlet* per azoto. L'intero sistema viene immerso in un bagno d'olio a 45° C; b) macrodiolo di PFPE durante l'eliminazione delle bolle d'aria; c) setacci posti a 300°C per evitare l'umidità..... 38
Figura 2.1.8: Interferogramma di Michelson usato nelle analisi FTIR..... 40
Figura 2.1.9: Schema riassuntivo dei componenti della DSC (Calorimetria Differenziale a Scansione)..... 42
Figura 2.1.10: Campione di PFPE-DMA durante le analisi con l'angolo di contatto statico..... 47
Figura 2.1.11: a) Processo per misurare l'angolo di contatto avanzante; b) Processo per misurare l'angolo di contatto recedente..... 50
Figura 2.1.12: In a) viene illustrato il *microarrayer* SPA2PRO® utilizzato per il *printing* automatizzato di proteine, in (b) Il *sample holder* in PMMA localizzato all'interno del *printing desk*..... 51
Figura 2.1.13: Schema del *pattern* di proteine stampato sui substrati per lo studio delle proprietà *antifouling*. Il *pattern* è costituito da 12 blocchi di 18 *dots* ciascuno..... 51
Figura 2.1.14: (a) La punta di stampa con all'interno il canale. (b) La soluzione di proteina viene caricata all'interno del canale della punta tramite capillarità. (c) La punta piatta permette la formazione di un sottile film di campione, in modo che la proteina venga stampata sul substrato tramite un contatto diretto..... 52

Figura 2.2.1: *Master* utilizzati per ottenere repliche in PDMS da utilizzare nel *micro-contact printing* a) G5, b) M3, c) L3 e d) O2..... 53
Figura 2.2.2: Schema rappresentativo dello *step* I del μ-CP: 1) replica di PDMS poggiata su substrato di blend parzialmente reticolato; 2) *printing* di fotobiotina esposto alla radiazione UV per favorire il *grafting* con il blend..... 54
Figura 2.2.3: Soluzione di neutravidina posta su campioni di blend funzionalizzati con fotobiotina..... 55
Figure 3.2.4: a) Lampada UV (AlphaDigiDoc Pro) presente nel nostro laboratorio; b) cameretta sotto la quale vengono alloggiati i campioni per mantenere un'atmosfera controllata di azoto..... 57
Figura 2.2.5: Fotomaschere utilizzate con *dots* circolari di diametro di 50 o 100 μm e distanziati sulla stessa fila di 100, 500 o 1000 μm per ottenere *patterns* con tecnica fotolitografica..... 58
Figura 2.2.6: Liofilizzatore (VirTis SP Scientific) in funzione..... 59
Figura 2.2.7: Pallone a tre colli contenente eparina metacrilata a cui è stato aggiunto Irgacure 2959, miscelato com 1-vynil-2-pyrrolidinone, come fotoiniziatore. Il pallone è stato ricoperto di carta stagnola per evitare l'esposizione accidentale e indesiderata alla luce..... 60
Figura 2.2.8: Immagine rappresentante lo spostamento chimico di protoni adiacenti ad atomi più o meno elettronegativi..... 62
Figura 2.2.9: Spostamento chimico corrispondente a diversi gruppi chimici nell'^{1}H-NMR..... 63
Figura 2.2.10: Schema di un microscopio a contrasto di fase..... 65
Figura 2.2.11: Rappresentazione dello spettro di assorbimento e di quello di emissioni che risultano parzialmente sovrapposti ma il secondo ha λ minore..... 66
Figura 2.2.12: *Sputter coating* (SC7640 Polaron)..... 70
Figura 2.2.13: Molecola Alcian Blue..... 71
Figura 2.2.14: Campioni durante colorazione con soluzione di *staining* dell'Alcian Blue..... 71
Figura 2.3.1: a) Petri contenenti globuli rossi infettati dal *P.falciparum* 3D7, parassita della malaria; b) aliquota di 3 ml della soluzione dei globuli rossi con eritrociti infetti prelevata

dalla Petri e c) posta in una Falcon da 10 ml per lo *step* di lavaggio per la rimozione del medium di coltura..... 73
Figura 2.3.2: a) 600 µl di soluzione vengono posti sopra ogni *array*; b) incubazione dei campioni a 37°C per 1 h; c) Giemsa *staining* sui campioni trattati..... 73
Figura 2.4.1: Dispositivo microfluidico con *pattern* di eparina su *layer* b..... 74
Figura 2.4.2: Fotomaschera posizionata su un substrato di PFPE 2000 pronto ad essere esposto alla radiazione UV..... 75
Figura 2.4.3: Schema riassuntivo dei *layers* che costituiscono il dispositivo ottenuto per fotolitografia..... 75
Figura 2.4.4: Master utilizzato per replica *molding* per la creazione di microcanali, è stata mantenuta una cornice di PFPE 2000 per ridurre lo spreco di materiali..... 76
Figura 2.4.5: Schema riassuntivo dei *layers* che costituiscono il dispositivo ottenuto per fotolitografia..... 77
Figure 2.4.6: a) e b) *Holder* con componenti utilizzato per controllare la pervietà dei canali ottenuti sia per replica *molding* sia per fotolitografia..... 78
Figure 2.4.7: Dispositivo per prove di *leakage* con inserita una siringa per spingere il fluido all'interno dei microcanali..... 78
Figura 3.1.1: Profilo di una goccia di acqua depositata su un substrato di blend..... 91
Figura 3.1.2: Esempio di *arrays* prima della procedura di lavaggio con acqua (a) e c)) e dopo (b) e d)) ottenuti con *printing* di streptavidina AF555 0,2 mg/ml rispettivamente su superfici di PMMA e PFPE-DMA 4000..... 97
Figura 3.2.1: L'avidina-FITC si lega all'*array* di fotobiotina sul substrato di PFPE-DMA. Il basso segnale di fluorescenza rivela la scarsa efficienza del trasferimento di fotobiotina tramite *µ-contact printing*..... 100
Figura 3.2.2*: Self-assembly* di avidina-FITC su fotobiotina immobilizzata su PFPE-DMA 2000. Il grafico accanto dimostra una distribuzione uniforme. Tuttavia il forte segnale di rumore in fluorescenza proveniente dal *background*, rivela un assorbimento aspecifico di avidina-FITC sulla superficie del PFPE-DMA 2000..... 100
Figura 3.2.3: *µ-contact printing* della fotobiotina realizzato con successo su un substrato in blend. Esso mostra ottime proprietà di *anti-fouling* e efficiente trasferimento/*grafting* della fotobiotina..... 101
Figura 3.2.4: Vengono riportati i segnali in fluorescenza dei quattro fotoiniziatori: a)

Irgacure 369; b) 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone - DMPA; c) Lucirin tpo-l; d) Darocur. Quest'ultimo ha intensità del segnale di autofluorescenza più basso, legato al minor numero di anelli aromatici nella struttura, pertanto presenta la miglior *performance* tra i quattro fotoiniziatori considerati..... 101

Figura 3.2.5: *Steps* del procedimento ottimizzato per ottenere un *pattern* di eparina sfruttando la tecnica di μ-CP e il meccanismo di riconoscimento molecolare avidina-biotina. Il processo prevede l'attivazione della fotobiotina con raggi UV che reagisce con doppi legami C=C presenti sulla superficie parzialmente reticolata del blend di PFPE. Successivamente l'*array* di fotobiotina viene incubato con una soluzione di streptavidina che si lega selettivamente dove è localizzata la fotobiotina. Infine si sfruttano i siti di legame per la biotina ancora liberi presenti sulla streptavidina per l'autoassemblaggio di un ulteriore molecola biotinilata. Come molecole biotinilate sono state utilizzate biotina fluorescente e eparina biotinilata..... 102

Figura 3.2.6: a) e b) Immagini al microscopio a fluorescenza di *arrays* di avidina-FITC su blend..... 103

Figure 3.2.7: Immagini al microscopio a fluorescenza dell'*array* di biotina-FITC in diverse geometrie a), c) e d), alternano triangoli, quadrati e cerchi (≈ 25 μm) b), *dots* triangolari (ϕ 25 μm). Si nota un eccellente comportamento *anti-fouling* del blend..... 104

Figura 3.2.8: Immagini ottenute con microscopio a fluorescenza di *patterns* con biotina fluorescente: a) campione con geometria G5 a linee parallele; b) campione con geometria L3 a frecce..... 104

Figura 3.2.9: Immagini di due campioni rispettivamente, a) e c), in fluorescenza e ,b) e d), a contrasto di fase di *arrays* di biotina-FITC su blend..... 105

Figura 3.2.10: Immagini del microscopio a contrasto di fase di *arrays* di eparina biotinilata in diverse geometrie: a), c) O2; b), d) M3; e), g), h) *dots* di forma circolare (ϕ 25 μm) distanziati di 10 μm; f) L3..... 106

Figura 3.2.11: Colorazione Alcian Blue di *arrays* di eparina realizzati tramite *micro-contact printing*..... 106

Figura 3.2.12: Substrato con superficie danneggiata a causa della scarsa reticolazione in seguito al contatto con la replica in PDMS..... 107

Figura 3.2.13: Il *pattern* non è dovuto al *grafting* della molecola, ma alla microstrutturazione del substrato in blend a causa del peso eccessivo applicato sulla replica

durante il *printing*..... 107
Figure 3.2.14: a) *Dragging* dello stampo sul substrato che comporta un doppio *printing* dell'*array* b) *Pattern* non uniforme; c) Materiale in eccesso e formazione di agglomerati..... 108
Figura 3.2.15: Immagini dello *spot* ottenute tramite AFM dei vari steps del *grafting*: a)blend parzialmente reticolato; b*) spot* con *grafting* di fotobiotina c) *spot* con *grafting* di neutravidina d) *spot* con *grafting* di eparina..... 109
Figura 3.2.16: Gel ottenuto dalla soluzione di eparina funzionalizzata dopo una prova di reticolazione massiva..... 112
Figura 3.2.17: *Arrays* di eparina metacrilata legata al substrato in blend osservati al microscopio ottico. La disposizione e la dimensione dei *dots* risulta variabile: a), b) diametro *dots* e distanza tra gli *spots* 100 µm; c), d), e), f) *dots* di 100 µm distanziati di 500 µm; g) dots di 100 µm distanziati di 700 µm; h) *dots* di 50 µm distanziati di 500 µm.... 113
Figura 3.2.18: Differenza nel *grafting* dell'eparina metacrilata tra *patterns* con disposizione spaziale diversa: in alto distanza tra i *dots* di 500 µm, in basso di 100 µm..... 113
Figura 3.2.19: Immagini al SEM dello stesso campione, ad ingrandimenti sempre maggiori, con *patterns* di eparina metacrilata su blend con *dots* di 100 µm distanziati di 500 µm..... 114
Figura 3.2.20: Microanalisi al SEM di un campione con *pattern*s di eparina metacrilata su blend. La linea 1 nera fa riferimento allo *spot* privo di increspature, la linea 2 azzurra fa riferimento al substrato, la linea 3 blu fa riferimento allo *spot* con increspature..... 114
Figura 3.2.21: Colorazione con Alcian Blue di una goccia di eparina metacrilata legata ad un substrato di blend parzialmente reticolato (texp=20s)..... 115
Figura 3.2.22: Colorazione Alcian Blue delle increspature all'interno di uno *spot* di eparina..... 116
Figura 3.2.23: a) Substrato danneggiato dovuto a scarsa reticolazione b) assenza di increspature negli *spots* dovuta a eccessiva reticolazione del substrato..... 116
Figura 3.2.24: Immagini al microscopio ottico di campioni con eparina metacrilata in concentrazione troppo elevata: a) agglomerato; b) bordo della maschera..... 117
Figura 3.2.25: Immagini al microscopio ottico di eparina metacrilata su blend nel caso di *pattern*, a) e b), con *dots* ravvicinati (10 µm in direzione y)..... 117

Figure 3.3.1: a) Globuli rossi non infetti aderiscono al substrato blend privo di *pattern*; b) c) e d) i globuli rossi infettati da *P.falciparum* aderiscono in corrispondenza dei *dots* di eparina. il DNA del parassita appare viola..... 118
Figure 3.3.2: Globuli rossi formano agglomerati in corrispondenza degli spots di eparina..... 118
Figura 3.3.3: a) Agglomerati di globuli rossi costituiti sia da cellule infette sia da cellule sane; b) Cellule infette e frammenti di DNA immobilizzati sullo *spot* di eparina..... 119
Figura 3.3.4: Cellule infette disposte lungo gli *spots* di eparina. In questo caso lo *spot* presenta una geometria triangolare..... 120
Figura 3.3.5: Cellule infette disposte lungo gli *spot*s di eparina. In questo caso lo *spot* presenta una geometria quadrata..... 120
Figura 3.4.1: Microcanali ottenuti con fotolitografia in cui è stato praticato un *inlet* per permette l'inserimento di un liquido all'interno..... 122
Figura 3.4.2: Microcanali realizzati tramite replica *molding*..... 123
Figura 3.4.3: Prova di *leakage* su microcanali. Il liquido iniettato nei canali è la fluoresceina..... 123
Figura 3.4.4: a), b) Immagini al microscopio ottico del dispositivo microfluidico con *patterns* di avidina-FITC interno al canale..... 123
Figura 3.4.5: Immagini al SEM di microcanali fabbricati con, a) e b), replica *molding* e, c) e d), fotolitografia..... 124
Figura 3.4.6: a) *Master* utilizzato come stampo e superfici microstrutturate ottenute in b) PFPE-DMA 2000 e c), d) in blend..... 125
Figura 3.4.7: Immagini al SEM a), b) di substrati microstrutturati in PFPE-DMAs a ingrandimenti differenti; la figura c) è stata ottenuta inclinando il campione di 68° per valutare l'altezza delle microstrutture ottenute..... 126
Figura 3.4.8: a), b) Immagini al microscopio fluorescente di substrati microstrutturati funzionalizzati con avidina-FITC..... 127

Indice dei grafici

Grafico 2.1.1: Spettri IR acquisiti a differenti intervalli di tempo rispetto all'inizio della reazione. Il picco relativo al gruppo NCO (2277 cm^{-1}) scompare progressivamente con la simultanea comparsa del gruppo uretano (1728 cm^{-1}). La reazione termina dopo 5 ore... 41

Grafico 3.1.1: Picchi esotermici ottenuti tramite DSC attraverso l'analisi di campioni di blend esposti alla luce UV per differenti intervalli di tempo. Aumentando il tempo di esposizione diminuisce l'area sottesa dal picco..... 82

Grafico 3.1.2: Curva di conversione del blend in funzione del tempo di esposizione ai raggi UV. A 60s viene raggiunto il 100% di conversione..... 83

Grafico 3.1.3: Confronto tra le % di conversione in funzione del tempo di esposizione di blend, PFPE-DMA 2000 e PFPE-DMA 4000. Si nota come il PFPE-DMA 2000 non raggiunga il 100% di conversione dopo 100s di esposizione..... 84

Grafico 3.1.4: Picchi di esotermia ottenuti per il blend tramite analisi di fotocalorimetria. Si nota come il picco esotermico maggiore sia relativo al campione non esposto ai raggi UV nel bromografo, ma completamente reticolato dalla sorgente UV presente nel calorimetro..... 85

Grafico 3.1.5: Curva di conversione in funzione del tempo di esposizione relativa al blend Dar 1%. Come è possibile notare il 100% di conversione viene raggiunto a 60s, in accordo con quanto rilevato tramite DSC..... 86

Grafico 3.1.6: Confronto dei valori di conversione ottenuti tramite DSC-UV per campioni *thick* e per campioni *thin*. Questi ultimi raggiungono il 100% di conversione già dopo 20s di esposizione, mentre i campioni *thick* mostrano una totale reticolazione dopo 60s..... 87

Grafico 3.1.7: Curva ottenuta tramite analisi DSC del blend..... 88

Grafico 3.1.8: Componente conservativa del modulo a temperatura costante di 60° C e 25°C per campioni in blend con tempo di esposizione di 10 minuti..... 89
Grafico 3.1.9: G' e G" in funzione della temperatura del blend..... 90
Grafico 3.1.10: Tanδ in funzione della temperatura del blend con individuazione a circa 15° C della seconda temperatura di transizione vetrosa..... 90
Grafico 3.1.11: Andamento dell'isteresi nel tempo relativa al PFPE 2000..... 95
Grafico 3.1.12: Andamento dell'isteresi nel tempo relativa a PFPE 4000..... 95
Grafico 3.1.13: Andamento dell'isteresi nel tempo relativa al blend. 95
Grafico 3.1.14: a) BSA, b) IgG, e c) StreptAv integrale della densità misurata per gli *arrays* ottenuti dopo lavaggio e asciugatura con aria, inoltre la *brightness* misurata per il PMMA risulta la più elevata mentre quella dei materiali a base dei PFPE è confrontabile con il PEG-MA, noto materiale con proprietà *antifouling*..... 98
Grafico 3.2.5: Spettro NMR dell'eparina a) prima e b) dopo la metacrilazione. Riquadrati in rosso sono visibili i picchi corrispondenti ai doppi legami del carbonio e in rosso quelli del gruppi metilico. Sotto ogni picco sono riportati i valori degli integrali che crescono da a) a b)..... 111

Indice delle tabelle

Tabella 2.1.1: Peso molecolare (MW) [g/mol] del macrodiolo di PFPE, dell'IEM; densità (ρ) [g/ml] dell'IEM; rapporto tra IEM/Freon [v/v]..... 37
Tabella 2.1.2: Peso del macrodiolo di PFPE utilizzato nella sintesi di PFPE-DMA 4000. 37
Tabella 3.1.1: Percentuale di conversione del polimero e area di picco normalizzata per campioni a differente tempo di esposizione ottenuta tramite DSC..... 83
Tabella 3.1.2: % di conversione e area di picco in funzione del tempo di esposizione relativi al blend ottenuti tramite DSC-UV..... 85
Tabella 3.1.3: Confronto tra le componenti elastiche (G') e i moduli elastici (E) ottenuti per il blend, il PFPE-DMA 2000 e PFPE-DMA 4000..... 89
Tabella 3.1.4: Misure di angoli di contatto statico con acqua..... 91
Tabella 3.1.5: Misure di angoli di contatto statico con acqua su substrato di blend prima e dopo il trattamento al plasma..... 92
Tabella 3.1.6: Valori di tensione superficiale e loro componenti calcolate con il metodo di Wu ottenuti per i vari PFPE-DMAs..... 93
Tabella 3.1.7: Tensioni superficiali determinate con il metodo EOS..... 93
Tabella 3.1.8: Valori di angoli di contatto dinamici e relativa isteresi per le superfici in PFPEs..... 94
Tabella 3.2.1: Altezze relative dello *spot* ad ogni *step* del *grafting*, corrispondente al legame di una biomolecola..... 109

Sommario

Lo sviluppo e l'ottimizzazione di tecnologie per la realizzazione di *patterns* biomolecolari è un ambito di ricerca in crescente sviluppo nel settore della biomedicina, poiché permette di immobilizzare singole popolazioni cellulari e di individuare comportamenti specifici a livello della singola cellula, svincolandosi dal comportamento medio di un'intera popolazione di cellule come avviene per le tradizionali colture in vitro. Il rapido sviluppo della fotolitografia e della *soft*-litografia tra le varie tecnologie ha fornito un impulso notevole all'ingegnerizzazione di dispositivi per la selezione e l'isolamento di cellule rare. Dall'altro lato, la ricerca di materiali di supporto con adeguate caratteristiche *anti-biofouling*, necessarie per evitare l'adesione aspecifica di proteine sul substrato, è un ambito di estrema attualità, che deve essere ulteriormente approfondito per l'ottimizzazione di tali dispositivi. In tale scenario si colloca il nostro lavoro di ricerca, il quale, sfruttando tecniche di fotolitografia e *micro-contact printing*, si propone di realizzare *patterns* biomolecolari per l'immobilizzazione di globuli rossi infettati dal *Plasmodium* della malaria su un substrato avente caratteristiche *antifouling* e *fouling-release*. In particolare, un *array* di eparina è stato depositato su un substrato di perfluoropolietere-uretano-dimetacrilato (PFPE-DMA). Due tipi di materiali, nella classe dei perfluoropolieteri fotoreticolabili, sono stati esplorati e le loro performance messe a confronto. Si è deciso infine di utilizzare un blend composto da due PFPE-DMA di diverso peso molecolare in parti uguali che permettesse di mediare i vantaggi e gli svantaggi dei due materiali.

L'eparina funge da esca per gli eritrociti infetti, che durante la fase di infezione del sangue si legano con globuli rossi sani, portando alla formazione di coaguli, con conseguenze

anche fatali causate dall'occlusione della microcircolazione locale. Gli *arrays* di eparina risultano altamente selettivi e consentono così la disposizione ordinata di cellule *target* sul substrato. Diverse strategie sono state adottate per la realizzazione di tali *patterns* su un substrato contenente gruppi metacrilici reattivi: *(i)* un primo metodo consiste nel legare, tramite *micro-contanct printing*, eparina biotinilata ad un *pattern* sottostante di avidina, a sua volta autoassemblata su un *pattern* di fotobiotina legato chimicamente al substrato, sfruttando la nota affinità tra avidina e biotina; *(ii)* in secondo luogo, eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici è stata legata chimicamente, tramite fotolitografia, a un substrato sulla cui superficie sono presenti doppi legami C=C non reagiti.

Il primo metodo, in particolare, si distingue per la sua versatilità, in quanto qualsiasi molecola biotinilata può legarsi all'*array* di avidina e sostituire l'eparina usata in questa tesi, con la possibilità quindi di isolare differenti popolazioni di cellule rare. Il secondo metodo invece si distingue per la realizzazione del *pattern* in un unico *step*, poichè prevede un *grafting* diretto della biomolecola al substrato.

Le superfici funzionalizzate con *patterns* possono essere integrate in dispositivi microfluidici. Tali dispositivi sono stati realizzati con due metodologie, la fotolitografia e la replica *molding*. Sono state inoltre realizzate superfici in PFPE-DMAs con microstrutture, le cui estremità sono state funzionalizzate con *patterns* biomolecolari di eparina, tramite *micro-contact printing*. Dispositivi microfluidici integrati con superfici funzionalizzate con biomolecole esca permettono un'immobilizzazione maggiormente selettiva delle cellule *target* in condizioni dinamiche, nelle quali è possibile inoltre sfruttare al massimo le potenzialità *antifouling* e *fouling-release* dei PFPE-DMAs utilizzati. Inoltre la possibilità di utilizzare microstrutture all'interno dei microcanali permette di favorire l'interazione biomolecola esca-cellula *target*.

La tesi è stata sviluppata in tre capitoli. Nel primo capitolo s'introduce una descrizione dei materiali, delle interazioni molecolari sfruttate e delle tecnologie utilizzate per la realizzazione del *pattern*. Viene descritta brevemente la tecnologia dei *microarrays* per il *sorting* cellulare, presentandone le applicazioni, i vantaggi e i possibili meccanismi e biomolecole che possono essere sfruttati. Viene presentata una spiegazione dei principi base della fotolitografia e della *soft*-litografia, e vengono illustrate le biomolecole utilizzate, in termini di struttura e proprietà. Viene descritta la fotobiotina e il suo legame altamente specifico con l'avidina, mettendone in mostra l'elevata versatilità. L'eparina

viene indicata come esca biomolecolare e ne viene illustrato il ruolo svolto nell'interazione con globuli rossi infettati dal *Plasmodium* della malaria. Vengono poi descritti i perfluoropolieteri come polimeri fotoreticolabili e vengono indicati come ottimi materiali con proprietà *antifouling* e *fouling-release*. Infine, viene riportata una breve descrizione delle tecnologie utilizzate nell'ambito della microfluidica, e la combinazione di quest'ultima con il *patterning* biomolecolare per studi in condizioni dinamiche.

Nel secondo capitolo vengono descritte le prove sperimentali effettuate. Vengono inizialmente descritti i materiali utilizzati e in seguito i metodi per: (i) caratterizzare le proprietà dei materiali, (ii) realizzare i *patterns*, (iii) caratterizzare dal punto di vista ottico questi ultimi, (iv) validare, mediante test cellulari statici, i *patterns* realizzati, (v) e la fabbricazione di dispositivi microfluidici e l'integrazione con superfici funzionalizzate con *patterns*.

Vengono esaminate le proprietà elastiche dei materiali, di superficie e le temperature di transizione vetrosa per effettuare un confronto e selezionare il materiale più idoneo alle applicazioni specifiche per questa tesi. Viene analizzata, poi, la cinetica di reticolazione per valutare le tempistiche di fotoreticolazione in modo da ottenere un substrato con una percentuale di conversione adeguata. Sui materiali sono state inoltre effettuate prove *antifouling* a conferma dei dati già esistenti. Viene introdotto il *patterning*, attraverso la descrizione delle due tecnologie utilizzate per ottenere il *grafting* dell'eparina su un substrato, il *micro-contact printing* e la fotolitografia. La caratterizzazione ottica delle superfici funzionalizzate ottenute viene effettuata con microscopia a contrasto di fase (anche dopo i test cellulari), a fluorescenza, a forza atomica e a scansione elettronica. Infine vengono elencate le tecniche di fabbricazione e la caratterizzazione ottica dei dispositivi microfluidici e delle superfici microstrutturate in PFPE-DMAs.

Il terzo capitolo riporta i risultati ottenuti dalle prove sperimentali, e la loro discussione. In una prima sezione ci si focalizza sulla caratterizzazione dei materiali, seguita da una seconda parte relativa ai *patterns* ottenuti, e da una terza in cui vengono presentati i risultati dei test cellulari. Infine sono riportati i risultati preliminari ottenuti dalla fabbricazione dei dispositivi microfluidici e di superfici in PFPE-DMAs microstrutturate.

Essendo i PFPE-DMAs polimeri fotoreticolabili, controllandone la cinetica di reticolazione e di conseguenza la presenza in superficie di doppi legami C=C non reagiti, è possibile realizzare *patterns* con differenti tecniche di immobilizzazione di biomolecole.

Tra i tre possibili candidati, il PFPE-DMA 2000, il PFPE-DMA 4000 e un blend costituito dai due PFPE-DMAs in parti uguali, quest'ultimo viene utilizzato per la realizzazione dei substrati, in quanto presenta un comportamento intermedio tra i due precedenti. L'analisi della cinetica di reticolazione, effettuata attraverso due analisi calorimetriche, a scansione differenziale (DSC) e fotocalorimetria (DSC-UV), ha consentito di ricavare le percentuali di conversione per permettere la corretta individuazione di substrati il cui grado di reticolazione garantisca la presenza di doppi legami C=C disponibili per la realizzazione del *pattern*. Viene, quindi, indicato il substrato con tempo di esposizione ai raggi UV di 20s come ideale per la realizzazione dei campioni. Esso presenta, infatti, una percentuale di conversione compresa tra il 44% (DSC-UV) e il 53 % (DSC), tale da permettere il *grafting* delle biomolecole.

La caratterizzazione superficiale ha indicato i perfluoropolieteri come substrati idrofobici, con un angolo di contatto statico maggiore di 100°. La tensione superficiale è stata ricavata mediante il metodo EOS (Equation Of State) e l'approccio di Wu. Quest'ultimo in particolare consente l'identificazione di una componente polare e di una dispersiva. Come previsto, la componente dispersiva risulta preponderante. Le misure di angolo di contatto dinamico mostrano isteresi cinetica, indice di riarrangiamento superficiale, in particolare per il PFPE-DMA 4000. La temperatura di transizione vetrosa è stata rilevata mediante analisi calorimetrica e si attesta attorno ai -111°C per entrambi i PFPE-DMAs e il blend, con una modesta differenza dovuta al diverso peso molecolare dei polimeri. L'analisi dinamico-meccanica ha inoltre evidenziato la presenza di una seconda transizione relativa alle catene uretano-dimetacrilato laterali che può essere messa in relazione con l'elasticità entropica (aumento del modulo con la temperatura) manifestata dal polimero a partire da 0°C, in particolare quella del blend viene individuata a 15°C. Le proprietà *antifouling* sono state ulteriormente confermate dai test effettuati.

Differenti strategie chimiche possono essere sfruttate per l'immobilizzazione di biomolecole sulla superficie. Nel nostro caso, viene sfruttata la capacità di biomolecole con gruppi fotoreattivi di legarsi al substrato in seguito all'esposizione alla luce UV. Nel caso del *micro-contact printing*, vengono realizzati *arrays* di fotobiotina, biomolecola che possiede il gruppo reattivo fenilazide, sui quali è possibile un *self-assembly* di avidina, proteina che possiede una forte affinità con la biotina. L'utilizzo di biomolecole marcate con fluoresceina, ha permesso di validare l'effettivo *grafting* ai differenti *steps* che viene,

inoltre, confermato dall'analisi tramite microscopio a forza atomica, il quale riporta incrementi in altezza degli *spots*. Nella fotolitografia viene invece sfruttata la funzionalizzazione dell'eparina con gruppi metacrilici, i quali possono reagire con i doppi legami C=C non reagiti presenti sulla superficie del substrato in blend di PFPEs parzialmente reticolato, dando luogo a un *grafting* diretto della biomolecola, come dimostrato da immagini di microscopia ottica e elettronica. Test cellulari statici effettuati sugli *arrays* di eparina incubandoli con un campione di sangue infetto, costituito sia da globuli rossi infettati dal *Plasmodium* della malaria, sia da globuli rossi sani, hanno confermato l'effettiva capacità di *sorting* dell'esca biomolecolare utilizzata, come riportato da immagini al microscopio ottico. Le cellule, infatti, formano agglomerati in corrispondenza degli *spots*, mentre le proprietà *antifouling* dei substrati non favoriscono l'adesione aspecifica sul resto della superficie non coperta dal *pattern*.

Sono stati, inoltre, fabbricati dispositivi microfluidici in PFPE-DMAs, tramite fotolitografia e replica *molding*, la cui caratterizzazione ottica permette di confermare la pervietà e l'effettivo *bonding* tra le due superfici. Sono stati effettuati i primi tentativi di integrazione del *pattern* all'interno dei canali, seppure ancora ad uno stato iniziale. Infine è stata indagata un'ulteriore strategia, che comporta la realizzazione di superfici microstrutturate in PFPE-DMAs, che possono essere integrate all'interno dei microcanali. Funzionalizzando le microstrutture con biomolecole si può favorire l'interazione con le cellule *target* con lo scopo di incrementare la selettività di cattura degli *array* di eparina su blend e di sfruttare le proprietà di *fouling-release* del substrato stesso. L'obiettivo futuro è la realizzazione e ottimizzazione di dispositivi che simulino le condizioni fisiologiche e che permettano di sfruttare al meglio le caratteristiche dei materiali individuati.

Abstract

The selective and spatially resolved patterning of biomaterials has been increasingly researched as one of the key technologies for the capture of rare cells and for the analysis of individual cellular processes. In vitro traditional cell cultures study the average response within a cell population but cell shape and hence behavior can vary significantly from cell to cell. Thus, new methods to physically isolate large numbers of individual cells controlling their shape would be extremely valuable. The synthesis of new anti-fouling/fouling-release materials together with the development of photolithografic and soft-lithographic technologies are encouraging the research on biomolecular patterning. The performance of the final patterned substrates is strikingly affected by the substrate material itself that should meet specific requirements. In particular, anti-fouling/fouling-release characteristics are necessary to avoid non-specific protein and cell binding on the substrate.

The aim of this work, is realize biomolecular patterns by exploiting photolithografic process and micro-contact-printing in order to capture red blood cells infected by *Plasmodium Falciparum* (pRBCs), the malaria parasite, onto anti-fouling/fouling release surfaces. Particularly, an heparin array was arranged onto a UV-curable perfluoropolyether (PFPE-DMA) substrate. PFPEs were chosen in this work for their peculiar physico-chemical properties that make them suitable for a wide variety of applications including biomedical ones. Two photocurable PFPE materials were evaluated and their performance compared. Finally, it was decided to use a blend composed of two different molecular weight PFPE-DMAs in equal parts, in order to mediate the advantages and disadvantages of the two materials. Heparin was chosen because of its role as competitors towards pRBCs, which during the blood phase bind healthy red blood cells, leading to the clots

formation, with serious consequences including death caused by the occlusion of the local microcirculation. Heparin arrays are highly selective thus allowing an orderly arrangement of target cells on the substrate. Two different strategies were employed for heparin patterning: *(i)* biotinylated-heparin was linked to avidin patterned on an underlying photobiotin array, chemically linked to the substrate and obtained by μ-contact printing, exploiting the high affinity between biotin and avidin; *(ii)* methacrylated-heparin was directly bound to the unreacted double bonds of a partially cross-linked PFPE surface through a photo-lithographic process. The first method, in particular, is characterized by high versatility, indeed any biotinylated molecule may bind the avidin array and replace heparin used in this thesis, and consequently this method offers the possibility of isolating different populations of rare cells. The photolithographic method allows the pattern realization in a single step, because it provides a direct grafting of the biomolecule onto the substrate.

The patterned surfaces could be integrated in microfluidic devices. These devices were produced by two methods, photolithography and replica molding. Also microstructured PFPE-DMA surfaces were created, and the microstructure ends were functionalized by micro-contact printing with heparin pattern. Microfluidic devices with integrated surface functionalized with biomolecular baits allow more selective immobilization of target cells under dynamic conditions, thus better exploiting the antifouling and fouling-release PFPE-DMAs properties. Furthermore, the use of microstructured microchannels allows a better interaction biomolecule bait-target cell.

This thesis is organized in three chapters. In the first chapter, materials description, molecular interactions and technologies used for the pattern realization are described. The microarrays technology for cell sorting is briefly described together with their applications, benefits finally, possible mechanisms and biomolecules baits that can be exploited are illustrated. An explanation of photolithography and soft lithography basic principles, and the biomolecules used, in terms of structure and properties, were introduced. Photobiotin and its highly specific affinity with avidin are described, also showing their high versatility. Heparin is indicated as biomolecular bait and its role in the interaction with pRBCs is demonstrated. Then perfluoropolyethers are described as photocurable polymers and as excellent materials with antifouling and fouling-release properties. Finally, a brief

description of technologies used in microfluidics, and the combination of the latter with patterning for biomolecular studies in dynamic conditions are reported.

The experimental activity is described in the second chapter. Initially it was decided to describe the materials and then the methods for: (i) characterizing the materials properties, (ii) realizing the pattern, (iii) characterizing the pattern, (iv) validating the patterns obtained, by cellular static tests, (v) and producing microfluidic devices and their integration with patterned surfaces.

The elastic materials properties, the surface properties and the glass transition temperatures of PFPEs are examined in order to make a comparison and select the most suitable material for specific applications in this thesis. Then, the cross-linking kinetics is analyzed to evaluate the relationship between the curing time and the substrate conversion. The antifouling materials properties were also evaluated in order to confirm existing data. Heparin grafting was realized onto the substrate, implementing two different technologies, the micro-contact printing and photolithography. Phase-contrast (even after the cell test), fluorescence, atomic force and scanning electron microscopy were used to characterize the patterned surfaces. Finally, the manufacturing techniques and the characterization of microfluidic devices and PFPE-DMAs microstructured surfaces are illustrated.

The third chapter presents the results obtained from experimental tests, and their discussion. The first section is focused on the materials characterization, followed by a second part related to the patterns obtained, and a third section in which cell tests results are presented. Finally, the preliminary results obtained from the microfluidic devices and PFPE-DMA microstructured surfaces realization are reported.

As PFPE-DMAs are photocurable, by controlling the cross-linking kinetics and consequently the presence on the surface of unreacted double bonds C = C, it is possible to create patterns with different immobilization techniques. Between the three possible candidates, PFPE-DMA 2000, PFPE-DMA 4000 and a blend composed by the two PFPE-DMAs in equal parts, the latter was chosen for the substrate realization, due to its intermediate behavior. Differential scanning calorimetry (DSC) and photocalorimetry (DSC-UV) were exploited to study the cross-linking kinetics, in order to control the polymer conversion as a function of curing time and to correctly obtain partially cured substrates whose cross-linking degree ensures the presence of C=C double bonds, available for pattern realization. The substrate with curing time of 20s is chosen for the pattern

realization. It has, in fact, a conversion rate between 44% (DSC-UV) and 53% (DSC), that allows the biomolecular grafting.

The surface characterization indicated perfluoropolyethers as hydrophobic substrates, with a static contact angle greater than 100°. The surface energy was obtained using Equation Of State (EOS) method and Wu approach. The latter, in particular, allows the polar and dispersive component identification. As expected, the dispersive component is predominant. The dynamic contact angle measures show kinetic hysteresis, indicative of surface rearrangement, in particular in case of PFPE-DMA 4000. The glass transition temperatures were detected by calorimetric analysis and they are about -111 ° C for both PFPE- DMAs and blend, with a small difference due to different molecular weight. The dynamic-mechanical analysis also highlighted the presence of a second transition relative to urethane-dimethacrylate side chains that can be related to entropic elasticity, manifested by the polymer over 0 ° C; in particular the blend second temperature is detected at 15 ° C. Antifouling properties were confirmed by tests made in experimental activity.

Different chemical strategies can be exploited for biomolecules immobilization on the surface. In our case, the ability of biomolecular photoreactive groups to bind the substrate upon UV light exposure is exploited. In the case of micro-contact printing, photobiotin, a biomolecule with the reactive group phenyl-azide, is used to realize a biotin arrays, following a possible avidin self-assembly. Avidin is a protein that has a strong affinity to biotin. The use of biomolecules fluorescein labeled, allows, after every step, the grafting validation which is also confirmed by height increase studied by atomic force microscope analysis. Following the photolithographic process, instead, the methacrylate groups conjugated to the heparin can react with the unreacted double bonds on the partially cross-linked blend substrate, causing biomolecule direct grafting, as demonstrated by optical and electronics microscopy images. Static cellular tests, carried out on heparin arrays by incubating with a infected blood sample, composed of both pRBCs and healthy red blood cells, confirmed the effective sorting capacity of biomolecular bait, as reported by optical microscope images. The cells form agglomerates over spots while the substrates antifouling properties inhibit aspecific adhesion on the bare surface.

Photolithography and replica molding were also exploited to fabricate PFPE-DMA microfluidic devices, whose optical characterization is used to confirm channels patency and effective bonding between surfaces. Finally further strategy was investigated, which

involves realization of PFPE-DMA microstructured surfaces, that can be integrated within microchannels. The possibility to functionalize the microstructures with biomolecules can encourage target cells interaction with the aim of increasing the heparin array capture selectivity on the blend and exploiting the substrate fouling-release properties. The future goal is to realize and optimize the microstructured devices in order to simulate physiological conditions and to take the best advantage of the identified materials properties.

Scopo della tesi

Obiettivo principale di questo lavoro di tesi è lo sviluppo e l'ottimizzazione di tecnologie di *patterning* per la realizzazione di *arrays* di eparina su superfici di perfluoropolieteri fotoreattivi (PFPE-DMAs), per la cattura e l'isolamento di globuli rossi infettati dal plasmodio della malaria. Le applicazioni possono essere varie: dalla diagnostica, alla ricerca, allo sviluppo e alla valutazione di farmaci o all'analisi del comportamento della singola cellula e di singoli processi cellulari. Verificando la selettività di cattura dell'eparina nei confronti dei globuli rossi infettati è possibile poi sfruttare questa macromolecola per il *coating* di farmaci antimalarici aumentandone l'efficacia e riducendone la tossicità.

Primo *step* fondamentale è rappresentato dalla scelta e caratterizzazione del materiale da funzionalizzare con *l'array* di biomolecole esca. A questo scopo, ci siamo focalizzati sui perfluoropolieteri (PFPE) fotoreticolabili, una classe di fluoropolimeri caratterizzati da ottime proprietà *antifouling* e di *fouling-release*. Anche le tecnologie e la strategia di *grafting* svolgono un ruolo chiave nel processo di realizzazione dell'*array*. Due diverse tecniche di *patterning* sono state studiate e ottimizzate: la fotolitografia e il *micro-contact printing*. Inoltre sono state analizzate diverse strategie per legare covalentemente l'eparina al substrato di PFPE, sfruttando l'affinità altamente specifica di biotina e avidina e la reazione fra gruppi fotoreattivi presenti sulla superficie dei substrati fotoreticolabili e coniugati alla molecola esca.

Altro obiettivo perseguito è la realizzazione di microcanali al fine di realizzare un dispositivo microfluidico che integri le superfici funzionalizzate con il *pattern*. Tali dispositivi permettono di aumentare la selettività dell'*array* di eparina nel *sorting* di cellule infette e di evitare l'adesione aspecifica di proteine e cellule. Il *pattern* da integrare nel

dispositivo microfluidico può essere realizzato oltre che su una superficie piana anche su una superficie microstrutturata. Sarà quindi possibile studiare in futuro come varia l'adesione cellulare al variare della morfologia del substrato funzionalizzato.

La combinazione di microfluidica e delle proprietà dei perfluoropolieteri risultano comunque promettenti per il successo di dispositivi funzionalizzati con *patterns* per l'immobilizzazione di cellule rare.

L'immobilizzazione degli eritrociti infetti su *arrays* di eparina permette lo studio selettivo del processo di interazione fra la cellula e la molecola esca, interazione selettiva che può essere sfruttata nello sviluppo di terapie antimalariche efficaci e selettive.

Capitolo 1: Introduzione

Il primo capitolo si propone di illustrare lo stato dell'arte attuale sulle tecnologie e sui materiali oggetto di interesse in questo lavoro di tesi. Nel paragrafo §1.1 viene introdotta la tecnologia dei *microarrays* per il *sorting* cellulare; ne vengono presentate le applicazioni, i vantaggi e i possibili meccanismi e biomolecole che possono essere sfruttati per la loro realizzazione. Il paragrafo §1.2 illustra le tecnologie utilizzate in questo lavoro di tesi, la fotolitografia e la *soft*-litografia, e presenta struttura e proprietà delle biomolecole, sfruttate per la funzionalizzazione di superfici polimeriche con un *pattern*. Tra queste ci siamo soffermati maggiormente sulla fotobiotina, che interagisce direttamente con il substrato, e sul suo legame altamente specifico con l'avidina, mettendone in mostra l'elevata versatilità. L'eparina viene utilizzata come esca biomolecolare per la cattura di cellule rare, in particolare ne viene illustrato il ruolo svolto nell'interazione con globuli rossi infettati dal *Plasmodium* della malaria. In §1.3 vengono presentati i materiali *anti-fouling/fouling-release*, e quale sia la correlazione tra queste proprietà superficiali e le loro proprietà strutturali e meccaniche. In particolare in §1.3.1 vengono descritti i perfluoropolieteri come polimeri fotoreticolabili e vengono indicati come ottimi materiali con proprietà *anti-fouling* e *fouling-release.* Infine in §1.4, viene riportata una breve descrizione di materiali e tecnologie utilizzati nell'ambito della microfluidica, e come la combinazione di quest'ultima con il *patterning* biomolecolare permetta lo studio sulla cattura e il comportamento cellulare in condizioni dinamiche.

1.1 Introduzione generale

Negli ultimi anni la realizzazione di *pattern* di biomolecole su superfici di biomateriali ha ottenuto un crescente interesse nell'ambito di numerose applicazioni biomedicali quali i biosensori, l'ingegneria dei tessuti, la biologia molecolare, *etc* [1-3]. In particolare è stata riconosciuta come una delle tecnologie chiave per l'isolamento (*sorting*) e la cattura di specifiche popolazioni cellulari rare e per l'analisi di processi cellulari a livello della singola cellula. Generalmente, le tradizionali colture cellulari *in vitro* studiano il comportamento medio di una popolazione eterogenea di cellule in risposta a stimoli esterni, ma il comportamento cellulare può essere estremamente differente da cellula a cellula. Controllando, invece, la localizzazione spaziale dei segnali biochimici che influenzano l'adesione cellulare, è possibile isolare fisicamente su una superficie una specifica popolazione cellulare o singole cellule. Se le biomolecole depositate presentano

delle proprietà che favoriscono l'adesione cellulare rispetto al substrato circostante, le cellule preferiranno localizzarsi sul *pattern* biomolecolare, in caso contrario, lo eviteranno. I *patterns* di biomolecole permettono quindi di realizzare in maniera indiretta *arrays* di cellule viventi, rappresentando una piattaforma sperimentale per il rilascio (*delivering*) di stimoli ambientali (fattori di crescita, matrice extracellulare, farmaci chimici, *etc*) e per la conseguente misura delle risposte generate da una singola cellula o da colonie di specifiche popolazioni cellulari (Fig.1.1.1) in sostituzione alla risposta media generata da una popolazione eterogenea [4]. Inoltre, la possibilità di localizzare singole cellule viventi, permette di studiare in maniera più approfondita specifici meccanismi molecolari, consentendo di individuare i determinanti genetici di alcune malattie [5], di scoprire i modulatori delle funzioni cellulari, e di studiare le complesse interazioni delle cellule con l'ambiente circostante [6].

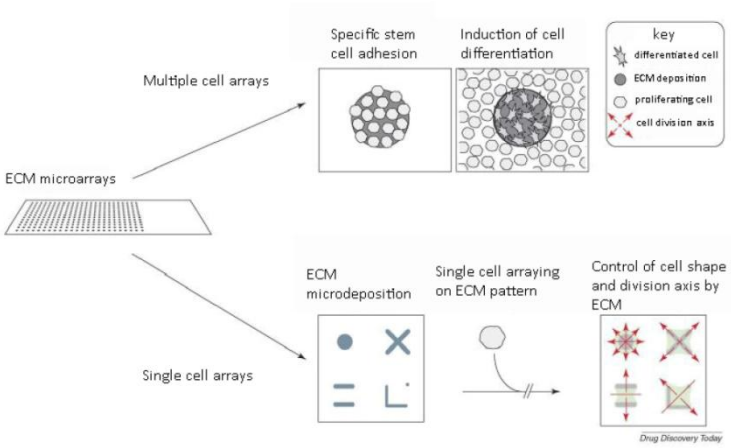


Figura 1.1.1: Esempio di applicazione di *microarrays* di cellule viventi. Componenti della matrice extracellulare (ECM) possono essere utilizzati come molecole esca e selettivamente immobilizzati sulla superficie di un biomateriale per differenti scopi: studiare il ruolo delle componenti ECM sull'adesione e nei meccanismi di differenziamento cellulare; isolare singole cellule per controllare la forma cellulare durante l'adesione e il conseguente orientamento lungo gli assi di divisione [5,7].

Attualmente, i *microarrays* cellulari possono essere creati non solo con la formazione di *arrays* di ligandi biologici, ai quali le cellule si attaccano in modo specifico, ma anche con lo stampo diretto di cellule su un substrato come per il caso delle stampanti *ink-jet* che sono state adattate per la stampa diretta di cellule [8]. Alcuni studi riportano inoltre la possibilità di sfruttare tecniche dielettroforetiche per separare cellule; in tal caso si sfrutta un *array* di elettrodi [9] e le proprietà dielettriche delle cellule che si differenziano a seconda della tipologia cellulare. Tuttavia queste tecniche presentano diversi svantaggi, tra

i quali gli effetti deleteri sulla fisiologia e la vitalità cellulare, dovuti alle condizioni dei processi.

Invece, il *printing* di biomolecole esca caratterizzate da elevata specificità per l'adesione cellulare sembra la tecnica più promettente. Tale tecnologia si basa sull'affinità tra l'esca legata alla superficie e la sua cellula bersaglio per catturare selettivamente le cellule stesse [10]. Gli *arrays* di cellule così ottenuti permettono lo studio a livello molecolare di interazioni specifiche e, dunque, di capire più approfonditamente le interazione cellulari. A seconda della cellula che si intende immobilizzare o dell'interazione o meccanismo cellulare che si intende replicare e studiare in vitro, diversi tipi di biomolecole possono essere sfruttati come esche compresi peptidi [11], anticorpi [12], e componenti dell'ECM, come proteine e proteoglicani [13].

Conseguentemente, il metodo con cui le esche vengono immobilizzate sulla superficie dipende dalle proprietà fisico-chimiche e chimiche sia della superficie che delle esche stesse, proprietà che influenzano profondamente l'efficienza della cattura cellulare sul *microarrays*. Ad esempio quando peptidi o proteine vengono utilizzati come esche, se durante il processo di immobilizzazione vengono deformate strutturalmente, possono perdere parzialmente o completamente la loro funzionalità e dunque la loro capacità di interagire preferenzialmente con le cellule *target* e catturarle. Differenti sono le tipologie di interazione tra molecole e substrato che possono essere sfruttate per sviluppare strategie per l'immobilizzazione. Il fisisorbimento (adsorbimento fisico), il chemisorbimento (legame chimico della superficie) e l'immobilizzazione per affinità tra specifiche coppie di ligandi sono i tre principali meccanismi che sono stati esplorati negli ultimi anni [14-16].

L'adsorbimento fisico di biomolecole è dovuto a forze mutuo-attrattive, incluse le forze elettrostatiche, ioniche, idrofobiche o idrofiliche. A causa del fatto che questo fenomeno è guidato dall'entropia, ogni molecola forma dei contatti con diversi orientamenti, fino a minimizzare le interazioni repulsive con il substrato. Il *layer* di esche che si ottiene sfruttando questo processo risulta eterogeneo e con orientamento random [17]. Inoltre data la debole energia di legame delle esche con il substrato è possibile che le esche stesse possano essere rimosse in fasi di risciacquo con l'uso di *buffers* o detergenti. Le problematiche legate al fisisorbimento possono essere superate con la formazione di legami di tipo chimico tra le esche e il substrato. Le biomolecole usate come esche sono spesso legate chimicamente alla superficie in modo irreversibile, con legami covalenti tra

le catene laterali dei gruppi funzionali delle esche e le superfici opportunamente modificate.

Acidi carbossilici, aldeidi, resine epossidiche e maleimmidi sono tra i più comuni gruppi funzionali reattivi utilizzati. L'immobilizzazione tramite bioaffinità sfrutta, appunto, l'alta affinità di coppie di ligandi per immobilizzare biomolecole in modo controllato, fornendo un'immobilizzazione stabile simile al legame covalente [14,18]. Uno di quelli maggiormente usati è il complesso biotina-avidina [19], nel quale l'interazione è altamente specifica e l'affinità è molto elevata e genera dei legami, non covalenti, forti e stabili [20]. Queste interazioni verranno illustrate nei paragrafi successivi (§1.2.2).

In conclusione, la realizzazione di *patterns* di biomolecole esca caratterizzate da elevata specificità nei confronti di cellule *target* risulta essere una delle tecniche più promettenti, mentre la possibilità di riprodurre le tipiche interazioni cellulari spiega perchè gli *arrays* di cellule emergano sempre più come importanti strumenti per la scoperta di farmaci, in tossicologia, in genomica, e nell'investigazione del microambiente cellulare.

1.2 *Patterning*

Nell'ambito della moderna biologia molecolare, un'ampia area di ricerca si focalizza su *microarray* di DNA [21]. È possibile realizzare anche *microarrays* di cellule (*chip cell-based)*, dispositivi atti alla simulazione *in vitro* delle interazioni cellulari alla microscala, al fine di sostituire i classici metodi di coltura cellulare. I vantaggi sono molteplici:

- risparmiare tempo e risorse;
- ottenere una parallelizzazione delle colture cellulari;
- isolare singole cellule.

I *chips cell-based* sono oggetto di grande attenzione, come già precedentemente detto, in quanto permettono di identificare determinanti genetici delle malattie, di scoprire come agiscono i farmaci sulle singole cellule e inoltre crearne di nuovi e soprattutto di studiare l'interazione tra le cellule e l'ambiente circostante.

Le cellule degli organismi multicellulari sono sistemi complessi e dinamici, con la capacità di differenziare e di dare origine a varie tipologie di tessuti mantenendo il genoma costante. Tutti questi processi vengono guidati e determinati da molteplici interazioni con l'intero microambiente cellulare, fatto di altri tipi di cellule, della ECM e un numero cospicuo di segnali fisici e molecolari (ormoni, fattori di crescita, citochine e proteine

secrete da varie cellule e tessuti). La natura dinamica di questo sistema richiede tecnologie in grado di registrare i differenti stimoli in scale molto piccole, di ordini molto inferiori al millimetro e al secondo. Tutto questo ha portato a incrementare la ricerca sui *chips cell-based* [22].

Realizzare *patterns* micrometrici ha effetto sul comportamento cellulare: la proliferazione e la migrazione ne risultano influenzate [23, 24] e, variando la morfologia del substrato, è possibile influenzare la disposizione delle cellule, le quali possono essere allineate lungo un particolare asse [26].

1.2.1 Tecnologie di *Patterning*

1.2.1.1 Fotolitografia

Per molti settori tecnologici, dalla microelettronica ai *microarrays* di DNA, è fondamentale realizzare sul materiale un *pattern* geometrico. Tra le diverse tecnologie di *patterning* sviluppate recentemente per la produzione di micro e nanostrutture, la fotolitografia viene sfruttate per una grande varietà di applicazioni, incluso il *patterning* di cellule e proteine [26-28].

Il processo di fotolitografia include tipicamente i seguenti componenti: una lampada UV, una fotomaschera e un *photoresist*. Il processo fotolitografico convenzionale utilizza la luce ultravioletta che attraversa la fotomaschera sulla quale è replicato il *pattern* geometrico che si intende riprodurre, per irradiare in modo selettivo un *layer* di *resist* fotosensibile la cui solubilità viene alterata dall'irradiazione per renderlo solubile o insolubile in un particolare solvente (*resist* positivo e negativo rispettivamente). Nel caso di *resist* positivo, il materiale viene degradato durante l'esposizione, mentre nel secondo caso il polimero forma un *network* di legami molecolari tramite l'irradiazione con raggi UV. Tramite l'immersione in specifici solventi è possibile rimuovere selettivamente il *photoresist* per ottenere il *pattern* desiderato (fase di sviluppo) (Figura 1.2.1). Per i *resist* negativi le aree non esposte risultano solubili e vengono rimosse facilmente durante la fase di sviluppo. Un tipico *photoresist* negativo usato per produrre strutture è il SU-8, una resina epossidica caratterizzata da alta viscosità e massima assorbanza a 365 nm. Un tipico esempio di *photoresist* positivo, che risulta invece maggiormente solubile nelle aree esposte, è il polimetilmetacrilato (PMMA).

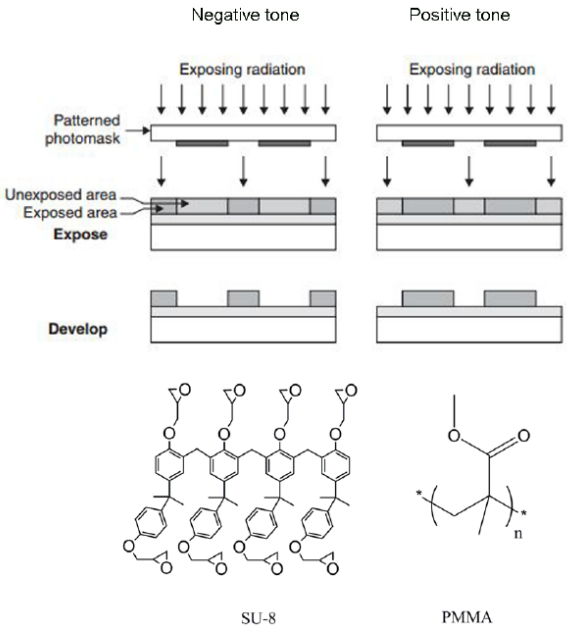


Figura 1.2.1: Schema del processo fotolitografico per i due tipi di *photoresist*. A sinistra, un *resist* negativo diventa meno solubile quando esposto a raggi UV (per esempio il SU-8); a destra, PMMA è un esempio di *resist* positivo, che diventa più solubile quando esposto alla radiazione UV [29].

La fotomaschera posta tra la sorgente del fascio luminoso e il *resist* contiene il *pattern*, o il negativo di esso, che si intende realizzare. Esistono due possibili alternative: fotomaschere in quarzo con un *layer* in cromo che assorbe la radiazione UV o maschere in poliestere. Utilizzando le fotomaschere in poliestere il costo dell'intero processo può essere ridotto, dato che il *pattern* viene disegnato tramite software *Computer-Aided* (AutoCAD) e successivamente stampato su pellicola con plotter professionali e di elevata risoluzione, più economico dell'intero processo fotolitografico necessario alla realizzazione della fotomaschera in quarzo.

Esistono differenti tipologie di litografia: a contatto, in prossimità e a proiezione. Nella litografia a contatto la maschera viene posta in stretto contatto con il *photoresist* e la minima dimensione caratteristica (MFS - *minimum feature size*) viene determinata dalla lunghezza d'onda λ e dallo spessore del *resist* d, come mostrato nell'equazione 1.2.1.1.

$$\text{MFS}= \sqrt{d \cdot \lambda} \qquad (1.2.1.1)$$

Nella litografia in prossimità, uno spazio g viene mantenuto tra il *photoresist* e la maschera per evitare il deterioramento di quest'ultima (equazione 1.2.1.2).

$$\text{MFS}= \sqrt{(d+g) \cdot \lambda} \qquad (1.2.1.2)$$

Infine, nella fotolitografia a proiezione, il *pattern* viene proiettato dalla maschera al campione. In questo caso la risoluzione viene fortemente limitata dalla diffrazione. MFS dipende quindi da tre fattori: una costante di tecnologia K_1, la lunghezza d'onda λ e dall'apertura numerica della lente NA, come mostrato nell'equazione 1.2.1.3.

$$\text{MFS}=\frac{\lambda}{NA}\cdot K_1 \qquad (1.2.1.3)$$

Molti processi basati sulla fotolitografia sono stati sviluppati per ottenere *pattern* biomolecolari.

1.2.1.2 *Micro-contact printing* e *soft*-litografia

Il *micro-contact printing* (μ-CP) rientra nell'ampio gruppo delle tecniche *soft*-litografiche. Esso consiste nel trasferimento di un inchiostro da uno stampo a un substrato. L'elemento chiave è uno stampo elastomerico fabbricato tramite replica di un *master* in silicio (Figura 1.2.2).

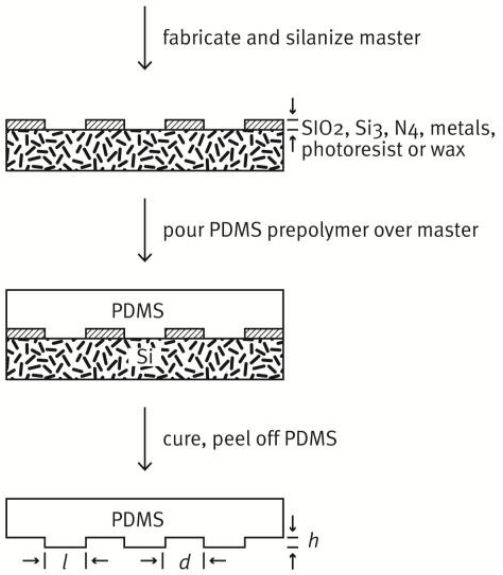


Figura 1.2.2: Stampo in PDMS realizzato come replica di un *master* in silicio.

Il primo materiale a essere utilizzato per la fabbricazione dello stampo è il Polidimetilsilossano o PDMS. Il PDMS è un polimero organico-siliconico costituito dall'alternanza di atomi di Si e O. La sua struttura è rappresentata in figura 1.2.3.

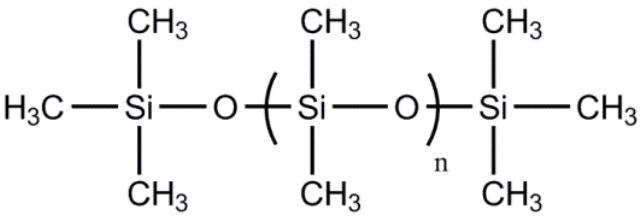


Figura 1.2.3: Struttura del PDMS.

L'ampio uso del PDMS è dovuto alle sue innumerevoli proprietà: *(i)* basso modulo di Young, che gli permette di conformarsi alle superfici con buone proprietà di *sealing* (*conformal contact*); *(ii)* bassa energia superficiale, approssimativamente 20 mJ/m², che facilita il rilascio dallo stampo; *(iii)* permeabilità ai gas, così che le bolle intrappolate siano in grado di permeare dalle pareti dei canali in applicazioni microfluidiche. Esso inoltre è inerte chimicamente e trasparente. Tuttavia, la sua natura elastomerica può dare origine ad alcuni problemi. In *patterns* submicrometrici potrebbero esserci problemi di *pairing*, *sagging* o *shrinking*, rappresentati in figura 1.2.4, per un rapporto troppo alto o troppo basso rispettivamente tra le dimensioni (*aspect ratio* l/h). Inoltre, si presenta un problema di *swelling* a contatto con molti solventi organici, cosa che limita fortemente le possibili applicazioni in microfluidica. Tra i vari solventi, l'esano, il toluene, il diclorometano, l'acetone e l'acetonitrile sono quelli che rigonfiano maggiormente il materiale [30-32].

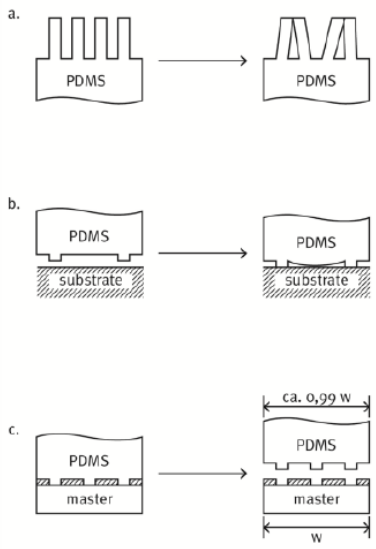


Figure 1.2.4: Possibili deformazioni subite dalla microstrutture sulla superficie a causa della natura elastomerica del PDMS: a) *Pairing*, b) *sagging*, c) *shrinking*.

Gli stampi di PDMS vengono preparati tramite colata (*casting)* della miscela tra il precursore elastomerico e l'agente reticolante su un *master* in silicio ottenuto con

fotolitografia. Dopo la reticolazione, la replica elastomerica viene separata dal *master*; essa contiene l'inverso della struttura presente sul *master* utilizzato come stampo. Dopo averlo rimosso dal *master*, sullo stampo di PDMS viene posta la soluzione di proteina che deve essere stampata, viene lasciata asciugare all'aria e infine posta in *conformal contact* con il substrato (figura 1.2.5).

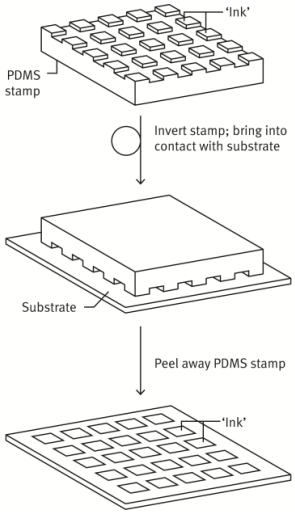


Figura 1.2.5: Stampo in PDMS usato per trasferire un inchiostro su un substrato.

Al fine di ottenere un efficiente trasferimento della molecola di interesse dalla replica al substrato sottostante, l'affinità dell'inchiostro con il substrato deve essere maggiore di quella con la replica in PDMS. L'idrofobicità del PDMS può limitare le applicazioni nella stampa di "inchiostri biologici", poichè molecole polari come proteine e DNA tendono a essere respinte dalla superficie idrofobica del PDMS, con la conseguenza di un trasferimento inefficiente. La natura idrofobica del PDMS può inoltre causare la denaturazione delle proteine. Tuttavia è possibile modificare chimicamente o fisicamente la superficie del PDMS per ottenere migliore proprietà di interfaccia per le interazioni molecolari [33]. Ad esempio un trattamento al plasma si rivela idoneo per migliorare l'idrofilicità della superficie [34], favorendo il trasferimento di alcuni tipi di biomolecole dallo stampo al substrato.

In letteratura viene indicato come standard lo stampo in PDMS, ma è possibile trovare alternative. Poli(etere-block-etere) così come il poli(stirene-block-stirene) possono essere usati con successo [30]. I principali vantaggi di questi materiali è un'elevata resistenza meccanica, che li rende adatti per il *printing* di *patterns* che richiedono *aspect ratio* non realizzabili con stampi in PDMS. Nel campo della biochimica, gli stampi in agarosio

stanno diventando sempre più popolari grazie all'alta affinità del gel con la proteina-inchiostro. Il primo uso di uno stampo di agarosio nel μCP è datato 2004 [35].
Polimeri sintetici, dendrimeri e biopolimeri, come proteina e DNA, possono essere usati come inchiostri. Il primo articolo riguardante il μCP di proteine risale al 1998 [36,37].
Molti articoli in letteratura confermano il *printing* di biotina sfruttando il legame specifico biotina-streptavidina (§1.2.2) [38].
Il μCP viene ampiamente usato in questo lavoro grazie ai numerosi vantaggi che presenta, anche in contrapposizione con la tecnica fotolitografica. I principali limiti della fotolitografia nell'ambito del *pattern* di biomolecole sono legati alle condizioni di processo, tra cui l'uso di solventi nella fase di sviluppo del *photoresist* o trattamenti termici, che possono causare la denaturazione delle biomolecole. Il processo di μ-CP risulta poco costoso, semplice e permette la creazione di *patterns* ad alta risoluzione su un'ampia varietà di substrati. Un importate vantaggio rispetto alla fotolitografia è la possibilità di creare *patterns* su substrati non planari [39]. Il gruppo di Whitesides nel 1993 è stato il primo a dimostrare in modo pratico l'utilità della tecnica del μ-CP realizzando *patterns* di *self-assembled monolayers* (SAMs) di alcanitiolati su superfici d'oro [40]. Tuttavia, il μ-CP non si limita alla stampa di tioli su oro. E' stato dimostrato che, sottoponendo substrati e stampo a idonee modifiche, anche silani, lipidi, proteine, DNA, nanoparticelle e nanofilms in metallo possono essere stampati tramite μ-CP [41, 42].
La fotolitografia inoltre può non essere compatibile con composti sensibili alla luce o *etchants*. Per questi motivi, insieme agli alti costi associati, lo sviluppo di tecniche non litografiche, come la *soft*-litografia, per la creazione di *patterns* su vari substrati risulta un'ottima alternativa [40, 43, 44].

1.2.2 Biomolecole per il *patterning*

L'attivazione di molecole tramite irraggiamento UV è un metodo versatile ampiamente utilizzato in biologia grazie all’esistenza di un elevato numero di diverse molecole fotosensibili.

1.2.2.1 Fotobiotina

In questo lavoro di tesi viene utilizzata la fotobiotina. Essa è un derivato della biotina (Figura 1.2.6), una vitamina che si trova naturalmente in tutte le cellule viventi. L’anello biciclico è coinvolto nell’interazione con l’avidina, mentre il gruppo carbossilico sul lato

opposto della catena può essere sfruttato per legare la biotina al substrato o con altre molecole.

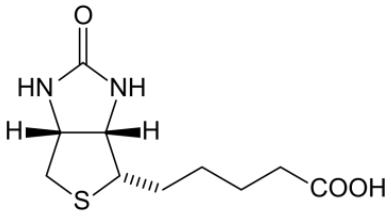


Figura 1.2.6: Struttura chimica della biotina.

La fotobiotina presenta le seguenti caratteristiche: (i) è fotoreattiva e idonea al *patterning* tramite fotolitografia; (ii) garantisce un efficiente riconoscimento molecolare con l'avidina; (iii) ogni molecola biotinilata può legarsi in modo specifico con uno dei quattro siti di legame dell'avidina. Le sue peculiarità sono dovute a tre parti principali che la costituiscono: (i) una testa di biotina, (ii) un braccio *linker*, e (iii) un gruppo aril-azide fotoattivabile (Figura 1.2.7). La sintesi di fotosonde con una testa di biotina e un gruppo fotoattivo viene riportata da Pandurangi *et al*.[45].

Il braccio *linker* è costituito da un polietilene glicole (PEG), idrofilico, non immunogenico, solubile in acqua e genera ingombro sterico tra la testa e il gruppo fotoattivo. Il PEG è riconosciuto come agente *antifouling* che può aiutare a evitare adsorbimento aspecifico delle proteine sul substrato.

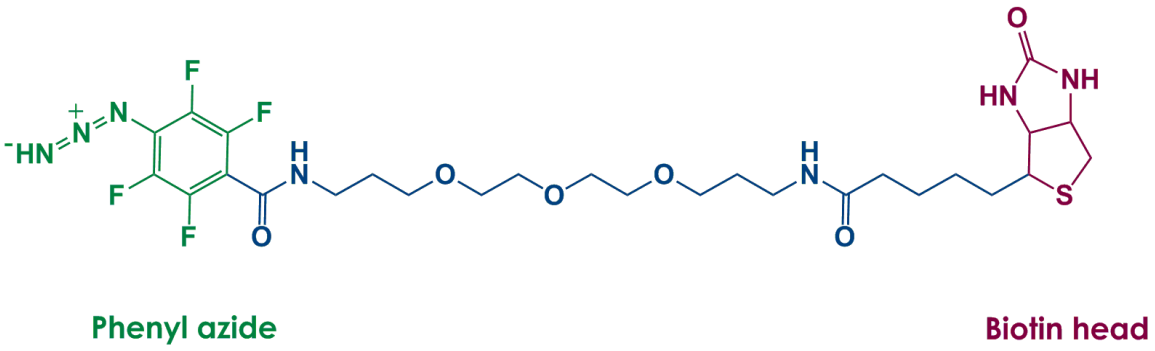


Figure 1.2.7: EZ-link TFPA PEG3-Biotin (Thermo-scientific) costituita da il gruppo aril azide fotoattivo e da una testa di biotina.

In seguito all'attivazione con luce UV il gruppo azide si converte in aril nitrene, il quale è in grado di legarsi in modo covalente con C-H, N-H e doppi legami C=C (Figura 1.2.8). La lunghezza d'onda ottimale per la fotoattivazione è di 320 nm.

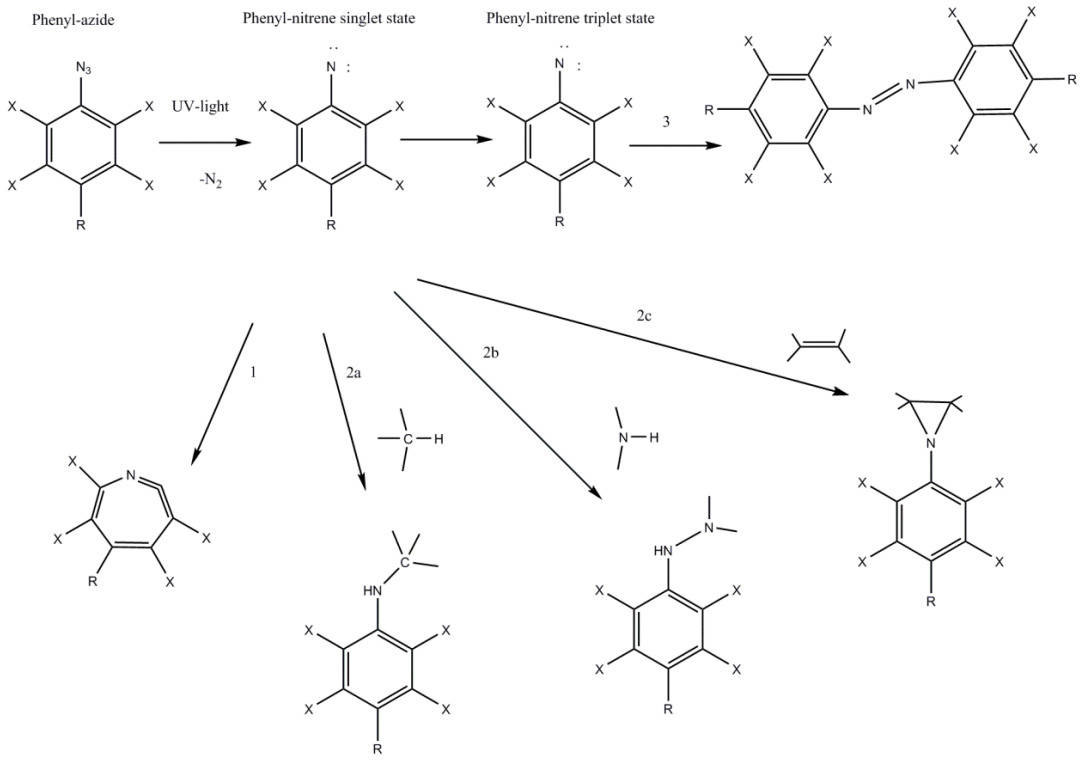


Figure 1.2.8: Descrizione semplificata della fotochimica del fenilazide: (1) espansione dell'anello; (2) reazione di addizione; (3) intersystem crossing. X è un simbolo generico che indica atomi di F o H.

Il fenilazide presenta le seguenti caratteristiche: alta efficienza di reazione, cinetica veloce, eccellente stabilità e facilità di preparazione.

La reazione di addizione mostrata in figura 1.2.8 può essere sfruttata per accoppiare perfluorofenilazidi (PFPAs) a materiali e substrati che possiedano gruppi CH, NH e legami doppi C=C. La fotobiotina è usata per creare *patterns* su superfici in carbonio [46] così come su superfici polimeriche come il polistirene [47] e i perfluoropolieteri-dimetilacrilati (PFPE-DMAs) come in questo lavoro di tesi.

1.2.2.2 Avidina

La biotina è in grado di interagire in modo specifico con l'avidina. Quest'ultima è una proteina glicosilata e carica positivamente presente nel bianco delle uova di uccelli, rettili e anfibi. È una proteina tetramerica molto stabile, composta da 4x128 resuidi amminoacidici di catena (figura 1.2.9).

Figura 1.2.9: Struttura tetramerica dell'avidina.

L'avidina è in grado di legarsi a quattro molecole di biotina. L'interazione tra le due molecole è ben conosciuta in biologia grazie alla grande affinità tra le molecole, di tre o sei ordini di grandezza maggiore di un tipico legame antigene-anticorpo. La costante della velocità di associazione è $7x10^7$ $M^{-1}s^{-1}$ a pH = 5 e T = 25°C, la costante di dissociazione è 10^{-15}M.

La streptavidina è molto simile all'avidina. Essa è costituita da quattro catene polimeriche ognuna contenente 159 amminoacidi. Anche la neutravidina è strettamente correlata alla proteina tetramerica, con affinità simili per la biotina, ma differiscono sotto altri aspetti, come il peso molecolare, la sequenza degli amminoacidi e il punto isoelettrico (Ip). Il tetramero funzionale dell'avidina consiste in 8 *β-barrel* ortogonali e antiparalleli con all'interno una cavità per la biotina. I siti di legame della biotina sono tasche profonde, con un *cluster* di donori/accettori di legami a idrogeno, che può legare con la testa polare della biotina.

Molti studi sfruttano la combinazione di biotina sensibile agli UV e la sua affinità con l'avidina per sviluppare *patterns* di enzimi biotina-coniugati [48,49]. L'approccio generalmente utilizzato per il legame tra le due biomolecole include l'immobilizzazione diretta della biotina via adsorbimento o legame covalente con la superficie. Seguendo questo approccio, un sottile film di fotobiotina viene posto sulla superficie e esposto alla luce attraverso una maschera, così da legare un *pattern* di fotobiotina al substrato. Il film sottile di biotina viene dunque usato per legare la streptavidina. Esso promuove una soprastruttura ordinata *(self-assembly)* di avidina con due siti di legame affacciati sul substrato e gli altri due verso l'esterno. Infine, dipendente dalla specifica interazione o dal meccanismo molecolare appena descritto, il *layer* di avidina costuisce una piattaforma versatile dove, a seconda della cellula *target* che si vuole immobilizzare o dello specifico processo cellulare che si vuole studiare, differenti esche biotinilate possono essere legate tramite *self-assembly*, come nel caso di questo lavoro di tesi, in cui l'eparina biotinilata è stata sfruttata come esca biotinilata.

1.2.2.3 Eparina

L'eparina è un glicosamminoglicano (GAG) utilizzato in ambito biomedico per le sue proprietà anticoagulanti, per aumentare quindi, l'emocompatibilità di materiali a contatto con il sangue. I GAGs sono lunghe catene di carboidrati, con unità ripetitiva disaccaridica acido uronico-(1-4)-d-glucosammina, con una variabile epimerizazzione e N- e O-solfatazione a differenti posizioni, con il risultato di un ampio numero di sequenze diverse [50]. L'eparina in particolare, è formata da polisaccaridi anionici lineari, con 2-O-sulfo-α-L-acido idurico, 2-deossi-2-sulfamino-6-O-sulfo-α-D-glucosio, α-D-acido glucoronico, 2-acetamido-2-deossi-α-D-glucosio e α-L-acido iduronico come unità maggiore (Figura 1.2.10). Queste sono unite da legami glicosidici 1-4. La presenza e la frequenza di queste unità saccaridiche varia in base alla tipologia del tessuto da cui viene estratta l'eparina.

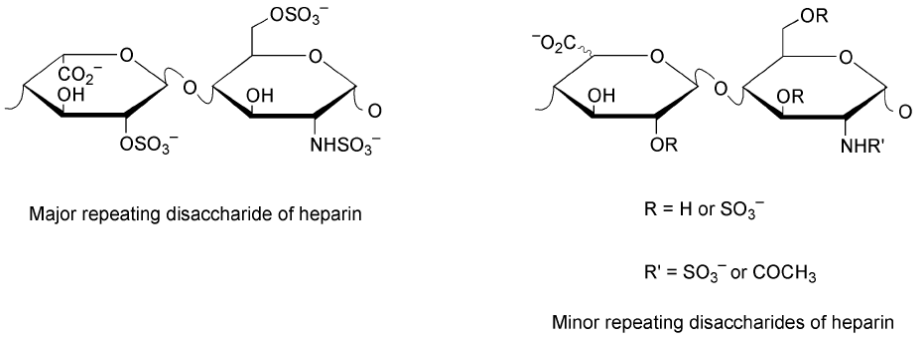


Figure 1.2.10: Strutture molecolari dell'unità ripetenti maggiore e minore dell'eparina.

Le macromolecole dell'eparina possono essere funzionalizzate con gruppi biotina (Figura 1.2.11) capaci di legarsi in modo specifico all'avidina e suoi derivati.

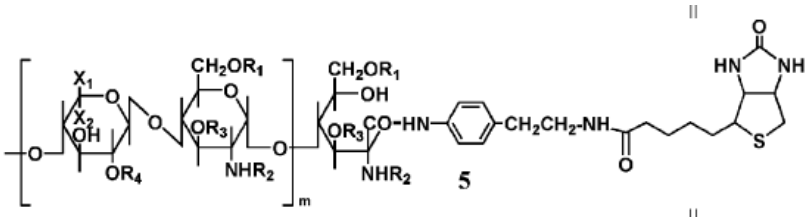


Figura 1.2.11: Struttura molecolare dell'eparina biotinilata.

I vari *step*s costituenti la strategia di *grafting* descritta sono riassunti nello schema in figura 1.2.12 .

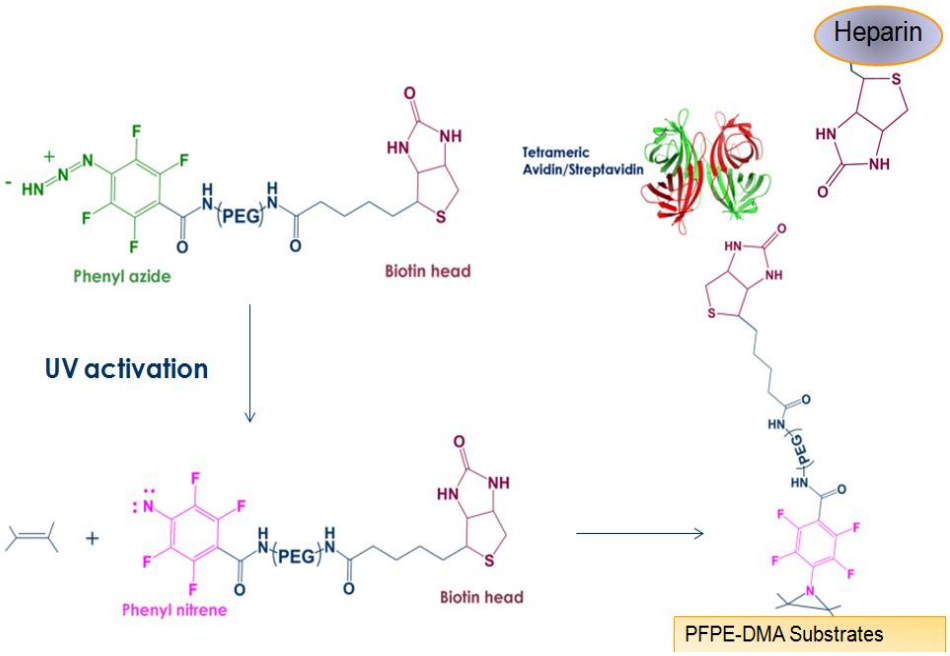


Figura 1.2.12: Con l'attivazione tramite irraggiamento UV, tramite il quale il gruppo fenilazide diventa fenilnitrene, è possibile far reagire la fotobiotina con un substrato in PFPE-DMA. In seguito in due *steps* successivi si effettua un'incubazione di avidina sul *pattern* di fotobiotina e una con eparina biotinilata, i legami con il la molecola sottostante avvengono per *self-assembly*.

L'eparina può essere funzionalizzata, inoltre, con gruppi metacrilici, (§1.2.13) [51], in modo che possa interagire direttamente con i gruppi metacrilici presenti su superfici di materiali fotoreticolabili sfruttando la tecnica della fotolitografia. Tale strategia di *grafting*, rispetto alla precedente, è rappresentata in figura 1.2.12 e risulta più semplice in quanto caratterizzata da un singolo *step*.

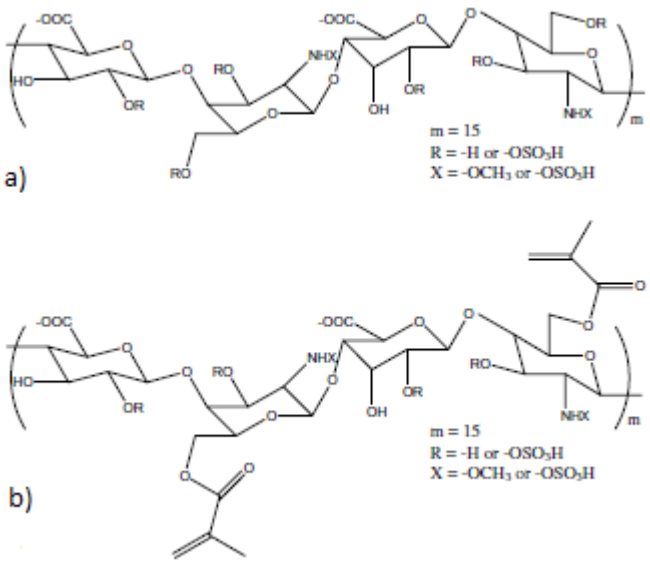


Figura 1.2.13: a) Struttura dell'eparina e b) dell'eparina metacrilata [51].

1.2.2.3.1 Attività anti-malarica dell'eparina

La malaria è una malattia infettiva acuta e/o cronica che rappresenta una delle maggiori cause di mortalità nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo [52-54]. Attraverso la puntura della zanzara femmina *Anopheles*, viene trasmesso il parassita del genere *Plasmodium*, responsabile della malattia, con inoculazione di sporozoiti. Quattro specie diverse del parassita possono infettare l'uomo, ma in particolare il *Plasmodium Falciparum (P. falciparum)* causa la maggior parte dei casi più gravi e mortali [53,54]. Una volta entrati nel circolo sanguigno dell'organismo ospite, gli sporozoiti del *P.falciparum* migrano nel fegato, dove infettano gli epatociti e proliferano in centinaia di merozoiti, organismi derivanti da riproduzione asessuata. A questo punto i merozoiti rompono l'epatocita ed entrano nella circolazione sanguigna, dove invadono i globuli rossi. All'interno degli eritrociti sono stati individuati due cicli di proliferazione distinti: alcuni parassiti differenziano nei diversi stadi sessuali, gametociti maschili o femminili che vengono ingeriti dalla zanzara e sono essenziali per la trasmissione dell'infezione a nuovi ospiti attraverso le zanzare femmina; la maggior parte dei parassiti inizia invece una divisione asessuata per produrre cellule figlie che si sviluppano dapprima in anelli poi in trofozoiti e schizonti. Questi ultimi, una volta maturi, contengono circa 20 merozoiti che vengono rilasciati dopo la rottura di globuli rossi infetti da *P. falciparum*, per essere reimmessi nel circolo sanguigno e invadere ulteriori eritrociti sani (figura 1.2.14).

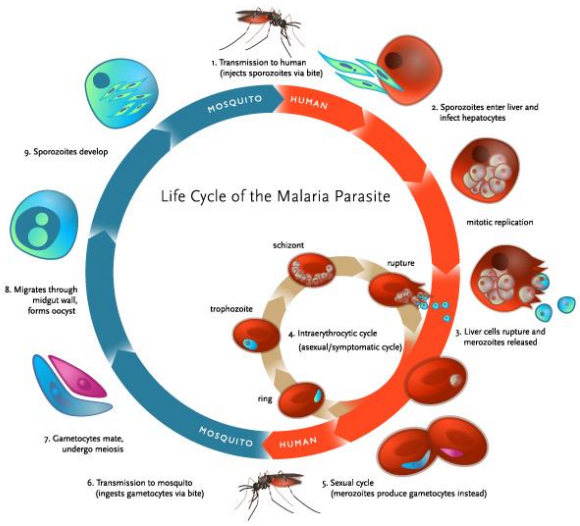


Figure 1.2.14: Ciclo vitale del parassita della malaria *P. falciparum*. La malaria è la più diffusa tra le parassitosi conosciute. La malattia si manifesta come risultato della stadio asessuato dopo che il parassita lascia il fegato e inizia a invadere gli eritrociti.

Lo stadio di infezione del sangue è quello che comporta l'acuirsi della malattia, in quanto si manifestano tutti i sintomi ed effetti patologici della malaria. In tale stadio la virulenza del parassita è associata a due fenomeni: la capacità del globulo rosso infetto di aderire alle cellule endoteliali (*sequestration*) e ad altri globuli rossi non infetti (*rosetting*) (figura 1.2.15) [54,55]. Questi eventi possono portare alla formazione di coaguli (rosette), con conseguente occlusione dei microvasi sanguigni, deossigenazione dei tessuti locali, fino alla morte dell'ospite umano [56]. Per questi motivi, i fenomeni di *sequestration* e *rosetting* sono considerati la causa principale della morte per malaria e conseguentemente i globuli rossi infettati dal *P. falciparum* possono essere considerati come il principale *target* per lo sviluppo di farmaci antimalarici [57]. Molti studi rivelano che la citoaderenza dei globuli rossi infetti sia mediata da una proteina derivante dal parassita, la *P. falciparum erythrocyte membrane protein* 1 (PfEMP1), espressa sulla superficie degli eritrociti infetti. PfEMP1 esprime siti di legame per i GAGs, legando principalmente, nel fenomeno del *rosetting*, l'eparan solfato (HS), l'eparina o altri glicani simili all'HS esposti su globuli rossi non infetti [58-60]. In particolare l'analisi tramite cristallografia a raggi X rivela che le regioni che legano i GAGs sono polipeptidi localizzati sul segmento N-terminale del PfEMP1, caratterizzato da residui di arginina e lisina, carichi positivamente, i quali interagiscono in modo elettrostatico con i gruppi acidi e carichi negativamente dei GAGs solfatati [61]. L'eparina è la forma maggiormente diversificata tra i GAGs, e risulta simile all'HS, ma con un numero maggiore di gruppi solfati. L'HS viene espresso e secreto da tutte le cellule dei mammiferi, mentre l'eparina viene sintetizzata solo dai mastociti del tessuto connettivo; entrambi intervengono in diverse funzioni biologiche, ma sono maggiormente conosciuti per le loro proprietà anticoagulanti [63]. Sono molto utilizzati, infatti, per lo sviluppo e la funzionalizzazione di biomateriali a contatto con il sangue, al fine di aumentare l'emocompatiblità superficiale [62-63]. Grazie alla presenza di un ampio numero di gruppi solfati, l'eparina ha attività antimalarica e una specifica affinità di legame con globuli rossi infetti rispetto a quelli non infetti [55, 58, 64]; essi sono stati dunque utilizzati per lo sviluppo di farmaci efficaci agenti su specifiche cellule *target* e al momento si cerca di sviluppare nuove strategie di *delivery* del farmaco. L'eparina e le molecole simili all'HS possono essere utilizzate come competitori contro il *sequestration* e il *rosetting* di globuli rossi infetti, ma possono anche essere utilizzati come *coating* di farmaci con attività antimalarica, verso eritrociti infetti [65,66].

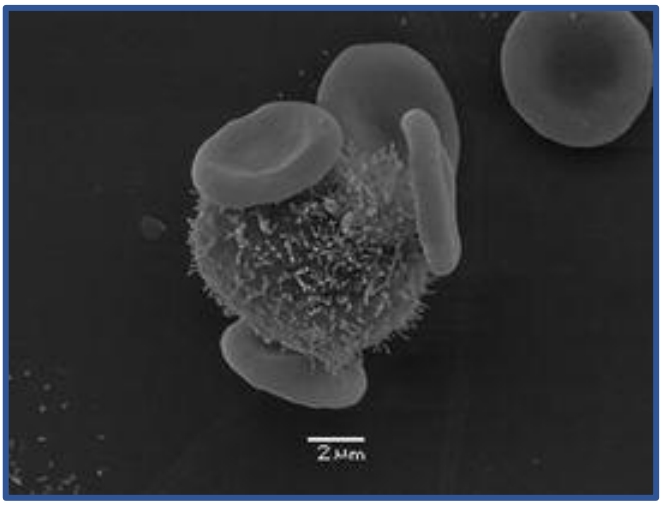


Figura 1.2.15: Immagine al SEM del fenomeno del *rosetting*, in cui vi è la formazione di un coagulo nel quale eritrociti sani si legano ad un globulo rosso infetto.

Questi sistemi di *delivery* possono sostituire i tradizionali metodi di somministrazione di cure antimalariche, i quali sono nocivi e presentano una bassa specificità del farmaco rispetto alle cellule *target* [67]. Proprio a causa di questa bassa specificità, molti farmaci richiedono dosi massicce per raggiungere l'efficacia terapeutica, ma allo stesso tempo la loro tossicità richiede ridotte concentrazioni, fattori che permettono lo sviluppo di ceppi di parassiti particolarmente resistenti [68]. Con lo scopo di minimizzare gli effetti collaterali delle terapie antimalariche, aumentando la biocompatibilità e la selettività del farmaco, i nanovettori sono particolarmente studiati. Nanovettori liposomali funzionalizzati con anticorpi sono stati sintetizzati per il trasporto di farmaci, ma sia l'alto costo della produzione di antibiotici sia la loro alta immunogenicità limita fortemente il loro uso come elementi di *targeting* [65]. Di conseguenza l'HS e i glicani simili all'HS, vengono considerati come alternativa agli anticorpi come *coating* di farmaci e le prime sperimentazioni *in vitro* hanno mostrato risultati promettenti. L'eparina lega selettivamente solo globuli rossi infetti con forze di legame dell'ordine dei pN, mostrando così sia una ruolo antimalarico che di *sorting* specifico delle cellule *target*, sfruttabile per il rilascio selettivo di farmaci [64, 66]. Nel presente lavoro di tesi l'eparina viene utilizzata per la realizzazione di *microarray* che permettono di ricreare in vitro l'interazione eritrocita infetto-eparina per poter studiare come aumentare l'affinità con i globuli rossi infetti per l'impiego di un farmaco ricoperto con eparina.

1.3 Superfici *antifouling/fouling-release*

Uno degli aspetti fondamentali nello sviluppo di substrati con *micropattern* di biomolecole esca per la cattura e l'isolamento di cellule rare è la scelta del materiale da funzionalizzare selettivamente. Questo perchè la *performance* dell'*array* finale è strettamente influenzata dalla scelta dei materiali usati per i substrati che dovrebbero soddisfare degli specifici requisiti: biocompatibilità, biostabilità e resistenza alla biodegradazione con prodotti di degradazione non citotossici. Anche le proprietà di superficie giocano un ruolo fondamentale in questa *performance* [10].

Le superfici funzionalizzate con *microarray* in fase di *testing* sono immerse in soluzioni biologiche acquose o medium di coltura per cellule, dunque non devono favorire la formazione di legami aspecifici con proteine o cellule *non-target*. A tal fine, i materiali che mostrano proprietà *antifouling* e *fouling-release* si prestano in maniera efficace ad essere usati anche come rivestimenti superficiali. Nello specifico con il termine *antifouling* si indicano le superfici che ostacolano l'adesione di organismi o proteine, mentre *fouling-release* implica materiali dove eventuali cellule o proteine adese aspecificatamente possono essere rimosse tramite forze idrodinamiche esercitate attraverso un flusso liquido. Le proprietà *antifouling* e di *fouling-release* dei materiali sono legate ad un ampio numero di parametri che contribuiscono a determinare queste caratteristiche di superficie. Un polimero *antifouling* noto e largamente utilizzato in ricerche biomediche e biologiche è il polietilenglicole (PEG) [70,71]. L'approccio generalmente adottato è quello di minimizzare i legami non specifici su una superficie depositando un sottile strato di PEG, tramite adsorbimento fisico [72] o immobilizzazione covalente di PEG [73,74]. L'efficacia del PEG come superficie biologicamente passivante è dovuta sia alla neutralità di carica che alla sua configurazione solvatata quando interagisce con l'acqua [75-77]. Recentemente, i perfluoropolieteri (PFPEs) sono emersi come promettenti materiali di rivestimento, tali da essere utilizzati come *anti-biofouling* [78]. Grazie alle loro proprietà *antifouling* e *fouling-release*, gli oligomeri funzionali del PFPE sono già largamente usati nel campo della marina per prevenire l'adesioni sugli scafi delle navi di macro e microrganismi marini, riducendo così la resistenza idrodinamica e i consumi [79,80]. Invece, nel campo biomedico, i PFPE-DMAs sono stati proposti come potenziali rivestimenti *fouling-release* per la microfabbricazione di dispositivi [81] e più recentemente di strutture anfifiliche [82]. Infine, altri lavori in letteratura hanno testato

l'efficacia dei PFPEs come substrati resistenti all'adesione di proteine [83]. I perfluoropolieteri (PFPEs) sono una classe di polimeri fluorinati con unità chimica ripetitiva del tipo –(CF_2CF_2O)m-(CF_2O)n-. La natura amorfa dei PFPEs può essere attribuita alla distribuzione random di unità CF_2O e CF_2CF_2O che impediscono la cristallizzazione del polimero. La combinazione dei gruppi C-O, C-C, C-F dona proprietà uniche a questa classe di materiali. La flessibilità della catena può essere attribuita alla bassa rotazione dei gruppi C-O che permette la libera rotazione solo a basse temperature. Dall'altra parte, i gruppi C-F garantiscono resistenza chimica e bassa energia superficiale tipica dei fluoropolimeri. La classe dei PFPEs risulta particolarmente interessante per molte applicazioni grazie a svariate proprietà: stabilità chimica e termica, buona resistenza, bassa energia superficiale, idrofobicità e oleofobicità.

Il macrodiolo del PFPE che termina con un gruppo idrossile, ottenuto a livello industriale dalla polimerizzazione fotochimica di una miscela di ossigeno e tetrafluoroetilene [84], è il punto di partenza per la produzione di molti derivati attraverso la chimica del legame uretano [85], estere [86] ed etere. La struttura chimica è $HOCH_2CF_2O(CF_2O)$n(CF_2CF_2O)mCF_2CH_2OH. Diverse reazioni di funzionalizzazione possono essere realizzate [87]. Differenti gruppi funzionali come il gruppo metacrilato e lo stirene possono essere utilizzati per modificare il macrodiolo di PFPE precursore per formare macromonomeri bifunzionali reticolanti [88].

Le proprietà di rilascio dei polimeri fluorinati, e dei materiali polimerici in generale, dipendono dalle loro proprietà fisico-chimiche; in particolare, la tensione superficiale e il modulo elastico sembrano giocare un ruolo importante. La relazione tra l'energia libera superficiale e la bioadesione è stata profondamente studiata in letteratura. Esperimenti preliminari, eseguiti studiando il ruolo della tensione superficiale sull'adesione delle proteine del sangue e delle piastrine [89], hanno rivelato che l'adesione di queste proteine diminuisce linearmente con la tensione superficiale maggiore di 25 mN/m, che è il valore del polidimetilsilossano (PDMS); un'ulteriore diminuzione della tensione superficiale non sarebbe vantaggiosa, e 20÷30 mJ/m^2 può essere considerato un *range* di valori ideali per prevenire la bioadesione [90]. Comunque, studi recenti hanno suggerito che la tensione superficiale deve essere considerata tenendo presente anche il modulo elastico del materiale. Anche lo spessore del rivestimento gioca un ruolo, poichè è necessaria meno forza per rimuovere uno strato da un *coating* spesso [91]. Per esempio, un approccio più

globale è quello di studiare l'adesione *fouling* rispetto a $(E\gamma)^{1/2}$ per studiare l'effetto sia della tensione superficiale (γ) che del modulo elastico (E). Il primo è cruciale per l'attacco iniziale delle proteine, mentre il secondo riguarda principalmente le proprietà di *fouling-release*, poichè induce il legame formato tra il substrato e la proteina a rompersi tramite *peel* piuttosto che tramite *shear*. La correlazione tra le performance di *fouling-release* e tra $(E\gamma)^{1/2}$ sono state dapprima ricavate studiando il legame tra le proteine e il substrato in termini di frattura meccanica. L'approccio deriva dalla teoria di Griffith, che mostra come la frattura dei solidi dipenda non solo dall'energia superficiale, ma anche dalla geometria e dalle proprietà elastiche del materiale. Considerando il caso di un sottile film di spessore 't' e modulo di Young 'E' posizionato tra un piano infinitamente rigido e un disco di diametro 2a, la forza di *peel* può essere espressa come segue in figura 1.3.1:

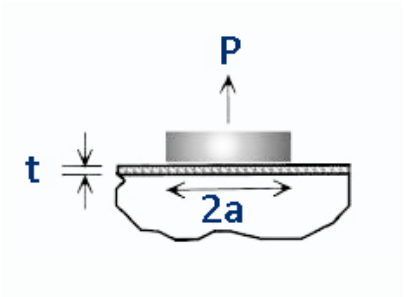


Figura 1.3.1: Schema di un film elastomerico tenuto tra un substrato rigido e un disco rigido. P = *peel force*; a= raggio di contatto; t = spessore del *coating*.

$$P^2 = \frac{2\pi^2 k a^4 \gamma}{t} \qquad (1.3.1)$$

dove P è la forza di *peel* necessaria per la rottura del legame, a è il raggio di contatto, t è lo spessore del *coating* e k è il modulo di *bulk*, che è correlato al modulo elastico attraverso il coefficiente di Poisson come mostra l'equazione che segue:

$$E = 3K(1 - 2\nu) \qquad (1.3.2)$$

combinando le due equazioni è evidente la connessione tra le proprietà di *fouling-release* e $(E\gamma)^{1/2}$. Così, i polimeri PFPE sono indubbiamente promettenti come materiali *fouling-release*, avendo sia un basso modulo elastico che una bassa tensione superficiale. Comunque, bisogna considerare che altri parametri come la ricostruzione superficiale [92], e la rugosità superficiale giocano un ruolo nella valutazione delle proprietà di *fouling-release*.

1.3.1 Proprietà *antifouling/fouling-release* dei PFPE-DMAs

Le prove per valutare le proprietà *antifouling/fouling release* dei PFPE-DMAs utilizzati in questo lavoro sono state svolte in un precedente lavoro [93], nel quale i substrati sono stati incubati con una soluzione di proteina marcata con fluoresceina e il segnale in fluoresceza del substrato è stato valutato come parametro indice dell'adesione aspecifica della proteina al substrato. In condizioni statiche, i PFPEs, presentano un comportamento *antifouling* del tutto comparabile con il polietilenglicole-metacrilato (PEG-MA), materiale noto per le sue proprietà *antifouling*. Nelle immagini seguenti in figura 1.3.2, i PFPE-DMA 2000 e 4000 sono messi a confronto con il PEG-MA e il polimetilmetacrilato (PMMA) in seguito a incubazione con albumina fluorescente.

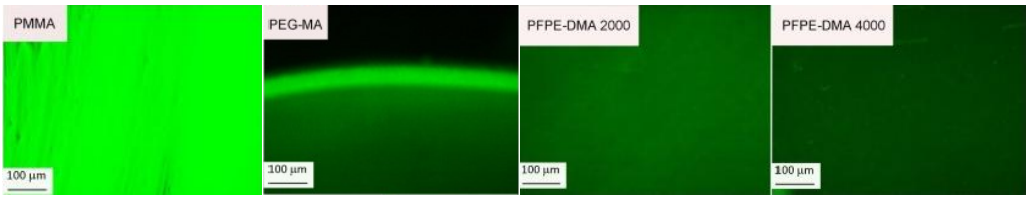


Figura 1.3.2: PMMA, PEG, PFPE-DMA 2000 e 4000 messi a confronto dopo tests statici con albumina fluorescente (ingrandimento 10x, tempo di esposizione 200ms, area presa in esame 650x500 µm2).

Sono state, altresì, valutate le proprietà *fouling-release* dei PFPEs con test dinamici in cui viene fatta flussare una soluzione contenente proteine fluorescenti (albumina) sulle superfici dei materiali presi in esame (Figura 1.3.3), meglio rappresentativi delle condizioni durante test cellulari in sistemi microfluidici.

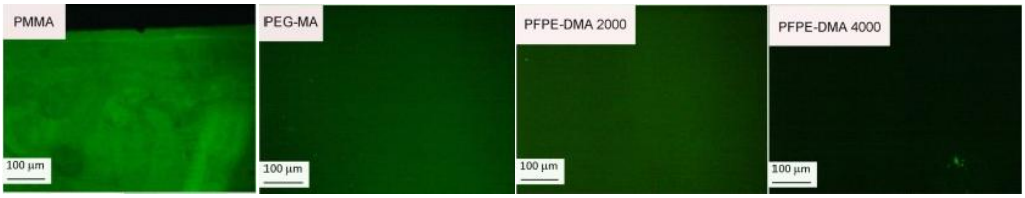


Figura 1.3.3: PMMA, PEG, PFPE-DMA 2000 e 4000 messi a confronto dopo tests dinamici (tempo di esposizione 200ms).

Come si può notare il PFPE-DMA 2000 mostra un'adesione molto simile al PEG-MA, mentre il PFPE 4000 mostra le migliori proprietà di *fouling-release* con il più basso segnale in fluorescenza tra i materiali messi a confronto. Ciò significa che l'albumina fluorescente, su questo substrato, viene facilmente rimossa dalle forze idrodinamiche sviluppate in condizioni dinamiche.

Valutato il comportamento *antifouling* nei confronti di proteine, sono stati effettuati dei tests per valutare l'adesione cellulare. Dopo due ore dalla semina non si è verificata alcuna adesione delle cellule (MG63), come visibile in figura 1.3.4.

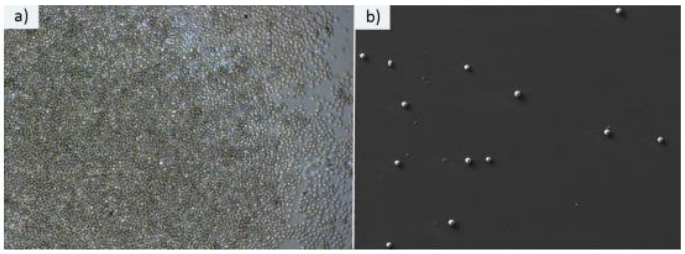


Figura 1.3.4: Cellule MG-63 su un campione di PFPE-DMA 4000. Le cellule mostrano una tipica morfologia sferica che evidenzia la non adesione al substrato: a) immagine al microscopio a contrasto di fase dopo 2 h dalla semina; b) immagine al SEM 2 giorni dopo la semina (ingrandimento 500x, 50 pA, 20 kV), il campione è stato fissato con glutaraldeide secondo il protocollo standard.

Come si può osservare la morfologia delle cellule è sferica, differente dalla morfologia a stella tipica delle cellule adese.

Le proprietà di *fouling-release* dei PFPE-DMAs sono già state studiate per le applicazioni in un contesto marino, questi studi ne hanno dimostrato l'applicabilità anche nel campo biomedico.

1.4 Microfluidica

La microfluidica è la scienza e la tecnologia dei sistemi che si occupa della manipolazione di fluidi all'interno di canali, aventi dimensioni micrometriche, realizzati in dispositivi miniaturizzati [94]. Tali dispositivi, chiamati *Lab-On-Chip* (LOCs), sono sistemi integrati nati con l'intento di ridurre i laboratori chimici e biologici ad un sistema su microscala dove i fluidi vengono trattati all'interno di microstrutture quali canali, *mixer*, *reservoir*, camere di diffusione, elettrodi integrati e pompe ottenuti con tecniche di micro/nanofabbricazione [95]. Obiettivo principale della tecnologia dei LoCs è proprio quello di ricreare un laboratorio medico o biologico in un format miniaturizzato e l'effettiva possibilità di effettuare reazioni ed analisi chimiche in scala microscopica comporta una serie di vantaggi se confrontati con i laboratori tradizionali [96, 97], come ad esempio l'abbattimento dei costi di fabbricazione, la riduzione dei tempi di analisi e la riduzione del volume dei reagenti utilizzati.

La miniaturizzazione e l'integrazione dei processi standard di laboratorio consente di lavorare con quantitativi di fluidi dell'ordine dei nano/picolitri, hanno gettato le basi del

grande sviluppo ed impatto che la microfluidica ha avuto negli ultimi anni. L'ambito delle sue applicazioni spazia infatti dalla genomica e proteomica, alla chimica e biochimica [98, 99] e, al di fuori del campo medico e biologico, all'optoelettronica, all'optoelettromeccanica e all'optofluidica [100, 101]. In particolare, la maggior parte della ricerca si concentra sulle applicazioni biomediche strettamente correlate con alcune procedure biologiche quali reazione a catena della polimerasi *(polymerase chain reaction*, PCR) per l'amplificazione degli acidi nucleici [102], conta cellulare (*cellular counting*) [103], pulizia del sangue (*blood cleansing*) [104], classificazione cellulare (*cells sorting*) [105], separazione del plasma umano (*human plasma separation*) [106] e saggi immunologici (*immunoassays*) [107].

Nonostante gli enormi sviluppi che negli ultimi anni hanno investito il campo della microfluidica, per arrivare alla completa affermazione e commercializzazione dei dispositivi, è necessario approfondire le ricerche intorno ad aspetti specifici quali lo sviluppo di materiali idonei alle varie applicazioni, la fabbricazione e l'assemblaggio dei dispositivi e la loro valutazione sperimentale.

I primi dispositivi sviluppati sono stati realizzati in vetro e silicio, in quanto già studiati per applicazioni di microelettronica, con tecniche standardizzate di litografia. Negli ultimi anni l'attenzione si è spostata verso i materiali polimerici caratterizzati da rapidità e bassi costi di ottenimento e lavorazione, biocompatibilità, buona resistenza termica e trasparenza [96]. L'avvento dei materiali polimerici ha inoltre permesso lo sviluppo di nuove tecniche fra le quali la fotopolimerizzazione in fase liquida, tecnologia di fabbricazione diretta di polimeri molto semplice e versatile.

Negli ultimi anni essi hanno assunto grande importanza nell'ambito della microfluidica e sono emersi come una valida alternativa ai materiali tradizionali per la fabbricazione di *Lab-on-Chips*, in quanto caratterizzati da rapidità e bassi costi di ottenimento e lavorazione, biocompatibilità, buona resistenza termica e trasparenza [108].

I materiali polimerici possono essere processati con svariati metodi e hanno consentito soprattutto lo sviluppo di nuove tecniche litografiche quali la *soft*-litografia e la litografia UV permettendo la produzione a bassi costi di grandi volumi di *microchips* monouso [109]. Ad oggi i polimeri più utilizzati in microfluidica sono polimetilmetacrilato (PMMA), polistirene (PS) e copolimeri di cicloolefina (COCs) tra i termoplastici, e polidimetilsilossano (PDMS) tra gli elastomeri [108].

Tra le varie di tecniche di lavorazione, la categoria della *soft*-litografia (§1.2.1.2) risulta essere molto vantaggiosa. Essa abbraccia tutte le tecniche di microfabbricazione che utilizzano uno stampo elastomerico (da qui il termine *soft*) per trasferire un *pattern* su un substrato. Tale tecnica fornisce alte risoluzioni e flessibilità nella scelta dei materiali. L'avvento dei materiali polimerici reattivi ha consentito lo sviluppo di nuove tecniche litografiche fra le quali la fotopolimerizzazione in fase liquida, tecnologia di fabbricazione molto semplice e versatile che permette l'ottenimento rapido di microstrutture 3D senza l'utilizzo di stampi [110].

Il processo per ottenere le microstrutture è simile a quello della fotolitografia: la miscela reattiva composta dal fotoiniziatore e dal prepolimero viene irradiata facendo passare la luce UV attraverso una fotomaschera con *pattern* messa a copertura della miscela liquida. Controllando parametri quali la concentrazione di fotoiniziatore, l'intensità della luce UV, lo spessore del film di miscela esposta e il tempo di esposizione, cambia il grado di reticolazione dei *layers* ottenuti e di conseguenza la loro reattività. Offre vantaggi ulteriori [111]:

- basso consumo energetico, in quanto la reazione avviene a temperatura ambiente ed è richiesta la sola energia necessaria per l'attivazione del fotoiniziatore;
- brevi tempi di polimerizzazione (da secondi a minuti) grazie all'elevata velocità di reazione;
- permette una progettazione rapida ed un veloce ottenimento di strutture tridimensionali senza l'ausilio di stampi ma semplicemente cambiando il *design* della fotomaschera;
- consente un'ampia diversificazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle formulazioni utilizzabili e quindi di ottenere materiali con le proprietà desiderate;
- ridotta quantità di composti organici volatili, poichè non sono richiesti solventi per modificare la viscosità della miscela;
- abbattimento generale dei costi (strumentazione poco costosa) e buona riproducibilità.

Uno degli svantaggi legati a tale tecnica è l'inibizione della polimerizzazione radicalica in presenza di ossigeno [112]. Avviene, infatti, che i radicali liberi formatisi per fotolisi dell'iniziatore, reagiscono velocemente con le molecole di ossigeno producendo delle

specie che non sono reattive nei confronti dei doppi legami e impedendo di raggiungere alti gradi di reticolazione della miscela polimerica. Per risolvere questo problema, si può lavorare in atmosfera inerte o altrimenti coprire la superficie della miscela con un film protettivo, trasparente agli UV che svolga un effetto barriera nei confronti dell'ossigeno. Altri svantaggi possono essere legati all'attenuazione della luce attraverso il film polimerico che causa una polimerizzazione disomogenea in quanto la superficie più vicina alla sorgente UV riceve più radiazioni rispetto alla parte sottostante, e alla scarsa capacità di penetrazione delle radiazioni che fanno della fotopolimerizzazione UV una tecnica non adatta per la produzione di elementi massivi.

Indipendentemente dalla tecnica che si adotta per fabbricare il *network* di microcanali è necessario che tali microstrutture siano chiuse ermeticamente per poter ottenere un dispositivo completo all'interno del quale manipolare i fluidi senza che si disperdano per il campione. I *microchips* sono, infatti, composti da una rete di microcanali e da uno strato di copertura (*cover*) legati insieme in maniera reversibile o irreversibile. La fase di chiusura dei microcanali (nota come *bonding* o *sealing*) rappresenta uno step critico nel processo di fabbricazione dei LOCs, in quanto i microcanali rischiano di essere occlusi e il peso della cover può causare il collasso delle pareti con conseguente modifica delle dimensioni della sezione di passaggio [112]. L'eventuale deformazione della geometria del canale comporterebbe innanzitutto l'alterazione del flusso al suo interno e l'impossibilità di utilizzare il *microchip* per quelle applicazioni dove sia necessaria precisione dimensionale. A seconda della futura applicazione del dispositivo microfluidico, devono essere fatte una serie di considerazioni per poter scegliere una tecnica di *bonding* appropriata [113]:

- la forza di legame (*bonding strength*). Per alcune applicazioni è necessaria l'unione irreversibile della *cover* con il *layer* microstrutturato per poter generare microcanali a tenuta stagna capaci di sopportare pressioni interne dell'ordine dei MPa. In altri casi invece è necessario che il *bonding* sia reversibile (ad esempio per riutilizzare dei sensori integrati);
- la tipologia di legame che si crea all'interfaccia tra i due *layers* deve avere caratteristiche chimiche tali per cui sia resistente ai solventi e ai reagenti trattati nei microcanali e non si degradi con l'utilizzo del dispositivo.
- la chiusura dei canali deve essere tale da permettere un accoppiamento adeguato del *chip* con l'ambiente esterno (ad esempio con micropompe a siringa o trasduttori di

pressione). Le tecniche di *bonding* possono essere classificate in dirette e indirette [114], che richiedono invece l'utilizzo di un *layer* adesivo.

All'interno di questo lavoro di tesi si è utilizzata una tecnica diretta per effettuare il *bonding*. Essa rientra nelle tecniche di modifiche di superficie.

Per aumentare l'energia di superficie dei materiali termoplastici, si può sfruttare l'esposizione alla luce UV. I materiali da noi utilizzati infatti, se esposti alle radiazioni UV, generano sulla superficie esposta dei gruppi reattivi in seguito alla rottura di catene polimeriche. Lo svantaggio principale di queste tecniche è che possono modificare le proprietà chimiche dei microcanali causando fenomeni elettrostatici indesiderati.

La microfluidica viene spesso utilizza in combinazione con le tecniche di *cell-sorting*, come nel caso di questo lavoro di tesi, al fine di valutare al meglio la funzionalità della superficie di *sorting* in condizioni maggiormente simili a quelle reali, evitando così l'attacco aspecifico di cellule, che si può avere in condizioni statiche.

All'interno dei canali è possibile modificare le proprietà superficiali con l'integrazione di un *pattern* molecolare, come descritto nel paragrafo §1.2.1, oppure realizzando substrati microstrutturati ottenuti per replica *molding* di *master* in silicio; funzionalizzando queste superfici è possibile immobilizzare in modo selettivo cellule specifiche e, nel caso della microstrutturazione, favorendo l'interazione cellulare con gli *spots* che risultano maggiormente esposti.

I canali di dimensioni micrometriche hanno ovviamente effetti sulle proprietà idrodinamiche del flusso di liquido. Una corretta ottimizzazione dei parametri e dei protocolli è dunque necessaria. Una stima del numero di Reynolds permette di identificare correttamente il tipico regime idrodinamico. Il numero di Reynolds, mostrato nell'equazione 1.4.1, è un parametro empirico adimensionale che permette la discriminazione tra flusso laminare e flusso turbolento. Esso è il rapporto tra le forze inerziali e le forze viscose agenti su un piccolo elemento del fluido.

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho u L}{\mu} \qquad (1.4.1)$$

Nell'equazione u è la velocità media del fluido, ρ la densità, μ la viscosità e L la dimensione caratteristica del sistema (il rapporto tra volume e superficie della parete di confine).

Considerando una tipica velocità del fluido nell'ordine dei cm/s e la profondità del canale di 10 μm, viene ottenuto un numero di Reynolds uguale a 0.1 per l'acqua. Flussi a bassi numero di Reynolds vengono indicati come flussi di Stokes, nei quali le forze viscose predominano rispetto a quelle inerziali. Per Re<2000, il regime idrodinamico è caratterizzato da un flusso che scorre parallelo alla superficie (flusso laminare) [7]. I vantaggi di una ridotta scala di dimensioni e basso numero di Reynolds, ad esempio la possibilità di controllare flussi laminari ben definiti, possono essere sfruttati per la fabbricazione di *chips cell-based* con l'integrazione di superfici funzionalizzate con *patterns*.

Capitolo 2: Attività sperimentale

Il secondo capitolo si propone di illustrare i materiali e i metodi utilizzati in questo lavoro di tesi. In particolare in §2.1 vengono elencate le caratteristiche dei perfluoropolieteri dimetacrilati (PFPE-DMAs) utilizzati per la realizzazione dei substrati. Vengono inoltre illustrati i metodi analitici per il monitoraggio della reazione di conversione del PFPE-DMA 4000, la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR) in §2.1.3.1 e i metodi per l'analisi della cinetica di reticolazione, quali la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e la fotocalorimetria (DSC-UV) in §2.1.3.2. L'analisi dinamico-meccanica, la DSC, e la misura dell'angolo di contatto e dell'energia superficiale vengono utilizzati per lo studio delle proprietà meccaniche e di superficie dei materiali; le descrizioni dei processi utilizzati sono riportate in §2.1.3.3. Nel paragrafo §2.2 vengono invece introdotte le due strategie di *patterning* che sono state sviluppate in parallelo per il *grafting* selettivo delle biomolecole esca, il *micro-contact printing* e la fotolitografia. Infine vengono descritti il microscopio a contrasto di fase, il microscopio a fluorescenza, il microscopio a forza atomica e il microscopio a scansione elettronica, utilizzati per la caratterizzazione degli *arrays* che si sono ottenuti. In §2.3 vengono illustrati i test cellulari effettuati sui *patterns* di eparina, per valutarne la capacità di immobilizzazione selettiva in condizioni statiche. In §2.4 vengono elencate le tecniche di fabbricazione e la caratterizzazione di microcanali realizzati in PFPE per la realizzazione futura di un dispositivo microfluidico atto alla validazione in condizioni dinamiche dei *patterns* ottenuti. Infine, in §2.4.3, vengono illustrati i metodi di realizzazione e di caratterizzazione di superfici 3D microstrutturate in PFPE, che rappresentano un possibile sviluppo futuro di questo lavoro di tesi.

2.1. Sintesi e caratterizzazione dei substrati

Differenti polimeri appartenenti alla classe dei perfluoropolieteri-dimetacrilati (PFPE-DMAs) UV-reticolabili vengono descritti e caratterizzati, al fine di ottimizzare i parametri di interesse per le applicazioni in questo lavoro di tesi.

2.1.1. Preparazione dei vetrini di supporto

I vetrini di supporto sui quali viene depositato il prepolimero di PFPE-DMAs vengono funzionalizzati con gruppi acrilici tramite un processo di silanizzazione, così da garantire una buona adesione tra il vetro e il polimero. La silanizzazione è una tecnica che permette

di modificare le caratteristiche superficiali del vetro attraverso la deposizione di *layers* di polisilossani.

I vetrini sono stati immersi 2h in soluzione piranha per rimuovere residui organici superficiali e promuovere la formazione di gruppi idrossilici superficiali. La soluzione piranha è stata preparata con acido solforico H_2SO_4 e acqua ossigenata H_2O_2 in rapporto 3:1. Dopo questo passaggio preliminare è possibile procedere con la silanizzazione.

Esistono due metodologie diverse di silanizzazione:

- in fase liquida. La soluzione di silano in cui vengono immersi i vetrini viene preparata nel modo seguente: in un *becker* vengono aggiunti circa 25 µl di acido acetico a 5 ml di acqua distillata in modo da abbassare il pH fino a un valore di 5. Ad essi vengono aggiunti 95 ml di etanolo. Infine viene aggiunto il 3-acrilossipropiltrimetossisilano, in quantità 2% in v/v rispetto all'etanolo. I vetrini vengono prelevati dalla soluzione piranha, immersi prima in acqua e poi in metanolo, infine nella soluzione silano, per 5 minuti. In seguito vengono nuovamente immersi in metanolo. Ogni passaggio d'immersione viene preceduto da una fase di asciugatura tramite flusso di azoto.
- In fase vapore. I vetrini, dopo essere stati immersi in piranha, vengono sottoposti a un trattamento al plasma (1179B Kenosistec, GGK-RF20 Gambetti) (Figura 2.1.1) a 150 W per 60 s, poi lasciati *overnight* su di una piastra a 30°C coperti da un cristallizzatore e in presenza di un *becker* con 250 µl di silano. Al termine si procede con l'immersione in metanolo e asciugatura tramite flusso di azoto.

Figura 2.1.1: Plasma (GGK-RF20) presente nel nostro laboratorio.

Lo schema di reazione della silanizzazione è illustrato nella figura 2.1.2.

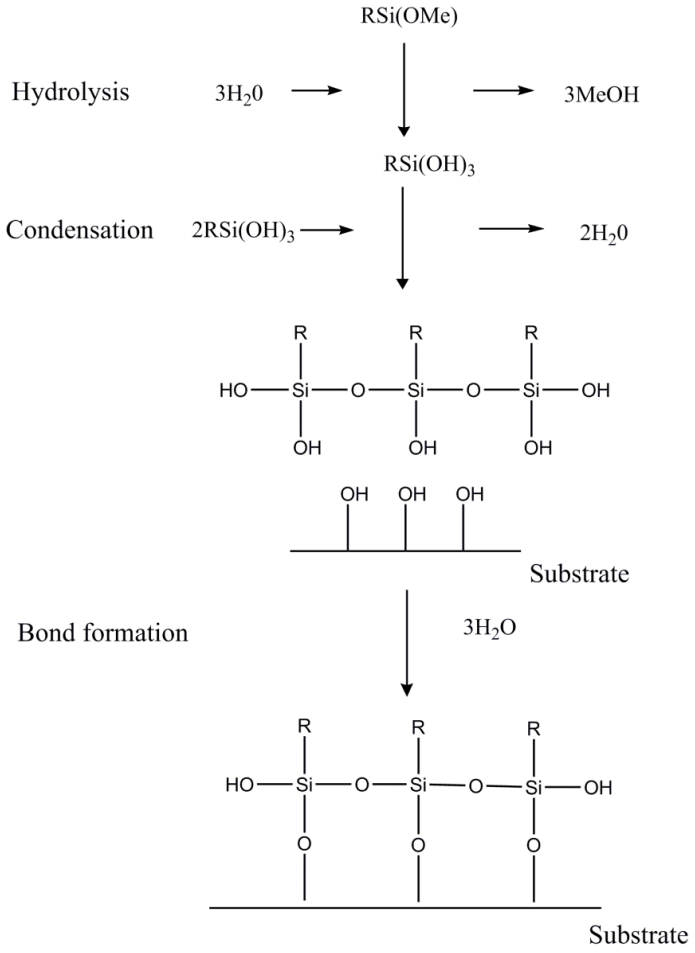


Figura 2.1.2: Schema di reazione di silanizzazione. Prima, i gruppi alcossilici del trialcossisilano vengono idrolizzati. Poi, si forma un oligomero da una reazione di condensazione. In seguito i gruppi idrossilici formano legami a idrogeno con i gruppi OH della superficie del substrato e infine, durante l'asciugatura o la reticolazione, si forma un legame covalente con condensazione. Dopo l'idrolisi, gli altri *steps* accadono in simultanea.

2.1.2 PFPE-DMAs

La struttura macromerica dei PFPE-DMAs è composta da cinque blocchi: G-Rh-Rf-Rh-G (Figura 2.1.3). Il blocco Rf, perfluorurato, costituito da copolimeri random di ossido di fluorometilene e ossido di fluoroetilene, è responsabile delle proprietà *antifouling/fouling-release* attribuite alla combinazione di bassa energia superficiale e al basso modulo elastico. Il blocco Rh, idrogenato, introduce gruppi polari che incrementano le proprietà meccaniche mantenendo bassa viscosità e basso indice di rifrazione. Infine i gruppi metacrilici sono molto reattivi e rendono il polimero reticolabile in presenza di luce UV.

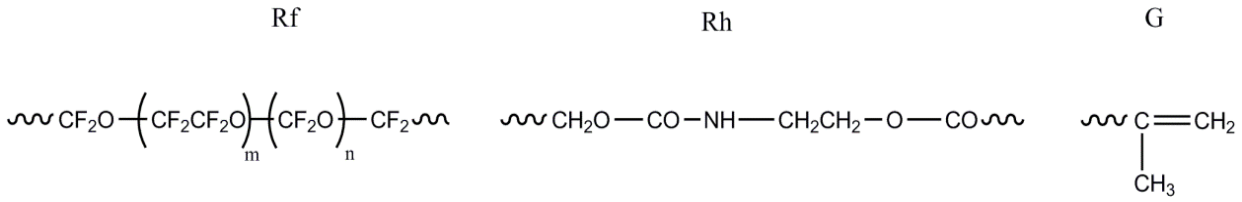


Figura 2.1.3: Struttura segmentata dei PFPE-DMAs. Rf è lo scheletro perfluorurato, Rh è il blocco idrogenato e G rappresenta il gruppo metacrilico che rende il polimero fotoreticolante.

Le formulazioni fotoreticolanti vengono preparate mescolando macromonomeri di PFPE-DMAs con un fotoiniziatore,. La reticolazione inizia dall'apertura dei gruppi metacrilici e dalla propagazione dei radicali liberi. Due diversi PFPE-DMAs con differenti pesi molecolari sono stati caratterizzati per meglio analizzare le relazioni tra struttura e proprietà. Per ogni PFPE-DMA viene ottenuta una curva di reticolazione che rappresenta il grado di reticolazione del polimero in funzione del suo tempo di esposizione alla luce UV. Inoltre viene studiato il comportamento intermedio di un blend, composto da PFPE-DMA 2000 e PFPE-DMA 4000 in rapporto 1:1.

2.1.2.1 PFPE-DMA 2000

Il PFPE-DMA a più basso peso molecolare (nome commerciale Fluorolink MD 700) è fornito dalla Solvay®. Il peso molecolare medio è di 1980 g/mol. La densità del polimero è di 1.66 g/ml. Un ulteriore parametro è il rapporto m/n, che rappresenta la percentuale dei gruppi CF_2CF_2O rispetto ai gruppi CF_2O. In questo caso il rapporto è uguale a 1.

Al macromonomero viene aggiunto il 4% w/w di 2-idrossi-2-metil-1-fenil-propano-1 (Darocur 1173, Ciba), come fotoiniziatore.

Per depositare un film uniforme e sottile di polimero sul vetrino silanizzato (§2.1.1) si utilizza uno *spin-coater*. Lo strumento presente nel nostro laboratorio è un WS-400-6NPP-Lite Spin Coater (Figura 2.1.4).

Figura 2.1.4: *Spin-coater* (WS-400-6NPP-Lite Spin Coater) presente nel nostro laboratorio.

Il processo di *spin-coating*, nel caso dei PFPEs usati, sul vetro silanizzato è generalmente suddiviso in alcune fasi principali:

- Deposizione della soluzione al centro del vetrino che viene ancorato al disco rotante dello *spin-coater*, tramite una pompa a vuoto.
- Il campione viene sottoposto a 1500 rpm per 30 s.

Dopo aver depositato il polimero sul vetrino, l'irraggiamento avviene utilizzando come sorgente UV un bromografo. Lo strumento utilizzato è un MF1030 (Figura 2.1.5.a), Nuova Delta Elettronica, costituito da quattro lampade UV di 15 W ciascuna e da un piatto in quarzo. Il massimo picco di emissione è a 365 nm, la densità di potenza emessa di 2,5 mW/cm^2. I campioni vengono esposti alla luce UV del bromografo all'interno di una cameretta ricoperta da un piatto in quarzo e reticolati in atmosfera inerte con azoto (Figura 2.1.5.b).

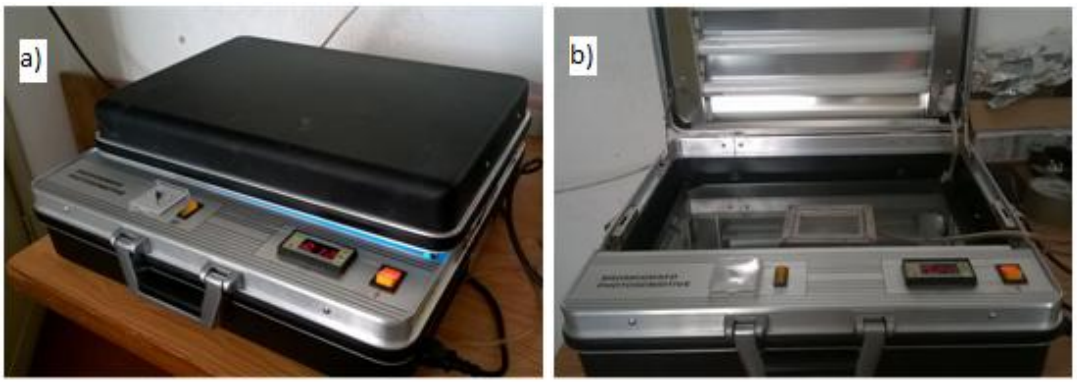


Figure 2.1.5: a) Bromografo MF1030 presente nel nostro laboratorio; b) alloggiamento della cameretta all'interno del bromografo utilizzata per inserire il campione in modo che si potesse ottenere un'atmosfera controllata grazie all'uso di un tubicino che mette in collegamento la bombola di azoto con l'alloggiamento.

2.1.2.2 PFPE-DMA 4000

Il PFPE-DMA a più alto peso molecolare è stato sintetizzato nel nostro laboratorio. La sintesi prevede la reazione del macrodiolo di PFPE (Fluorolink D4000) con isocianato etil metacrilato (IEM) (Sigma-Aldrich) per ottenere un polimero fotoreticolabile [115] caratterizzato da legami uretano e gruppi metacrilici terminali, (figura 2.1.6). Tale sintesi viene riportata per la prima volta nel 1997 da *Priola et al* [116].

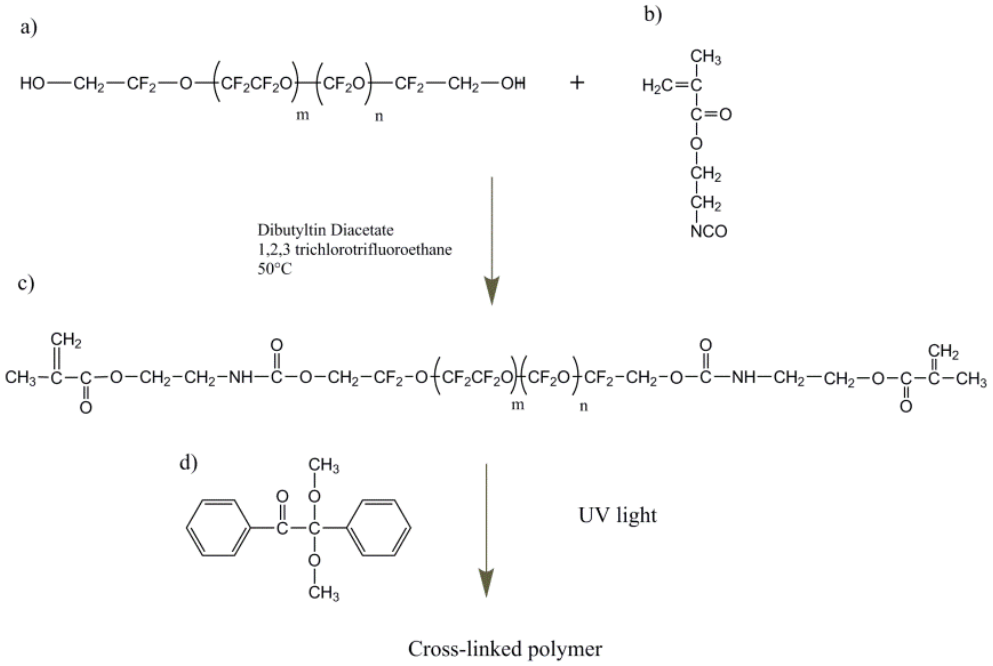


Figura 2.1.6: Sintesi e reticolazione di PFPE-DMAs fotoreticolabili. Il macrodiolo PFPE a) reagisce con IEM b) per dare il macromonomero PFPE-DMA c), il quale viene fotoreticolato aggiungendo un fotoiniziatore d) ed esponendo alla luce UV.

La reazione che coinvolge la funzionalizzazione metacrilica del diolo di PFPE, con peso molecolare di 3885 g/mol avviene come spiegato. In una *flask*, vengono pesati circa 65 g di macrodiolo di PFPE e collegati, in agitazione, a una pompa a vuoto per eliminare le bolle d'aria (Figura 2.1.7.b). Il macrodiolo viene poi spostato in un pallone a due colli in vetro dotato di un *inlet* per l'azoto, di un'ancoretta magnetica per l'agitazione, di uno sgocciolatore e di una colonna refrigerante (Figura 2.1.7.a). Una quantità di 57 g del macrodiolo viene posta nel pallone in vetro e tenuta come valore di riferimento per i calcoli successivi. Il rapporto molare tra i due componenti, PFPE macrodiolo: IEM è di 1:2, così che ogni molecola di macrodiolo porti due gruppi -OH. Tuttavia si lavora con un piccolo eccesso di macrodiolo al fine di evitare gruppi NCO al termine della reazione. La tabella 2.1.1 riporta i dati impiegati per calcolare le quantità finali utilizzate per la reazione mostrate in tabella 2.1.2.

Tabella 2.1.1: Peso molecolare (MW) [g/mol] del macrodiolo di PFPE, dell'IEM; densità (ρ) [g/ml] dell'IEM; rapporto tra IEM/Freon [v/v].

MW macrodiolo di PFPE [g/mol]	MW IEM [g/mol]	IEM ρ [g/ml]	IEM/Freon [v/v]
3885	155,15	1,10	0,21

Tabella 2.1.2: Peso del macrodiolo di PFPE utilizzato nella sintesi di PFPE 4000.

PFPE macrodiolo [g]	IEM [ml]	DABCO [g]	Freon [ml]
59	3,92	2,96	18,72

La reazione avviene a 40°C, in un bagno d'olio.

Il macrodiolo di PFPE viene gocciolato all'interno del pallone contenente a 4,31 g di IEM e 2,96 g di 1,4-Diazabicyclo[2.2.2] ottane come catalizzatore (DABCO) (Sigma-Aldrich), sciolto in 1,1,2-trichlorotrifluoroetano (Freon 113) (Sigma-Aldrich), in rapporto 1:10, secondo i valori ottenuti dalla tabella. Il Freon viene usato come solvente preventivamente deidratato. I setacci utilizzati per deidratare il Freon vengono mantenuti per circa 7 ore a 300°C (Figura 2.1.7.c). La percentuale di IEM rispetto al solvente è di 21% v/v.

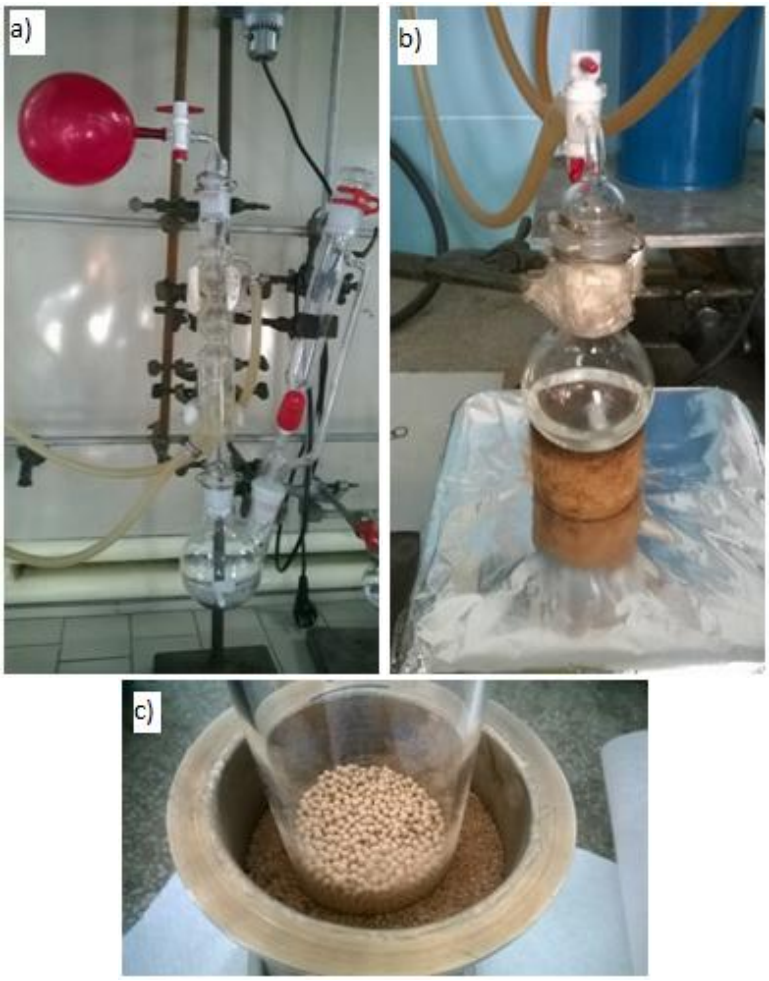


Figura 2.1.7: a) Componenti per la preparazione di PFPE 4000 assemblati. Apparato di reazione: il *vessel* di vetro con colonna refrigerante, sgocciolatore e *inlet* per azoto. L'intero sistema viene immerso in un bagno d'olio a 45° C; b) macrodiolo di PFPE durante l'eliminazione delle bolle d'aria; c) setacci posti a 300°C per evitare l'umidità.

L'intero apparato viene coperto con foglio di alluminio per evitare l'accidentale attivazione di gruppi metacrilici tramite luce solare. La reazione prosegue *overnight* e viene monitorata per 7 ore a intervalli regolari tramite analisi *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* **(**FTIR), che verrà illustrata nel paragrafo §2.1.3.1.

Il peso molecolare (MW) del prodotto finale può essere calcolato a partire dal peso molecolare del macrodiolo di PFPE aggiungendo il peso molecolare dei due gruppi funzionali metacrilici: MW PFPE-DMA 4000=3885 g/mol+2*155 g/mol=4127 g/mol. Inoltre in questo caso il numero m di –(CF_2CF_2O)- è uguale al numero n di unità ripetitive di –(CF_2O)-, quindi il rapporto m/n è uguale a 1.

Per la fotoreticolazione Darocur 1173 viene aggiunto in concentrazione 1% w/w al macromonomero di PFPE-DMA 4000, così da permettere la reticolazione tramite esposizione a luce UV in atmosfera controllata (N_2).

2.1.2.3 Blend PFPE-DMA 4000:PFPE-DMA 2000=1:1

Una miscela composta da PFPE-DMA 4000 e PFPE-DMA 2000, che da qui in avanti indicheremo blend per brevità, è stata preparata mescolando i due componenti in rapporto 1:1. Alla miscela dei due PFPE viene aggiunto il fotoiniziatore Darocur 1173 all'1% w/w per permettere la fotoreticolazione del materiale.

2.1.3 Metodi Analitici

2.1.3.1 Reazione di conversione-*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* (FTIR)

La FTIR è una spettroscopia di assorbimento legata ai movimenti vibrazionali di stiramento delle molecole, che modificano la lunghezza dei legami, e di deformazione, che mutano gli angoli di legame. Com'è noto, infatti, vale la seguente relazione:

$$E = h * \nu \qquad (2.1.1)$$

E = energia associata alla radiazione [J];

h = costante di Planck (6,626·10-34 J·s);

ν = frequenza della radiazione [s-1].

Quindi, se la radiazione che colpisce la molecola ha frequenza tale che l'energia ad essa associata sia uguale a quella richiesta per il moto vibrazionale di uno dei suoi legami, allora tale radiazione viene assorbita e si ha di conseguenza un aumento nell'ampiezza delle oscillazioni del sistema stesso. Dal momento che ogni legame assorbe radiazioni a frequenze caratteristiche, è possibile ricavare informazioni sulla presenza dei diversi gruppi funzionali in un composto e quindi sulla natura chimica di una sostanza.

L'analisi viene effettuata con uno spettrofotometro che invia sul campione in esame radiazioni infrarosse di frequenze variabili, di norma tra 4000 e 400 cm^{-1}. Per ridurre l'errore dovuto al rumore di fondo, si utilizza la strumentazione FTIR, ossia uno spettrofotometro che lavora in trasformata di Fourier.

Si riporta nella figura 2.1.8 uno schema dell'apparecchiatura utilizzata.

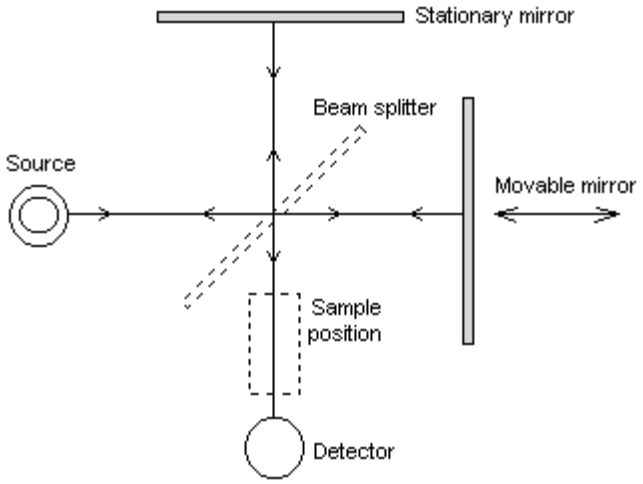


Figura 2.1.8: Interferogramma di Michelson usato nelle analisi FTIR.

Il raggio in uscita dalla sorgente IR è suddiviso in due parti per mezzo di uno specchio semitrasparente (*splitter*): i due raggi ottenuti vengono quindi sfasati tra loro, in quanto vanno a riflettersi uno su uno specchio fisso e l'altro su uno specchio mobile. I raggi provenienti dai due specchi vengono poi ricombinati tra loro e, attraversando il campione, generano l'interferogramma, che viene sottoposto all'anti-trasformata di Fourier, secondo un processo detto apodizzazione; si ottiene in questo modo lo spettro infrarosso del campione. Lo strumento presente nel nostro laboratorio è un FTIR-615 Jasco.

La FTIR ci ha permesso di monitorare la reazione per la sintesi del PFPE-DMA 4000. Il confronto tra gli spettri ottenuti a differenti intervalli di tempo permette di seguire l'andamento della reazione.

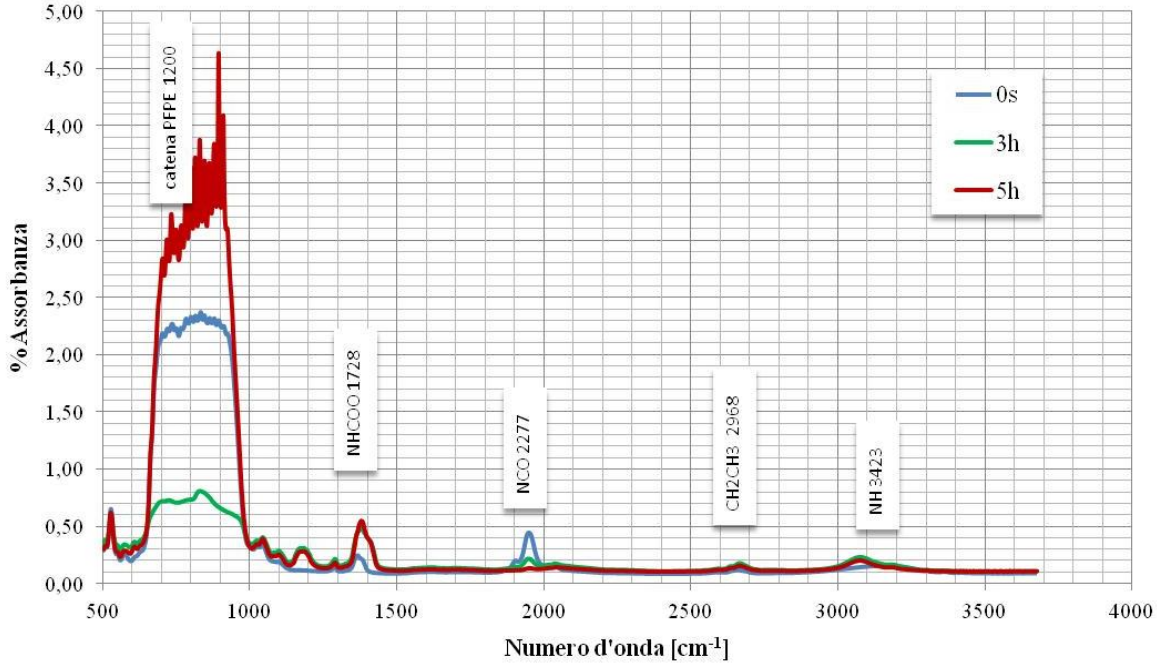


Grafico 2.1.1: Spettri IR acquisiti a differenti intervalli di tempo rispetto all'inizio della reazione. Il picco relativo al gruppo NCO (2277 cm^{-1}) scompare progressivamente con la simultanea comparsa del gruppo uretano (1728 cm^{-1}). La reazione termina dopo 5 ore.

Nel grafico 2.1.1 vengono rappresentati gli spettri ottenuti all'inizio della reazione, dopo 3 h e dopo 5 h. Il picco localizzato a 2277 cm^{-1} rappresenta la presenza del gruppo isocianato (NCO). Dopo 3 h dall'inizio della reazione il picco si riduce in modo significativo, fino a scomparire dopo 5 h. Dopo 3 h inoltre, compare il gruppo uretano (NHCOO). Dopo 5h, con la scomparsa del picco a 2277 cm^{-1}, la reazione termina.

2.1.3.2 Cinetica di reticolazione

In questo lavoro, il grado di reticolazione del polimero viene valutato con la calorimetria differenziale a scansione (DSC) e la fotocalorimetria (DSC-UV). La caratterizzazione della cinetica di reticolazione è necessaria per una poter controllare la conversione del substrato in funzione del tempo di esposizione ai raggi UV.

2.1.3.2.1 Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) è la principale tecnica di analisi termica utilizzata per caratterizzare molti tipi di materiali tra cui i polimeri. Il principio di base di questa tecnica consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata. In particolare la DSC si basa sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento, mentre i due

sono sottoposti a una temperatura variabile definita da un programma prestabilito. Lo strumento funziona in base alla relazione che lega il flusso di calore dQ alla variazione di temperatura dT secondo la legge termica equivalente a quella di Ohm:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dT}{R} \qquad (2.1.2)$$

dove R è la resistenza elettrica del disco termoelettrico.

All'interno della cella di misura (Figura 2.1.9) vengono poste due capsule portacampioni termicamente isolate tra loro e contenti una il materiale da caratterizzare e l'altra il riferimento (in genere una capsula vuota).

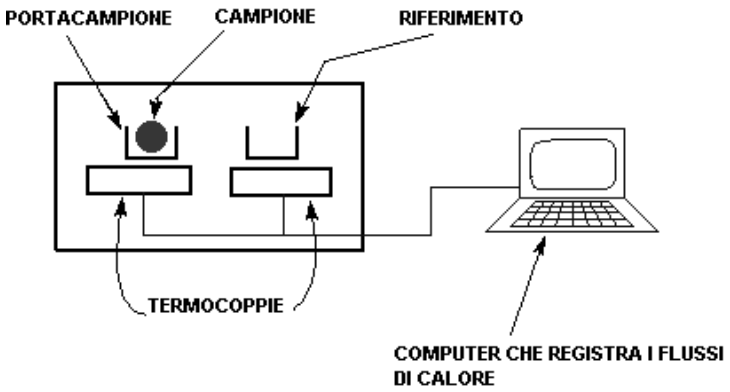


Figura 2.1.9: Schema riassuntivo dei componenti della DSC (Calorimetria Differenziale a Scansione).

Un computer regola i flussi di calore e fa sì che i due crogioli (su cui vengono posizionate le due capsule portacampioni) si scaldino allo stesso modo: quando, per effetto delle transizioni che avvengono nel materiale al variare della temperatura, il crogiuolo contenente il campione genera flussi di calore endotermici o esotermici, il computer registra queste variazioni di flusso e adegua il riscaldamento al fine di mantenerlo costante con il campione di riferimento.

Le prove vengono eseguite in atmosfera inerte (in flusso di azoto) al fine di evitare ogni possibilità di fenomeni ossidativi che potrebbero falsare la rivelazione dei fenomeni transitori; i campioni sono inseriti in capsule ermetiche in alluminio.

La misura differenziale del sistema è estremamente importante sia dal lato teorico che dal lato pratico, perché il segnale risultante può essere studiato indipendentemente da tutti quegli effetti termici esterni al sistema che si ripercuotono in modo uguale sui due

campioni, permettendo di ricevere in uscita il comportamento proprio del materiale, o della porzione di materiale, indipendentemente dalle condizioni di prova.

Il campione e il riferimento vengono messi in un disco in una fornace, e il calore passa dal disco ai campioni. Se avvengono transizioni di fase o altre reazioni chimiche viene registrata una differenza di temperatura, proporzionale alla differenza del flusso di calore tra il riferimento e il campione. Ciò che otteniamo alla fine è un grafico che rappresenta la velocità del flusso di calore in funzione della temperatura. Nel nostro caso quel che ci interessa valutare è una reazione di reticolazione, esotermica. La DSC viene utilizzata per valutare l'entalpia residua di polimerizzazione associata, in base a differenti tempi di esposizione ai raggi UV del campione.

Il primo *step* consiste nel preparare alcuni campioni di massa nota (15 mg), nei quali devono essere presenti sia un iniziatore termico sia un fotoiniziatore. I campioni vengono esposti per diversi intervalli di tempo ai raggi UV. Maggiore è il tempo di esposizione, maggiore è il grado di reticolazione. I campioni vengono sottoposti a un programma termico (solitamente una rampa lineare di temperatura). Il campione esposto 0 s mostrerà il picco esotermico più alto, poiché viene totalmente reticolato dall'iniziatore termico. Il campione da 10s invece mostrerà un picco esotermico minore, poiché solo una parte dei doppi legami verrà reticolata dall'iniziatore (la parte non reticolata dall'esposizione ai raggi UV).

Per ottenere il grado di conversione si utilizza la formula:

$$\% \text{ conversione} = \frac{\Delta H_{tot} - \Delta H_{res}}{\Delta H_{tot}} \qquad (2.1.3)$$

Il termine ΔH_{res} fa riferimento al picco esotermico al generico istante t di esposizione, mentre il termine ΔH_{tot} corrisponde al più alto picco esotermico relativo al campione esposto 0s ai raggi UV.

La procedura di preparazione dei campioni è la seguente: al prepolimero di PFPE viene aggiunto 1% di iniziatore termico perossido di dicumene (Sigma-Aldrich con temperatura di attivazione di 100°C); una piccola quantità di prepolimero (15 mg) viene pesata in un crogiuolo e quindi esposta ai raggi UV nel bromografo in atmosfera inerte con azoto per differenti tempi. Il crogiuolo viene poi immerso per qualche secondo in azoto liquido per arrestare la reticolazione.

Lo strumento utilizzato è un Mettler Toledo TA3000, con un programma di temperatura variabile tra i 20°C e i 250°C e una rampa di temperatura di 10°C al minuto. Tutti i campioni vengono testati alle stesse condizioni termiche e ne vengono confrontati i picchi esotermici.

2.1.3.2.2 Fotocalorimetria (DSC-UV)

Per l'analisi fotocalorimetrica (*Photo-Differential Scanning Calorimetry*-DSC-UV) viene utilizzato, in modo analogo alla DSC, il Mettler-Toledo TA3000. Lo strumento viene dotato di una lampada UV (Lightningcure 200, Hamamatsu) in xeno-mercurio con una potenza di 100W. I campioni vengono preparati con la stessa procedura della DSC, utilizzando una soluzione priva dell'iniziatore termico. I campioni reticolati a diverso grado di polimerizzazione vengono tenuti a 25°C per 10 minuti. Al fine di completare la conversione, i campioni durante questo intervallo di tempo vengono esposti alla luce UV per 5 minuti, con una densità di potenza al 2% rispetto a quella massima tale per cui vengono ricreate stesse condizioni di irraggiamento del bromografo. L'entalpia della reazione di polimerizzazione viene poi calcolata tramite integrazione del picco ottenuto con l'analisi, e l'equazione 2.1.3 viene utilizzata per determinare la percentuale di conversione.

2.1.3.3 Caratterizzazione delle proprietà dei PFPE-DMAs

2.1.3.3.1 Analisi Dinamico-Meccanica (DMA)

L'Analisi Dinamico-Meccanica (DMA) è una tecnica usata per lo studio dei parametri viscoelastici dei polimeri. Una sollecitazione sinusoidale viene applicata e viene misurata la deformazione del materiale per poter determinare il modulo complesso del polimero. La temperatura alla quale avviene il processo o la frequenza di sollecitazione vengono variate e viene registrata la variazione del modulo. Questo approccio permette la localizzazione della temperatura di transizione vetrosa tipica del materiale in esame, così come l'identificazione di altre transizioni.

Nel caso di un materiale perfettamente elastico, quando applico una sollecitazione sinusoidale, la deformazione misurata sarà perfettamente in fase. Per un fluido puramente viscoso, la deformazione risulterà sfasata di 90° rispetto alla sollecitazione. I polimeri viscoelastici mostrano invece un comportamento intermedio, mostrando dunque uno

sfasamento tra sollecitazione e deformazione compreso tra 0 e 90°. Questa differenza è rappresentata dal termine δ. Sollecitazione e deformazione possono essere scritte come:

$$\text{Sforzo: } \sigma = \sigma_0 sin(t\omega + \delta) \qquad (2.1.4)$$

$$\text{Deformazione: } \varepsilon = \varepsilon_0 sin(t\omega) \qquad (2.1.5)$$

in cui:

ω è la frequenza di oscillazione

t è il tempo

δ è la differenza di fase tra stress e deformazione.

Il modulo conservativo (E') misura l'energia immagazzinata, che rappresenta la componente elastica, mentre il modulo dissipativo (E") misura l'energia dissipata sottoforma di calore, essa rappresenta la componente viscosa. I termini vengono definiti come segue:

$$\text{Modulo conservativo: } E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} cos\delta \qquad (2.1.6)$$

$$\text{Modulo dissipativo: } E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} sin\delta \qquad (2.1.7)$$

$$\textit{Phase Angle}: \ \delta = \arctan \frac{E''}{E'} \qquad (2.1.8)$$

In modo simile possiamo definire *shear storage* e *loss moduli*, G' e G''. E' possibile utilizzare le variabili complesse per esprimere E^* e G^*:

$$E^* = E' + iE'' \qquad (2.1.9)$$

$$G^* = G' + iG'' \qquad (2.1.10)$$

Utilizzando questa tipologia di analisi è inoltre possibile avere informazioni sulla composizione del polimero.

La procedura adottata per la realizzazione di campioni di spessore e dimensioni adatte all'analisi consiste nel colare, all'interno di un piccolo recipiente di diametro di 24 mm, 0,5 g di materiale non ancora reticolato. Questo viene quindi esposto per 10 minuti all'interno del bromografo in atmosfera inerte dove avviene la reticolazione. Tramite apposito strumento vengono ricavati 6 dischetti dello spessore di 700 μm da sottoporre ad analisi.

Il test viene effettuato tramite lo strumento METTLER Toledo DMA/SDTA 861 in *shear sandwich mode*. Un primo test viene effettuato per individuare il *range* di temperatura

all'interno del quale il polimero mostra un comportamento gommoso. I dischi sono poi afferrati a 0.3 N*m e le analisi avvengono a temperature di 25°C e di 60°C a 1 Hz, al di sopra della T_g del polimero e dove è localizzato il *plateau* gommoso. I valori di G' vengono ottenuti in funzione dell'ampiezza di oscillazione.

2.1.3.3.2 Temperature di transizione termica

Diversi metodi possono essere utilizzati per trovare le temperature di transizione termica. La DSC, tecnica già descritta nel paragrafo §2.1.3.2.1, è ampiamente la più utilizzata. Nostro obiettivo è l'identificazione e il confronto delle temperature di transizione del PFPE-DMA 4000, del PFPE-DMA 2000 e del blend. La transizione vetrosa è un processo endotermico, che si manifesta con una flessione verso il basso o verso l'alto a seconda della scelta del sistema di riferimento.

Le temperature di transizione sono state misurate per i campioni completamente reticolati. Lo *step* iniziale consiste nella preparazione delle soluzioni aggiungendo il fotoiniziatore (§2.1.2). 15 mg di soluzione vengono posti nel crogiuolo e quindi esposti, in atmosfera inerte, alla luce UV per 10 minuti per la reticolazione. Infine, il crogiuolo viene chiuso e esposto allo *scanner* di temperatura tra -135°C fino a 150°C.

La DMA permette inoltre la misura della temperatura di transizione vetrosa di un polimero. I polimeri amorfi hanno diverse temperature di transizione, sopra le quali il materiale presenta un comportamento gommoso; la DMA permette l'individuazione della seconda temperatura di transizione vetrosa del blend. Durante la transizione vetrosa, il modulo conservativo decresce rapidamente e il modulo dissipativo raggiunge un massimo.

2.1.3.3.3 Angolo di contatto ed energia superficiale

Alla scala microscopica i fenomeni di superficie assumono una notevole importanza, perciò è fondamentale determinare le tensioni all'interfaccia solido-vapore e solido-liquido. Data la difficoltà di una misura diretta, si preferisce optare per metodi indiretti che permettano di calcolare queste tensioni.

Il metodo indiretto standard prevede la valutazione sperimentale di angoli di contatto di differenti liquidi sul substrato solido. L'angolo di contatto riveste un ruolo fondamentale nell'ambito della microfluidica. È il metodo più rapido utilizzato per verificare e misurare la bagnabilità di una superficie solida.

L'angolo di contatto può essere misurato osservando il profilo di una goccia di liquido a riposo sulla superficie (metodo *sessile drop*). Generalmente lo svolgimento delle misure consiste nell'osservare direttamente il profilo delle gocce di liquido (depositate sulla superficie del campione con una microsiringa) tramite una videocamera e nel misurare bidimensionalmente l'angolo formato tra la fase solida e il profilo della goccia, tramite uno specifico strumento. Nel metodo statico si effettua una misura di una goccia all'equilibrio subito dopo che è stata depositata. Vengono deposte sei gocce sul substrato di cui viene effettuata la misura dell'angolo di contatto (Figura 2.1.10). E' stata poi effettuata una media tra le misure ottenute.

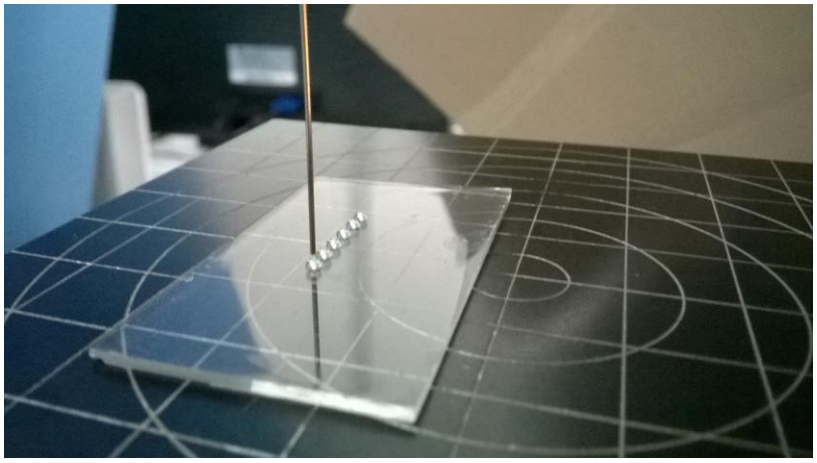


Figura 2.1.10: Campione di PFPE-DMA durante le analisi con l'angolo di contatto statico.

L'equazione di Young definisce la relazione tra l'angolo di equilibrio tra il liquido e il substrato solido e le tensioni superficiali. Essa vale per substrati ideali, superfici rigide, lisce (con rugosità superficiali minori di 0.5 - 0.1 μm) e omogenee.

$$\gamma sv - \gamma sl = \gamma lv \cos\theta \qquad (2.1.11)$$

Nell'equazione compaiono i tre termini che si riferiscono alle tensioni solido-vapore (γsv), solido-liquido (γsl), e liquido-vapore (γlv). Maggiore è la differenza γsv-γsl, minore è l'angolo di contatto. Se l'angolo di contatto è basso significa che la goccia di liquido si distende facilmente sulla superficie solida, che risulta essere bagnabile, quindi liquidi con bassa tensione superficiale amano disporsi su superfici solide ad alta tensione superficiale.
Se il liquido considerato è acqua, la superficie in esame verrà definita idrofobica se $\theta>90°$, idrofilica se $\theta<90°$.

Con l'equazione di Young è possibile misurare due grandezze: θ e γlv. Per il calcolo delle tensioni superficiali sono necessarie altre due relazioni.

Nonostante la semplicità dell'equazione di Young, la misura dell'angolo di contatto statico non è altrettanto semplice, a causa delle caratteristiche delle superfici reali, ben lontano dall'idealità a cui fa riferimento l'equazione. Sulle superfici reali possiamo definire un'isteresi dell'angolo di contatto, data dalla differenza tra l'angolo avanzante e il recedente:

$$H = \theta_\alpha - \theta_r \qquad (2.1.12)$$

L'isteresi dell'angolo di contatto può essere classificata come termodinamica o cinetica, nel primo caso essa è indipendente dal tempo, nel secondo invece essa varia in sua funzione. L'isteresi termodinamica può essere attribuita alla rugosità e all'eterogeneità della superficie. In caso di rugosità possiamo definire l'angolo di contatto di Wenzel come:

$$\cos\theta_w = r \cos\theta \qquad (2.1.13)$$

in cui la r rappresenta la rugosità mentre θ è l'angolo di contatto ideale. Quando θ>90°, l'angolo di contatto ideale è minore di θ_w.

L'eterogeneità comporta la presenza di regioni sulla superficie ad alta energia superficiale accanto a regioni con energia più bassa. L'equazione che rappresenta la relazione tra angolo di contatto effettivo e angoli ideali è quella di Cassie e Bexter:

$$\cos\theta_c = f_1 \cos\theta_1 + f_2 \cos\theta_2 \qquad (2.1.14)$$

con f_1 e f_2 frazioni di aree superficiali con differenti tensioni e θ_1 e θ_2 angoli di contatto ideali delle due aree. Nelle superfici solide anche il rigonfiamento (*swelling*), le reazioni chimiche e la riorganizzazione superficiale dei gruppi funzionali sulla superficie giocano un ruolo non marginale nell'influenzare l'angolo di contatto. La penetrazione del liquido nella superficie solida altera irreversibilmente le tensioni superficiali causando la cosiddetta isteresi cinetica, che può variare in qualsiasi momento.

Esistono diversi metodi in letteratura per ricavare le tensioni superficiali da misure di angolo di contatto. Nel nostro caso abbiamo utilizzato due metodi: l'equazione della media armonica, usata per sistemi a bassa energia, come liquidi organici, acqua e polimeri, e l'equazione di stato di Neumann (EOS).

Per l'analisi delle superfici di nostro interesse vengono preparati dei campioni unendo il precursore liquido con il fotoiniziatore, lasciando in agitazione la soluzione e depositando la soluzione, sottoponendola a 1500 rpm per 30 s tramite *spin-coater* (§2.1.2.1) su un substrato di vetro. I campioni vengono poi esposti ai raggi UV per la completa reticolazione. Dopo la preparazione dei campioni è possibile sottoporli all'analisi per la misura dell'angolo di contatto e dell'energia superficiale.

Lo strumento utilizzato nell'ambito di questo lavoro è un DataPhysics OCA 20. Esso presenta un portacampione mobile, posto sotto una microsiringa Hamilton (volume 500 µl) che eroga le gocce di liquido e che viene controllata da un computer. Come liquido sonda è stata utilizzata acqua (Chromasolv water per HPLC, Sigma Aldrich) dispensata in gocce di volume 1 µl alla velocità di 0.5 µl/s.

Una videocamera CCD allineata con la goccia e con una sorgente luminosa registra immagini video e fotografie del sistema campione solido-goccia.

Un *software* permette di acquisire e di processare le immagini; nel nostro caso il *software* dello strumento (Data-Physics SCA 20) permette di interpolare il contorno della goccia calcolando la differenza tra la luminosità di *pixel* adiacenti.

Il metodo d'interpolazione applicato per il calcolo dell'angolo di contatto statico è il metodo Young-Laplace; esso è considerato il più complesso ma allo stesso tempo quello teoricamente più esatto e permette di valutare tutto il profilo della goccia. Il processo d'interpolazione include anche termini correttivi che considerano l'influenza del peso della goccia di liquido stessa nella misura dell'angolo. L'angolo di contatto viene calcolato come la tangente all'intersezione fra la linea che descrive il profilo della goccia e la superficie solida del campione da analizzare (*baseline*), è possibile effettuare misure sia dal lato destro sia dal lato sinistro della goccia, i valori vengono automaticamente mediati e viene restituito un unico valore.

La stessa procedura utilizzata per l'acqua, viene seguita per la misura dell'angolo di contatto con il diiodometano (Sigma-Aldrich). Le misure dinamiche per il calcolo dell'energia superficiale, vengono effettuate incrementando il volume della goccia (angolo di contatto avanzante) e poi diminuendo il volume (angolo di contatto recedente). L'ago della siringa rimane all'interno della goccia per tutta la durata del processo. Nella prima parte una goccia di 3 µl viene creata sulla superficie solida e poi ne viene lentamente aumentato il volume (Figura 2.1.11.a).

Nella seconda fase, (Figura 2.1.11.b) il volume della goccia viene invece ridotto per la misura dell'angolo di contatto recedente. L'intero ciclo viene ripetuto per 5 volte alla velocità di 1 µl/s, con un ritardo di 1 s tra ogni ciclo. Per l'analisi è stato utilizzato il metodo ellittico.

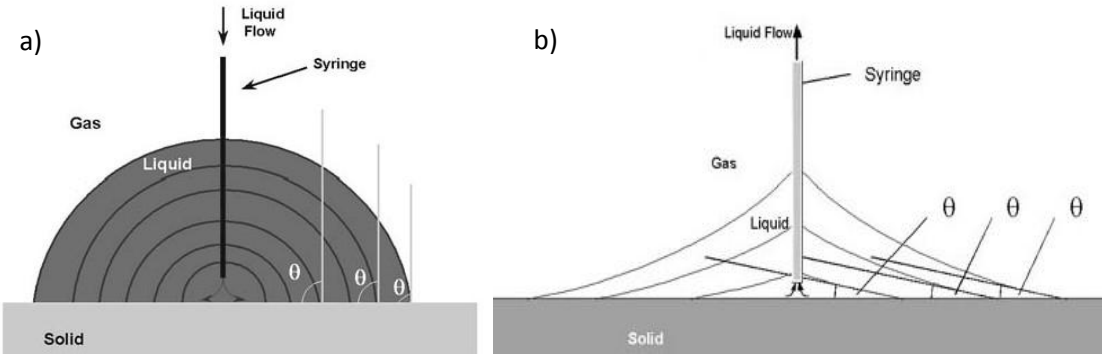


Figura 2.1.11: a) Processo per misurare l'angolo di contatto avanzante; b) Processo per misurare l'angolo di contatto recedente.

2.1.4 Proprietà *antifouling* e *fouling-release*

Un *microarrayer* (SpotBot® 2 Protein Edition – SPA2PRO, ArrayIt®) viene utilizzato per effettuare test statici in condizioni standard controllate, al fine di valutare la resistenza dell'adesione proteica su substrati in PFPEs. I test sono stati effettuati all'Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC). Il *microarrayer* sfrutta una tecnologia automatizzata per stampare in modo semplice ed efficace su uno stesso substrato differenti tipi di proteine anche a diversa concentrazione. Per questi esperimenti, sono state preparate soluzioni di proteine a diversa concentrazione (0.002, 0.02, 0.2, e 2 mg/ml), diluendo in *buffer* salino (*phosphate buffered solution*, PBS pH 7.8) l'albumina da siero bovino (BSA), la streptavidina (StreptAv) e l'immunoglobulina G di asino anti-capra (H+L) (IgG); tutte le proteine sono coniugate con Alexa Fluor® 555 (Thermo Fischer Scientific). Per il *printing* della proteina, vengono caricati 25 µl di ogni soluzione proteica all'interno di appositi *reservoirs*, costituiti da una micropiastra di 384 pozzetti (Fig.2.1.12a), mentre i substrati, la cui superficie deve essere funzionalizzata con un *pattern*, vengono posizionati su di un *sample holder* in PMMA, posizionato all'interno del *printing desk* (Fig.2.1.12b). L'*holder* è costituito da *pin* e fori connessi a pompe e compressori, utilizzati per introdurre *buffers* per il lavaggio e per flussare aria sui campioni, permettendo così l'automatizzazione degli *steps* di lavaggio e di asciugatura richiesti al termine di ogni processo di *printing*.

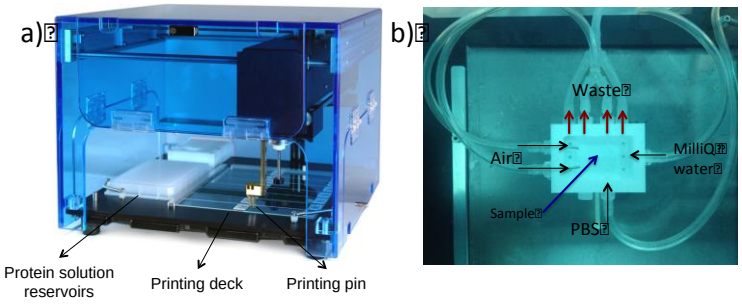


Figura 2.1.12: In a) viene illustrato il *microarrayer* SPA2PRO® utilizzato per il *printing* automatizzato di proteine, in (b) Il *sample holder* in PMMA localizzato all'interno del *printing desk*.

Un *pattern* costituito da 12 blocchi di 18 *dots* ciascuno, di diametro 100 µm e distanziati di 200 µm (Fig.2.1.13) viene disegnato e implementato attraverso il *software* Multiple Microarray Format SpotSupport al fine di programmare l'*arrayer*.

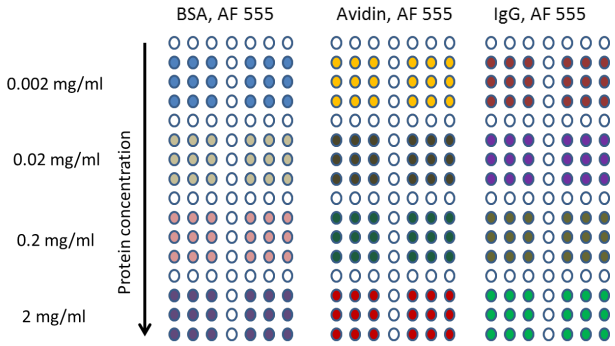


Figura 1.1.13: Schema del *pattern* di proteine stampato sui substrati per lo studio delle proprietà *antifouling*. Il *pattern* è costituito da 12 blocchi di 18 *dots* ciascuno.

Per realizzare l'*array*, il *pin* si allinea automaticamente rispetto al primo pozzetto, dove si immerge e aspira per capillarità 25 µl della soluzione di proteina (Figura 2.1.14a e 2.1.14b). Successivamente il *pin* si allinea col substrato e si abbassa fino a toccare direttamente il substrato stesso per rilasciare la goccia di soluzione realizzando lo *spot* (Figura 2.1.14c). Dopo la stampa di ogni *spot*, la punta viene lavata e asciugata prima che il *pin* si reimmerga nel pozzetto per la carica di un nuovo volume di campione. Durante il processo di stampa l'intera camera viene mantenuta a 37°C e all'80% di umidità, in modo da simulare le normali condizioni fisiologiche ed evitare l'evaporazione della soluzione proteica.

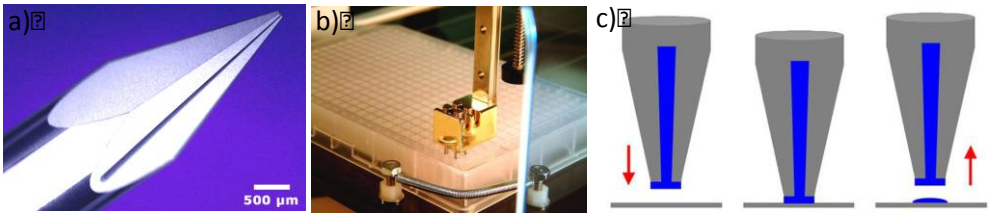


Figura 2.1.14: (a) La punta di stampa con all'interno il canale. (b) La soluzione di proteina viene caricata all'interno del canale della punta tramite capillarità. (c) La punta piatta permette la formazione di un sottile film di campione, in modo che la proteina venga stampata sul substrato tramite un contatto diretto.

Al termine del processo di stampa, i substrati vengono lasciati in incubazione per un'ora all'interno della camera, e infine lavati e asciugati. Durante questo *step*, il PBS e l'acqua vengono introdotti attraverso opportuni *pin* sui substrati con il *pattern*. In seguito, la soluzione di lavaggio viene rimossa e il campione viene asciugato tramite un flusso d'aria. Prima e dopo lo *step* di lavaggio e asciugatura, vengono acquisite immagini dell'*array* di proteine tramite microscopio a fluorescenza (Nikon E1000) e l'intensità di fluorescenza, indice dell'adesiona aspecifica delle proteine, viene valutata tramite il software ImajeJ™. In particolare, per ogni *array* viene calcolato l'integrale della densità, che permette una stima del valore di fluorescenza tenendo conto del valore medio di grigio di un'area selezionata e la dimensione di quest'area (nel nostro caso la superficie degli *spots*).

2.2 *Patterning* di Biomolecole

Diverse strategie possono essere seguite per la realizzazione di *patterns* biomolecolari su una superficie. Nel nostro lavoro di tesi sono state utilizzate due tecnologie per la realizzazione di *patterns* sulle superficie di PFPE-DMAs, il *microcontact printing* (µ-CP) e la fotolitografia. La tecnica del µ-CP presenta innumerevoli vantaggi: è semplice, poco costosa e permette la realizzazione di *patterns* su superfici non planari. Essa rappresenta un'alternativa rispetto alla tecnica della fotolitografia, ampiamente conosciuta e utilizzata in letteratura, soprattutto nell'ambito dell'elettronica.

2.2.1 Micro-Contact Printing (µ-CP)

Elemento chiave della tecnica *soft*-litografica del µ-CP è lo stampo elastomerico in PDMS. Lo stampo viene normalmente fabbricato tramite replica *molding*, versando una miscela di prepolimero e agente reticolante (PDMS), in rapporto 10:1, su un *master* sulla cui superficie è presente il *pattern* con la struttura complementare a quella che si vuole riprodurre. Lo stampo è stato realizzato in PDMS (Sylgard®184 Silicone Elastomer Kit,

Dow Corning). Il PDMS viene realizzato mescolando il precursore liquido con l'agente reticolante in rapporto 10:1, il composto così ottenuto viene mescolato per 5 minuti e lasciato riposare sotto cappa per un'ora prima di essere colato sul master, in modo da eliminare eventuali bolle di aria intrappolate. La polimerizzazione può quindi avvenire a temperatura ambiente in 48 ore, ma può anche avvenire in 45, 20 o 10 minuti semplicemente aumentando la temperatura di polimerizzazione rispettivamente a 100, 125 o 150° C [60]. Il *master* utilizzato è in silicio microstrutturato con differenti geometrie: linee parallele delle dimensioni di 10 µm e distanziate di 50 µm (G5), *spots* di forme miste (quadrati 20x20 µm, cerchi con diametro 20 µm e triangoli equilateri con lato 30 µm) (M3), frecce distanziate di 50 µm (L3) e infine *dots* circolari di diametro 25 µm (O2) riportate in figura 2.2.1.

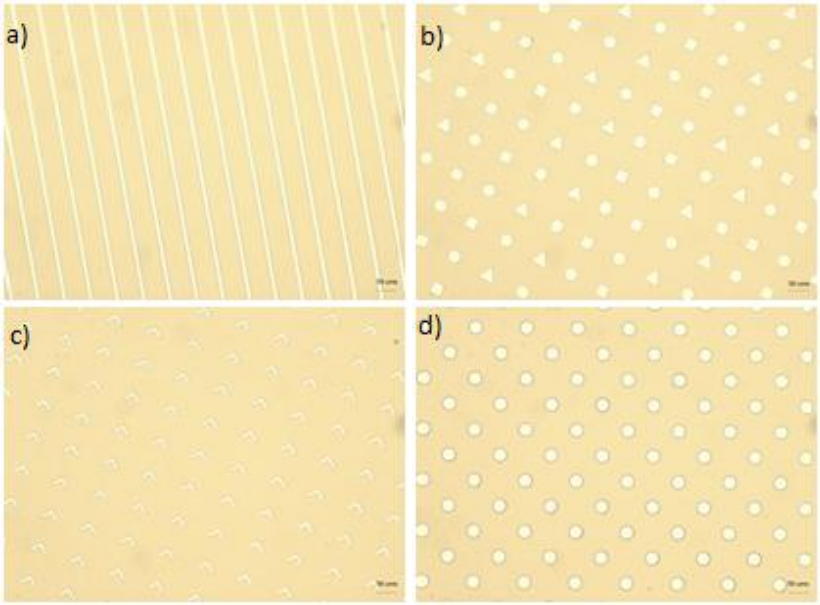


Figura 2.2.1: Master utilizzati per ottenere repliche in PDMS da utilizzare nel *microcontact printing* a) G5, b) M3, c) L3 e d) O2

Per il µ-CP si utilizzano stampi di dimensioni di circa 10x10 mm. I gruppi metilici di superficie (-CH3) determinano un comportamento idrofobico del PDMS. Tuttavia nel caso del *printing* di biomolecole, una maggiore idrofilicità della superficie può essere utile per il trasferimento di un inchiostro biomolecolare.

I substrati di PFPE-DMAs per il µ-CP sono stati realizzati depositando un film omogeneo di blend con l'uso di uno *spin-coater* su superfici in vetro silanizzate (§2.1.2) ed esponendo

per 20s in bromografo in atmosfera inerte di azoto, in modo da ottenere una reticolazione parziale con doppi legami C=C non reagiti.

Il protocollo ottimizzato utilizzato per la realizzazione del *pattern* di eparina funzionalizzata con biotina su blend, può essere riassunto nei seguenti *steps*.

I. *Step*:

- una goccia (10 μl) di soluzione di fotobiotina (EZ-link TFPA-PEG_3-biotin, Thermoscientific) sciolta in acetonitrile o acetone (1 mg/ml) viene messa sulla superficie della replica di PDMS per 30 minuti per consentire l'assorbimento della fotobiotina e l'evaporazione del solvente.
- Lo stampo asciutto viene posto in contatto con il substrato di blend parzialmente reticolato (T_{exp} = 20 s, $\%_{conversione} \approx 50\%$) per 15 minuti (schema 1 in figura 2.2.2), con un peso di 25 g per 20s.
- Dopo la rimozione della replica, la superficie di PFPE parzialmente reticolata sul quale è stato trasferito l'*array* di fotobiotina viene esposta per 30 minuti alle radiazioni UV (365 nm, 2 mW/cm^2) (schema 2 in figura 2.2.2) per promuovere la reazione tra il gruppo azide della fotobiotina e i doppi legami presenti sulla superficie del substrato. Il gruppo azide si converte in aril-nitrene che può generare un attacco covalente con i legami C-H, N-H e C=C.

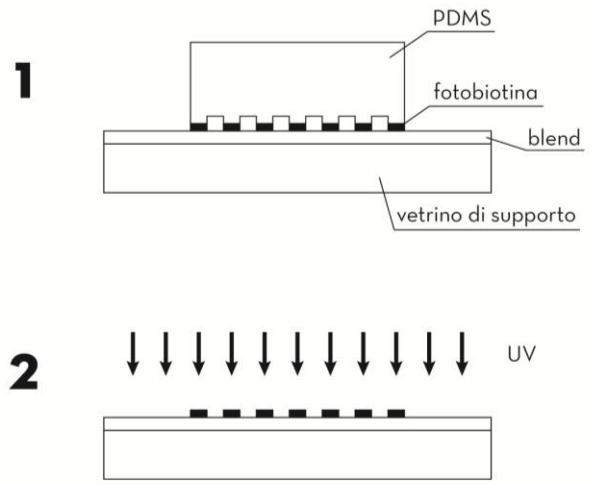


Figura 2.2.2: Schema rappresentativo dello *step* I del μ-CP: 1) replica di PDMS poggiata su substrato di blend parzialmente reticolato; 2) *printing* di fotobiotina esposto alla radiazione UV per favorire il *grafting* con il blend.

II. *Step*:

- la superficie funzionalizzata con fotobiotina viene incubata con 300 µl di neutravidina 0.1 mg/ml (Thermo-scientific) sciolta in PBS (Figura 2.2.3) e lasciata per 1 ora a temperatura ambiente. La neutravidina in eccesso viene rimossa con un lavaggio di PBS.

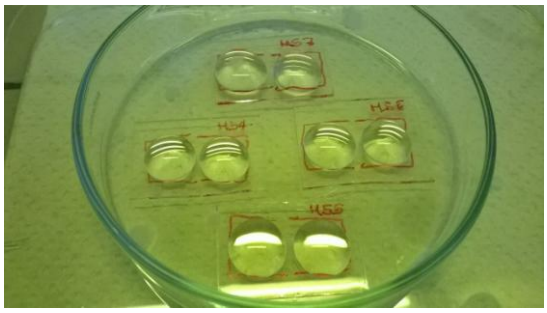


Figura 2.2.3: Soluzione di neutravidina posta su campioni di blend funzionalizzati con fotobiotina.

III. *Step*:

- eparina funzionalizzata con biotina (*heparin-biotin sodium salt*, Sigma-Aldrich), si lega al substrato sfruttando i siti di legame ancora disponibili sulla struttura della neutravidina. L'eparina viene disciolta in PBS (1 mg/ml), e incubata per 24 ore a 4°C sulla superficie funzionalizzata con fotobiotina-neutravidina. L'eparina in eccesso viene rimossa usando PBS e acqua distillata.

Per validare i legami ottenuti nel I *step*, al posto della neutravidina al II *step* è stata utilizzata la streptavidina coniugata con fluoresceina (*Immunopure Avidin, Fluorescein Conjugated*, Thermo-Scientific), in concentrazione 100 µg/ml in PBS, per 40 min a temperatura ambiente. L'eccesso è stato lavato con PBS *tween* 20 al 5% v/v e acqua distillata. La coniugazione della streptavidina con la fluoresceina permette la visualizzazione del *pattern* al microscopio a fluorescenza.

Lo *step* successivo, invece, è stato validato incubando per 40 minuti l'*array* di neutravidina auto assemblato sulla fotobiotina con biotina fluorescente (*Biotin (5-fluorescein) conjugate*, Sigma-Aldrich) sciolta in PBS a 50 µg/ml. L'eccesso, anche in questo caso, è stato lavato con PBS *tween* e acqua distillata.

Per ottimizzare il protocollo, diverse soluzioni di fotobiotina sono state testate durante il lavoro di tesi: si è deciso di variare sia il solvente utilizzato per diluire la fotobiotina, sia la concentrazione di quest'ultima. Alcune soluzioni utilizzate sono:

- 0,5, 1 e 10 mg in 1 ml di acetonitrile puro e diluito in acqua in rapporto 1:1;

- 0,5, 1 e 10 mg in 1 ml di acetone puro e diluito in acqua in rapporto 1:1;
- 1 mg e 10 mg in 1 ml di dimetilsulfossido (DMSO) puro e diluito in acqua in rapporto 1:1.

Anche nel caso dei metodi di asciugatura della goccia ed evaporazione del solvente sono state seguite diverse strategie, anche in funzione del tipo di solvente scelto per la soluzione di fotobiotina:

- lasciar asciugare la goccia a 37°C su piastra per un tempo variabile tra i pochi minuti (acetone) e 1 h circa (DMSO);
- lasciar asciugare la goccia a temperatura ambiente per un tempo variabile tra 1 e 2 h;
- utilizzo di una pompa a vuoto, per un tempo variabile di pochi minuti (nel caso di acetone), a 1 h (nel caso di DMSO) al fine di ottenere un'evaporazione più uniforme e omogenea.

2.2.2 Fotolitografia

Un processo di fotolitografia manuale con fotomaschere in acetato è stato ottimizzato per la realizzazione di *pattern* di eparina su blend di PFPE. A tal scopo, si utilizza una soluzione di eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici la cui sintesi verrà descritta nel paragrafo successivo (§2.2.2.1).

- Il primo *step* del processo fotolitografico è la realizzazione del substrato, in modo analogo a come avviene nel µ-CP. Dopo la silanizzazione dei vetrini in modo da favorire l'adesione tra vetro e film di PFPE, uno strato uniforme di PFPE viene deposto utilizzando *spin-coater* (1500 rpm per 30 s) (§2.1.2). Infine il substrato viene esposto alla radiazione UV per 20 s, corrispondente a circa il 50% di conversione (C=C residui).
- Sul substrato parzialmente reticolato, viene posta una goccia di 10 µl di soluzione di eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici (§2.2.2.1). Il solvente nella soluzione di eparina viene lasciato evaporare parzialmente per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Il campione con la goccia di eparina viene esposto agli UV per 15 minuti filtrando la radiazione attraverso una fotomaschera in acetato. Utilizzando la lampada UV (AlphaDigiDoc Pro, Alpha Innotech), in figura 2.2.4, un transilluminatore a doppia

lunghezza d'onda con controllo d'intensità che emette UV a 302 nm o a 365 nm, quest'ultima è la lunghezza d'onda da noi utilizzata. Particolarità di questa lampada è che la luce proviene da sotto per cui è necessario ribaltare il campione, in modo che la fotomaschera risulti in contatto con il piatto in quarzo.

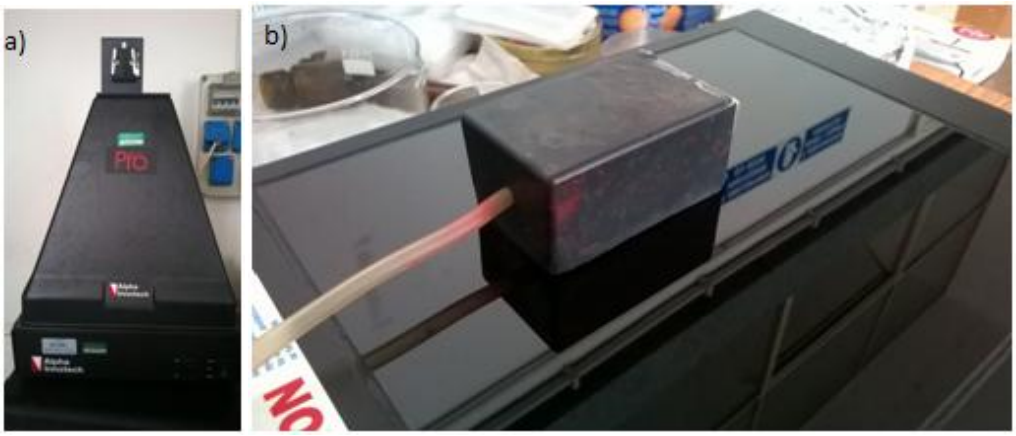


Figure 2.2.4: a) Lampada UV (AlphaDigiDoc Pro) presente nel nostro laboratorio; b) cameretta sotto la quale vengono alloggiati i campioni per mantenere un'atmosfera controllata di azoto.

- Al termine dell'esposizione il campione viene lavato con PBS e acqua distillata per eliminare l'eparina non reagita e infine riesposto per 2 minuti alla radiazione UV nel bromografo in atmosfera inerte per completare la reticolazione.

Le fotomaschere nere in poliestere (Alliance HS recording AGFA) con *dots* bianchi vengono prodotte a partire da un modello CAD (Figura 2.2.5). I *dots* sono di dimensioni diverse di 50 e 100 μm, in modo da poter valutare il *pattern* con la dimensione più piccola che possa essere realizzato con successo. Non solo le dimensioni, ma anche la distanza presente tra i *dots* e la loro distribuzione spaziale influiscono sull'efficacia della tecnica fotolitografica. In particolare *dots* disposti su file diverse e sfalsati sono preferibili rispetto a *dots* allineati su file parallele, cosicché la prima configurazione risulta ottima per la cattura di cellule. Le dimensioni della maschera risultano essere leggermente inferiori di un substrato standard, in modo da essere maneggiate agevolmente durante la procedura.

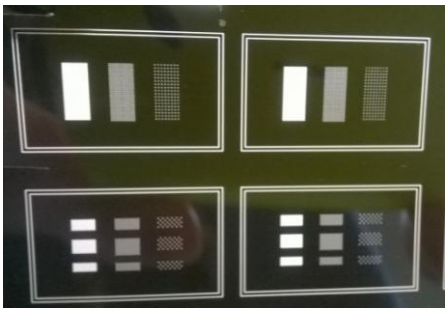


Figura 2.2.5: Fotomaschere utilizzate con *dots* circolari di diametro di 50 o 100 µm e distanziati sulla stessa fila di 100, 500 o 1000 µm per ottenere *pattern* con tecnica fotolitografica.

2.2.2.1 Reazione di sintesi dell'eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici

La reazione di metacrilazione dell'eparina è uno *step* fondamentale per permettere la reazione con il substrato. I gruppi metacrilici coniugati alle macromolecole dell'eparina, possono legarsi ai doppi legami C=C non reagiti del PFPE in seguito all'esposizione alla luce UV.

L'eparina (*heparin sodium salt* da mucosa intestinale porcina, Sigma-Aldrich) viene disciolta in acqua distillata in concentrazione 2% w/v. Viene poi aggiunto alla soluzione un eccesso di 5 volte in moli di anidride metacrilica (Sigma Aldrich) rispetto alle moli dell'unità disaccaridica dell'eparina [51], e aggiustando il pH a 8,5 utilizzando una soluzione di acqua e NaOH 5N. La reazione viene lasciata 12 h in agitazione a temperatura ambiente. In seguito, viene precipitata in un eccesso di 20 volte in volume di acetone. Dopo la rimozione dell'acetone, l'eparina metacrilata viene nuovamente disciolta in acqua distillata in concentrazione 2% w/v. L'ultimo *step* prevede l'eliminazione dell'eccesso di anidride metacrilica non reagita, tramite la dialisi della soluzione con membrane avente porosità 1000 MW (6 Spectra/Por® Dialysis), maggiore rispetto al peso molecolare dell'anidride metacrilica (168,04 g/mol). Dopo 24 h di dialisi, la soluzione viene poi liofilizzata. Il liofilizzatore utilizzato è un VirTis SP Scientific, in figura 2.2.6.

Figura 2.2.6: Liofilizzatore (VirTis SP Scientific) in funzione.

Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del prodotto, così che la molecola sia quasi perfettamente ripristinabile quando, al momento dell'utilizzo, si voglia procedere alla reidratazione.

Il processo si svolge in tre tappe:

- Surgelazione o congelamento rapido a temperature variabili tra -20°C e -80°C, in fiale.
- Il calore viene trasferito dalla piastra alla superficie del prodotto e da questo al fronte di sublimazione, ove si trova presenza di prodotto congelato e di prodotto già essiccato. Il fronte di sublimazione man mano avanza verso l'interno del prodotto. Il vapore si trasferisce dal fronte di sublimazione all'esterno creando una struttura porosa. Il vapore d'acqua deve essere rimosso dalla camera di sublimazione o per congelamento su serpentine refrigerate oppure con mezzi essiccanti.
- Un piccolo quantitativo di acqua resta, dopo l'essiccamento primario, come monostrato molecolare adsorbito sulla superficie porosa del substrato. Quest'acqua residua viene parzialmente asportata facendo innalzare la temperatura superficiale (non più di 60°C) ed eventualmente abbassando la pressione (0.13-0.67 mbar). In questa fase l'umidità residua passa dal 10% all'1%-3% finale.

Per la fotoreticolazione, alla soluzione di eparina metacrilata (Figura 2.2.7) viene aggiunto

il fotoiniziatore 1-[4-(2-hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959) e il 1-vynil-2-pyrrolidinone in percentuali del 1.5% w/v e 1% v/v rispettivamente.

Figura 2.2.7: Pallone a tre colli contenente eparina metacrilata a cui è stato aggiunto Irgacure 2959, miscelato com 1-vynil-2-pyrrolidinone, come fotoiniziatore. Il pallone è stato ricoperto di carta stagnola per evitare l'esposizione accidentale e indesiderata alla luce.

Per verificare l'efficienza della metacrilazione si sintetizza un campione macroscopico di eparina metacrilata esponendo 200 µl di soluzione a 0,5 a 1 mg/ml a radiazione UV e verificando una reticolazione massiva della soluzione.

2.2.2.1.1 Analisi ^{1}H -NMR

L'efficienza della metacrilazione dell'eparina è stata verificata tramite la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) del protone che rappresenta in chimica la spettroscopia più importante per l'interpretazione e la determinazione di una struttura. È una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame. Misura l'assorbimento di radiazione elettromagnetica di frequenza radio in molecole immerse in un forte campo magnetico. Queste radiazioni provocano transizioni di *spin* nucleare in particolari isotopi (tipicamente ^{1}H o ^{13}C). Quindi, con la spettroscopia NMR, le informazioni sulla struttura molecolare vengono dedotte osservando il comportamento dei nuclei atomici.

Con la tecnica NMR sono osservabili solo i nuclei che possiedono un momento magnetico nucleare di *spin*, e che quindi si comportano come l'ago di una bussola che si può orientare in un campo magnetico applicato. Lo *spin* nucleare viene prodotto dalle particelle che costituiscono il nucleo, protoni e neutroni. Queste si comportano come se fossero in rotazione (*spin*) attorno al loro asse e hanno *spin* 1/2.

I nuclei degli atomi che possiedono un numero dispari di protoni, o di neutroni o tutte e due le cose, ruotano su se stessi e quindi hanno un momento angolare. Questo momento angolare è caratterizzato da un numero quantico di *spin* nucleare I tale che:

$I = 1/2\ n$ (2.2.1) dove n è un numero intero 0, 1, 2, 3 ... etc.

- I nuclei con I=0 non possiedono momento angolare di *spin* e non sono osservabili all'NMR. I nuclei di ^{12}C e ^{16}O cadono in questa categoria.
- ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P hanno I=1/2 e sono i nuclei che vengono più comunemente studiati all'NMR.
- ^{2}H e ^{14}N hanno I=1, anche questi sono osservabili all'NMR, ma hanno un comportamento più complesso.

Poiché i nuclei atomici possiedono una carica, un nucleo che ruota genera una piccola corrente elettrica e ha un piccolo campo magnetico associato. Il dipolo magnetico μ del nucleo varia per ogni elemento.

Quando un nucleo dotato di *spin* viene immerso in un campo magnetico, il nucleo, come l'ago di una bussola, è sottoposto ad una coppia di forze che lo fanno ruotare per allinearlo con il campo magnetico esterno. Per un nucleo con *spin* 1/2, ci sono due orientamenti possibili: allineato con il campo (bassa energia) o opposto al campo (alta energia). Poiché la differenza di energia tra i due stati è piccolissima, dell'ordine di $9x10^{-6}$ kcal mol^{-1}, si raggiunge rapidamente l'equilibrio tra i due stati e in media solo il 50% dei nuclei immersi nel campo magnetico B_o assume l'orientamento allineato con il campo, mentre il restante 50% assume l'orientamento opposto.

Se i nuclei orientati vengono colpiti da radiazione elettromagnetica di opportuna frequenza, gli stati di energia più bassa (allineati al campo) assorbono un quanto di energia e ruotano il proprio *spin* per assumere lo stato di alta energia (opposti al campo). Quando si verifica questa transizione di *spin*, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata, da qui il nome Risonanza Magnetica Nucleare.

La frequenza della radiazione elettromagnetica necessaria per la risonanza dipende sia dalla forza del campo magnetico esterno che dalle caratteristiche del nucleo in esame. Campi magnetici più alti, come quelli generati dai magneti superconduttori, richiedono radiazione di energia più alta e forniscono spettri di risoluzione maggiore. Dato che il dipolo magnetico μ di un certo nucleo è una costante, si potrebbe prevedere che tutti i

nuclei di un certo tipo debbano risuonare esattamente alla stessa frequenza in un determinato campo magnetico applicato. Nelle molecole reali, questo fatto accade molto raramente. Infatti il segnale NMR di un certo nucleo risulta spostato nello spettro a frequenze più alte o più basse a seconda del suo intorno chimico. Questo accade perché gli elettroni sono particelle cariche e come tali, quando vengono immersi in un campo magnetico B_o, si muovono e generano un piccolo campo magnetico opposto a quello molto più forte applicato. Questo campo magnetico secondario scherma il nucleo dalla piena forza del campo applicato. Tanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà questa schermatura, così i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni, sentiranno un campo magnetico più basso e quindi subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni.

Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo è detto spostamento chimico e, in generale, protoni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano deschermati quindi sentono un campo magnetico applicato più intenso e subiscono transizioni a frequenze maggiori e, nello spettro, si trovano ad uno spostamento chimico più alto (Figura 2.2.8).

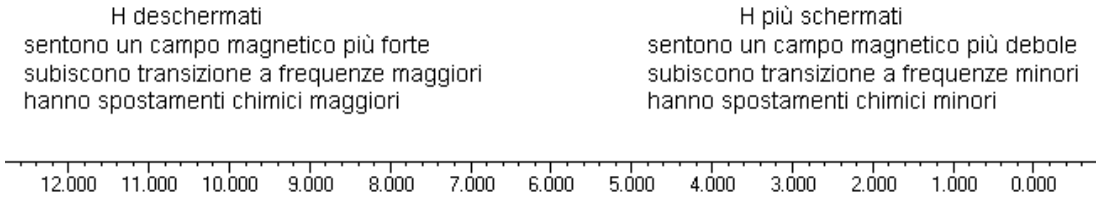


Figura 2.2.8: Immagine rappresentante lo spostamento chimico di protoni adiacenti ad atomi più o meno elettronegativi.

Lo spostamento chimico assoluto risulta tanto maggiore quanto più grande è il campo applicato, quindi strumenti diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi in rapporto alla intensità del loro campo magnetico. Per questo si preferisce utilizzare lo spostamento chimico relativo d definito dall'equazione:

$$\delta = \frac{\text{spostamento osservato rispetto al } (CH_3)_4Si \text{ in Hz}}{\text{frequenza dell'oscillatore in MHz}} \text{ ppm} \qquad (2.2.2)$$

In questo modo lo spostamento chimico d, misurato in ppm (Hz/MHz), è indipendente dal campo applicato. Per ^{1}H-NMR, la scala d generalmente si estende da 0 a 12 ppm.

Nella scala d del ^{1}H-NMR, i semplici protoni idrocarburici tendono ad assorbire nella regione d = 0.5-1.5, i protoni sul carbonio adiacente al carbonile sono spostati a d = 2, gli atomi elettronegativi (ossigeno o alogeni) spostano i protoni a d = 3-4, i protoni vinilici sono spostati a d = 5-6, i protoni aromatici a d = 7-8, i protoni aldeidici a d = 9-10, ed i protoni degli acidi carbossilici sono i più spostati e cadono nell'intervallo 10-12 ppm, il tutto schematizzato in figura 2.2.9.

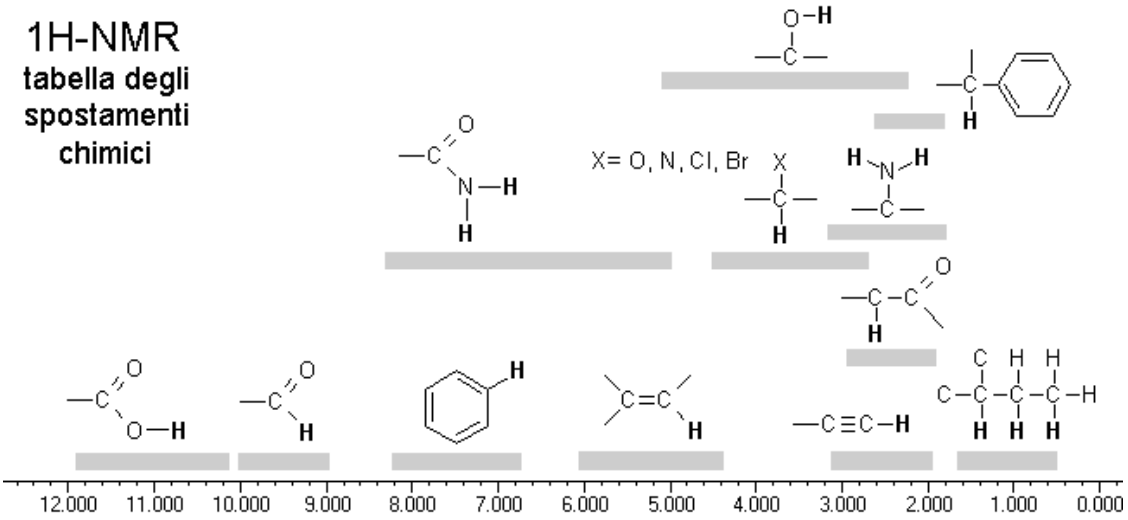


Figura 2.2.9: Spostamento chimico corrispondente a diversi gruppi chimici nell'^{1}H-NMR.

Nel presente lavoro di tesi una prova di ^{1}H-NMR (Bruker Advance 3, 600 MHz equipaggiato con cryo-probe) è stata utilizzata per misurare il grado di metacrilazione dell'eparina. Prima dell'acquisizione, dal momento che gli spettri possono essere acquisiti solo in soluzione, 2 mg di eparina metacrilata sono stati disciolti in 1 ml di ossido di deuterio per procedere all'analisi, oltre a 5 mg di eparina non metacrilata come campione di controllo. Gli spettri sono stati elaborati utilizzando il *software* MestreNova (MestreLab research).

2.2.3 Caratterizzazione del *Pattern*

2.2.3.1 Microscopio a contrasto di fase

La microscopia a contrasto di fase è una modalità di visualizzazione di alcuni microscopi ottici.

Molti campioni, soprattutto in campo biologico, risultano trasparenti alla luce visibile tuttavia si nota che le radiazioni luminose una volta oltrepassato il campione, subiscono dei cambiamenti di fase che dipendono sia dallo spessore, sia dal diverso indice di rifrazione della struttura oltrepassata. Mediante il microscopio a contrasto di fase è possibile andare a determinare tali cambiamenti e convertirli in differenze di densità così da ottenere delle informazioni utili circa la composizione di oggetti, cellule e tessuti analizzati.

Il preparato viene illuminato da un fascio luminoso in realtà suddiviso a livello del condensatore in due porzioni di fase differente e con diverso angolo di incidenza. Il cambiamento ulteriore di fase dovuto alla porzione di luce che attraversa il campione, andandosi a ricombinare con la luce non rifratta renderà visibili componenti trasparenti ma di indice di rifrazione differente da quello del mezzo.

Il microscopio a contrasto di fase si basa sul fenomeno dell'interferenza luminosa. Quando un fascio luminoso attraversa un oggetto, viene scisso in due componenti: un'onda non deviata o onda *surrounded* (S) e un'onda deviata o diffratta (D). Le due componenti D e S vengono catturate da lenti e indirizzate al piano dell'immagine. L'interferenza tra S e D produce un'onda P risultante. L'oggetto può essere visualizzato solo se l'ampiezza delle onde S e D è differente. L'onda D è d'intensità minore rispetto all'onda S (meno fotoni vengono diffratti dall'oggetto), e in ritardo di $\lambda/4$. La differenza di ampiezza che si ottiene tra l'onda P e l'onda S non è sufficiente a produrre un contrasto significativo sul piano dell'immagine. A questo punto lo strumento viene utilizzato per aumentare il contrasto. Viene indotto un *shift* di $\lambda/4$ tra S e D in modo da avere una differenza netta di fase si $\lambda/2$. Nel contrasto di fase positivo, l'onda S viene avanzata di $\lambda/4$ per indurre un'interferenza distruttiva tra S e D. Per raggiungere un alto contrasto nell'immagine, l'ampiezza di S viene ridotta del 70% così che P risulti molto più bassa di S.

Oggetti con un indice di rifrazione più alto della matrice appaiono scuri. Maggiore è la densità dell'oggetto, più essi appariranno scuri, nonostante altri parametri come la dimensione e l'orientamento di oggetti asimmetrici influenzino il contrato e l'intensità. Allo stesso modo, oggetti con un indice di rifrazione minore della matrice appaiono più chiari di essa. Quindi due fattori influenzano l'intensità dell'oggetto finale: il suo spessore (t) e il suo indice di rifrazione (Δn).

$$\delta = \Delta n \cdot t \qquad (2.2.3)$$

Quindi oggetti con indice di rifrazione e spessori diversi possono avere la stessa intensità.

I *patterns* di biomolecole, fotobiotina e in seguito eparina, sono stati osservati tramite microscopio a contrasto di fase (schema in figura 2.2.10). Lo strumento utilizzato è un DMI 3000B Leica con videocamera DFC450C Leica.

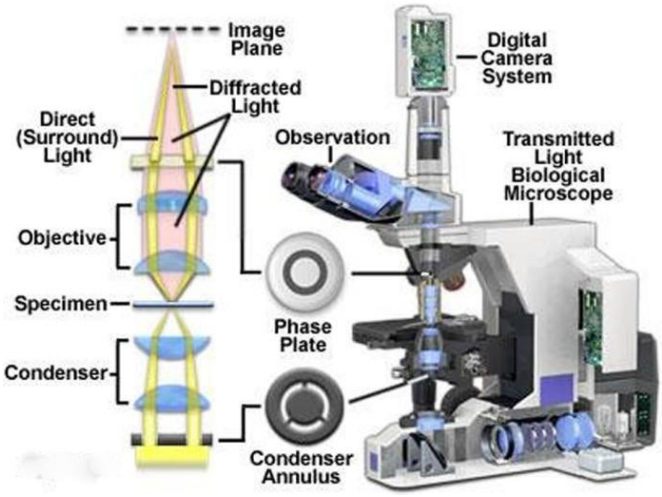


Figura 2.2.10: Schema di un microscopio a contrasto di fase.

2.2.3.2 Microscopio a fluorescenza

La fluorescenza è quel fenomeno fisico per cui una molecola colpita da una radiazione elettromagnetica a un'opportuna lunghezza d'onda (λ d'eccitazione), è capace di emettere un'altra radiazione di lunghezza d'onda superiore (λ d'emissione), a frequenza minore. Ci troviamo nell'ambito della luminescenza, ovvero l'emissione di radiazioni ottiche.

Benché normalmente l'energia elettromagnetica assorbita da una molecola venga riemessa sotto forma di energia termica (calore) attraverso processi di collisione, le molecole dette fluorescenti emettono solo una parte dell'energia elettromagnetica incidente tramite collisioni, e tornano allo stato fondamentale emettendo energia elettromagnetica (d'intensità minore rispetto all'incidente). Per descrivere la fluorescenza si può ricorrere allo studio di possibili stati energetici di una molecola.

In condizioni normali una molecola si trova nel cosiddetto stato fondamentale. Se gli elettroni si trovano in due orbitali diversi la molecola è nello stato di tripletto. L'assorbimento di una certa quantità di radiazione elettromagnetica provoca una transizione elettronica, cioè il passaggio dallo stato elettronico fondamentale S0 a uno dei livelli vibrazionali degli stati elettronici eccitati. Se nella transizione viene coinvolto uno dei sottolivelli S1 o S2, le molecole interessate tenderanno a portarsi al livello energetico

più basso del rispettivo stato eccitato. Una volta raggiunto il sottolivello S2 più basso, la molecola si porta allo stato elettronico S1. Questi processi di rilassamento vibrazionale e di conversione interna avvengono in 10^{-12} s, a differenza del processo di conversione interna dal primo stato eccitato a quello fondamentale che invece avviene più lentamente: ciò motiva la competitività dei meccanismi di dissipazione dell'energia interna per mezzo di fotoni, che causano la fluorescenza che s'instaura in 10^{-9}-10^{-6} s.

L'esperienza dimostra che molte sostanze presentano una stretta correlazione tra lo spettro di eccitazione e quello di emissione: ciò si spiega facilmente per il fatto che, in queste molecole, i vari sottolivelli dello stato eccitato S1 si trovano a distanze energetiche simili a quelle dei sottolivelli dello stato fondamentale S0. Lo spettro di emissione generato dai vari salti energetici verso i sottolivelli S0, si presenta come immagine speculare dello spettro di eccitazione che è originato dalle transizioni verso i sottolivelli dello stato eccitato S1. In alcuni casi si può generare una banda comune (o di sovrapposizione: *overlap*) in corrispondenza della maggiore λ di eccitazione e della minore λ di emissione (Figura 2.2.11).

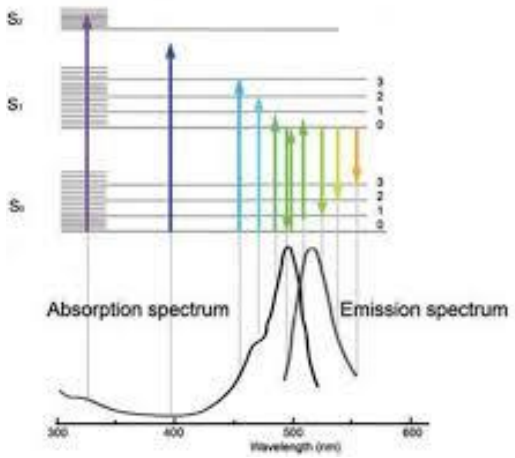


Figura 2.2.11: Rappresentazione dello spettro di assorbimento e di quello di emissioni che risultano parzialmente sovrapposti ma il secondo ha λ minore.

La fluorescenza generata (spontaneamente o con opportuni fluorocromi) può essere osservata con un microscopio ottico. Nell'utilizzo più diffuso attualmente, il componente d'interesse nel campione viene marcato in maniera specifica con una molecola fluorescente, detta fluoroforo (alcuni esempi sono la *Green Fluorescent Protein*-GFP, la fluoresceina o il *DyLight Fluor*). Il campione viene quindi illuminato con un fascio di luce ad una specifica lunghezza d'onda, che viene assorbita dal fluoroforo, causandone

l'emissione di luce a lunghezze d'onda maggiori (e quindi di colore diverso dalla luce assorbita). La luce eccitante viene separata dalla luce emessa, che è molto più debole, grazie all'uso di un filtro. I componenti tipici di un microscopio a fluorescenza sono: una sorgente di luce (lampada ad arco allo xeno o ai vapori di mercurio), un filtro di eccitazione, uno specchio dicroico, e un filtro di emissione.

I filtri e gli specchi dicroici sono scelti in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione del fluoroforo utilizzato.

Gran parte dei microscopi a fluorescenza utilizzati sono microscopi ad epifluorescenza dove l'eccitazione e l'osservazione della fluorescenza avvengono da sopra (*epi–*) il campione, e comunque fuori asse con l'osservatore. Questi microscopi sono diventati importanti strumenti nel campo della biologia, aprendo le porte alla progettazione di microscopi sempre più avanzati e complessi.

Nel nostro lavoro di tesi abbiamo utilizzato due diversi microscopi a fluorescenza, il DMI 3000B Leica con videocamera DFC450C Leica e l'Olympus Ix70.

È stato necessario legare le biomolecole a fluorofori per visualizzarle in fluorescenza.

Nel nostro lavoro di tesi è stata utilizzata la fluoresceina isotiocianato derivata dalla fluorosceina, il fluoroforo maggiormente conosciuto con il caratteristico picco di assorbimento a 495 nm e un picco di emissione localizzato a 521 nm. Il gruppo isotiocianato –(N=C=S) permette la marcatura della proteina. L'eccitazione del fluoroforo FITC in genere di ottiene con un laser a ioni argon con un picco di emissione localizzato a 488 nm così che viene prodotta la migliore efficienza possibile di emissione (circa l'87%).

I *patterns* di fotobiotina sono stati osservati tramite microscopio a fluorescenza. La streptavidina fluoresceina-coniugata viene legata al *pattern* di fotobiotina utilizzando il legame specifico tra biotina e streptavidina.

2.2.3.3 Microscopio a Forza Atomica (AFM)

La microscopia a forza atomica (AFM) è una tecnica largamente utilizzata per l'analisi di superfici a livello nanometrico.

Con l'uso di una sonda composta da una punta in silicio o silice (SiO_2), fissata all'estremità di un *cantilever,* che può essere in nitruro di silicio o silicio, è possibile effettuare una scansione di un'area della superficie del campione compresa tra i 10 e i 100 μm con una massima rugosità registrabile di pochi μm. La punta viene posta molto vicino alla superficie del campione e l'interazione tra queste due, dovuta a forze di Van der Waals,

provoca una deflessione della microleva (la cui costante elastica k è nota), in accordo con la legge di Hooke. La deflessione della leva viene misurata utilizzando un raggio laser, emesso da un diodo, che incide sulla superficie superiore riflettente del *cantilever*. I raggi riflessi sono registrati da un fotodiodo e a seconda della regione del fotodiodo che viene colpita viene prodotta una differenza di potenziale (ddp) diversa che viene tradotta in misura di deflessione del *cantilever*. Se la punta fosse esplorata ad altezza costante, si correrebbe il rischio che possa collidere con la superficie, danneggiandola, per questo motivo, nella maggior parte dei casi viene utilizzato un meccanismo di retroazione per regolare la distanza tra la punta e il campione al fine di mantenere costante la forza che agisce tra loro. Il campione è generalmente collocato su un tubo piezoelettrico, che può spostarlo in direzione perpendicolare (direzione *z*) per mantenere una forza costante e nel piano (direzioni *x* ed *y*) per analizzarne la superficie. La mappa risultante $s(x,y)$ rappresenta la topografia della superficie campione. In modo analogo può essere il *cantilever* a subire gli spostamenti nelle tre direzioni, grazie ad un supporto piezoelettrico, e non il campione come nello strumento da noi utilizzato, NSCRIPTOR™ DPN® (NanoInk, USA).

Vi sono tre modi in cui può essere ottenuta l'interazione tra punta e campione:

- *Contact mode*. La forza di interazione è fortemente repulsiva e il modo di utilizzo è con controllo di forza.
- *Non contact mode*. La forza di interazione è debolmente attrattiva e il modo di utilizzo è con punta vibrante.
- *Tapping mode*. La forza di interazione è fortemente repulsiva e il modo di utilizzo è con punta vibrante.

La modalità in *tapping mode* è un buon compromesso tra le altre due ed è la più utilizzata per la caratterizzazione di campioni che presentano biomolecole sulla superficie. Permette di esplorare la superficie del campione senza che questa venga danneggiata in modo consistente

Il microscopio a forza atomica NSCRIPTOR™ DPN® è stato utilizzato in *tapping mode* con una velocità di scansione di 0.5 Hz/s per acquisire immagini del puro blend e dell'*array* dopo ogni fase d'incubazione per l'ottenimento di *patterns* con eparina biotinilata. Le misure sono state condotte su aree di 50x50 µm utilizzando una sonda standard ACT (AppNano, Santa Clara, CA, USA) a punta piramidale in silicio con frequenza di risonanza di 300 kHz e una costante nominale di k_c = 40 N/m.

Per quanto riguarda i *patterns* di eparina metacrilata è stata, invece, invece utilizzata la tecnica *contact mode* per indagare il differente comportamento superficiale, idrofilico o idrofobico, delle diverse aeree sul campione. È stata quindi valutata la forza di adesione (o attrazione) in gioco tra punta e substrato. La punta impiegata in quest'ultima analisi è una punta in silice sferica con diametro nominale di 6 µm (Hydra 6R-200mg-SiO_2-A-5) legata ad un *cantilever* con costante elastica k=0,035 N/m. Per ottenere delle curve forza-spostamento è stato necessario compiere una calibrazione con un substrato noto in silicio.

2.2.3.4 Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

Per ottenere immagini delle microstrutture e per ottenere informazioni grazie alla microanalisi sui componenti chimici sulla superficie in presenza di *patterns* di eparina biotinilata e metacrilata è stato utilizzato il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM), che sfrutta un fascio di elettroni focalizzati per ottenere un immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione, con ingrandimenti fino a 1000000x, ed una grande profondità di campo. In questo microscopio il fascio non è fisso ma viene fatto scandire, riga dopo riga, su una piccola zona rettangolare del campione, da cui il nome.

Per l'interazione tra fascio e campione avvengono differenti fenomeni che possono fornire diverse informazioni su ciò che si sta analizzando. I segnali rilevati vengono convertiti in impulsi elettrici e, in tempo reale, inviati ad un monitor. Per questo lavoro di tesi sono stati analizzati gli elettroni secondari emessi dalla superficie del campione colpita dal fascio, che hanno reso possibile la ricostruzione della morfologia della superficie, e gli elettroni del fascio retrodiffusi, questi ultimi hanno dato informazioni sugli atomi costituenti la superficie del campione.

Per le analisi SEM è stato utilizzato un microscopio Environmental SEM-Zeiss EVO 50 EP. La sorgente di elettroni a emissione termoionica è un monocristallo di esaboruro di lantalio (LaB_6) in genere di 16 mm con sezione di 1 mm^2, che presenta una brillanza (Densità di corrente per unità di angolo solido) maggiore rispetto a quello più usato in tungsteno. La temperatura di esercizio è di 1700-2100 K e la corrente emessa varia in un range di 40-100 A/cm^{-2}. Il vuoto richiesto perché il sistema sia operativo è di 10^{-4} Pa (necessità di un ulteriore sistema di vuoto costituito da una pompa ionica), ma in genere si arriva fino a 10^{-8} Pa.

Tramite microscopio elettronico (SEM) a scansione è possibile effettuare un'analisi chimica (microanalisi) viene realizzata misurando l'energia e la distribuzione delle

intensità dei raggi X generati dal fascio elettronico sul campione utilizzando un rivelatore a dispersione di energia EDS (spettrometria per dispersione di energia). L'analisi che viene prodotta può essere sia dell'area che in quel momento viene ingrandita, oppure, fermando la scansione del fascio elettronico, di un punto di interesse sulla superficie del campione (microanalisi). Dato che la porzione di spazio eccitata dal fascio elettronico, che produce lo spettro X, è un intorno del punto di pochi micron, il SEM+EDS è un potente mezzo di indagine su solidi chimicamente disomogenei a scala microscopica.

Per le analisi svolte in questo lavoro di tesi gli elettroni sono stati accelerati da una differenza di potenziale di 15 kV e il fascio primario presentava un'intensità di corrente di 200 pA. Poichè lo strumento lavora in vuoto continuo per evitare la dispersione degli elettroni e la contaminazione della sorgente per riuscire ad osservare i campioni che non sono conduttori, è stato necessario rivestirli tramite *sputtering* con un film conduttore in oro, attraverso un trattamento di *sputter-coating* (SC7640 Polaron) (Figura 2.2.12). Inoltre, per osservare la geometria delle pareti, ovvero la sezione trasversale dei microcanali, è stato necessario tagliare manualmente i campioni: dopo averli immersi in azoto liquido per infragilire il materiale, sono stati incisi con una punta di diamante e piegati tra due vetrini. L'analisi è quindi un'analisi distruttiva.

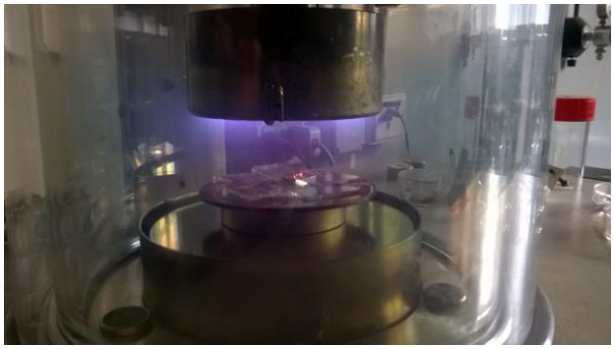


Figura 2.2.12: *Sputter coating* (SC7640 Polaron).

2.2.3.5 Colorazione Alcian Blue

L'Alcian Blue è un colorante carico positivamente (catione), che forma legami elettrostatici con alcuni polianioni tissutali legando o il gruppo carbossilico o solforico. Rappresenta un metodo per la dimostrazione di mucine acide (sostanze glicoproteica prodotta e secreta dagli epiteli ghiandolari delle mucose del tubo digerente, dell'apparato respiratorio e del tratto genito-urinario di molti mammiferi) e l'identificazione di specie cariche

negativamente, quali ad esempio i GAGs, come l'eparina. Il colorante è rame ftalocianina (Figura 2.2.13).

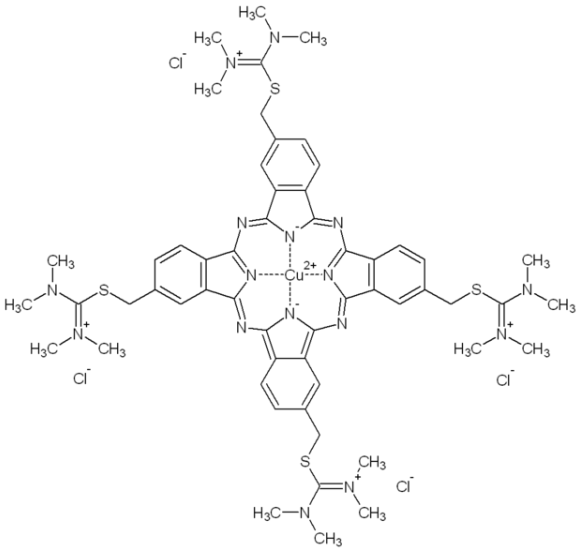


Figura 2.2.13: Molecola Alcian Blue

I campioni con eparina vengono sottoposti alla colorazione Alcian al fine di identificare la presenza della biomolecola. La soluzione di *staining* viene preparata sciogliendo la polvere di Alcian Blue (Sigma Aldrich) in una soluzione di acqua distillata a 5 mg/ml con etanolo al 25 % e acido acetico al 3%. Circa 200 µl di soluzione vengono utilizzati per ricoprire le aree dei campioni (Figura 2.2.14). Dopo 2 minuti i campioni vengono lavati con la soluzione di *destaining*, preparata con etanolo al 40% e acido acetico al 10% in acqua distillata. L'osservazione al microscopio ottico permette di valutare la presenza di eparina, che deve apparire in blu-azzurro.

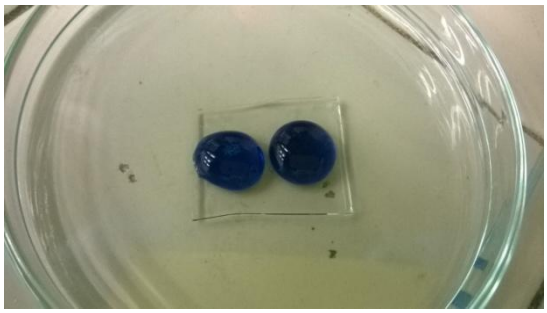


Figura 2.2.14: Campioni durante colorazione con soluzione di *staining* dell'Alcian Blue

2.3 Test cellulari

Test cellulari sono stati effettuati presso il Barcelona Center for International Health Research (CRESIB) sulle superfici funzionalizzate con *pattern* per valutare la selettività degli *arrays* di eparina nella cattura di globuli rossi infettati da malaria (pRBCs).

Campioni di forma rettangolare (20x10 mm^2) sono stati funzionalizzati con *arrays* di eparina ottenuti con la strategia del μ-CP e testati in condizioni statiche per verificare l'effettiva capacità selettiva di immobilizzazione di globuli rossi infettati dal *Plasmodium* della malaria da un campione di sangue costituito da eritrociti infetti e non infetti.

P.falciparum 3D7 sono stati coltivati in vitro utilizzando eritrociti umani appartenenti al gruppo B in condizioni stabilite in precedenza [65, 117, 118]. Brevemente, i parassiti (scongelati a *stocks* in glicerolo) vengono coltivati insieme ai globuli rossi in un incubatore (37°C, 5% CO2 e 3% 02) in un mezzo di coltura cellulare completo (Roswell Park Medium Institute-RPMI). Le colture sono state sincronizzate (Figura 2.3.1.a) e il medium è stato cambiato ogni due giorni per mantenere l'ematocrito al 3%.

Prima di testare i campioni, la parassitemia viene determinata attraverso la conta microscopica di strisci ematici trattati con colorazione di Giemsa, utilizzata al fine di distinguere componente nucleare e componente citoplasmatica del parassita. Seguendo il protocollo Giemsa, una goccia di 200 μl di sangue viene posta su un vetrino, fissata con metanolo e colorata per 10 minuti con Giemsa (Merck Chemicals, Germany) diluito 1:10 nel Sorenson's Buffer, a pH 7.2. Dopo aver lavato con acqua distillata e asciugato, la percentuale di globuli rossi infetti viene determinata con analisi al microscopio (Zeiss Primo Star). Il citoplasma del plasmodio si colora di blu chiaro, mentre il DNA appare rosso-porpora. Nel nostro caso la parassitemia rimane al di sotto del 5% delle forme mature di trofozoiti e schizonti. La soluzione cellulare, viene preparata come segue:

- un'aliquota di 3 ml di sangue (Figura 2.3.1.b) viene posta in una Falcon da 10 ml (Figura 2.3.1.c) e centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti, per separare il *pellet* dal medium di coltura.
- Il *pellet* viene rimosso e viene il precipitato viene risospeso due volte e centrifugato in PBS.
- il *pellet* viene diluito in PBS alla concentrazione desiderata.

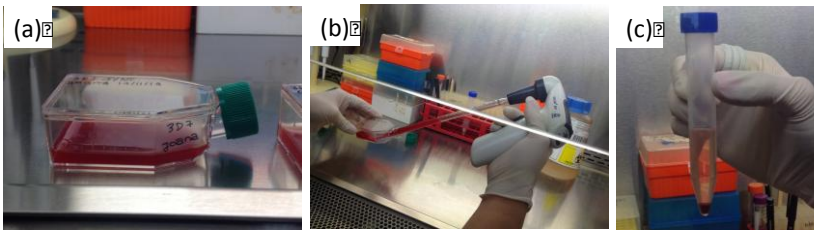


Figura 2.3.1: a) Petri contenenti globuli rossi infettati dal *P.falciparum* 3D7, parassita della malaria; b) aliquota di 3 ml della soluzione dei globuli rossi con eritrociti infetti prelevata dalla Petri e c) posta in una Falcon da 10 ml per lo *step* di lavaggio per la rimozione del medium di coltura.

I test statici sono stati effettuati ponendo 600 µl di soluzione su ogni *array* di eparina (Figura 2.3.2.a) e incubando a 37°C (Shake 'N' Stack, Thermo Hybaid) (Figura 2.3.2.b). Per prevenire l'asciugatura rapida della goccia, che potrebbe causare assorbimento aspecifico delle cellule, l'umidità della camera viene mantenuta costante ponendo un becker di acqua all'interno.

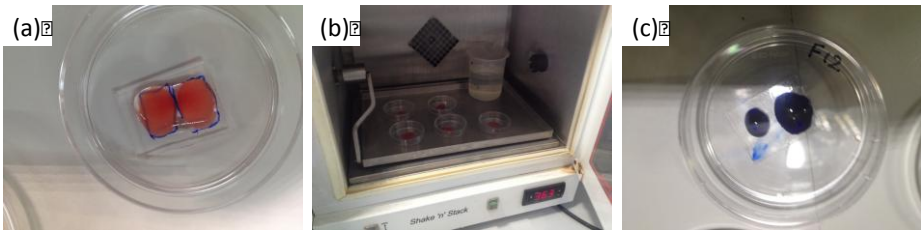


Figura 2.3.2: a) 600 µl di soluzione vengono posti sopra ogni *array*; b) incubazione dei campioni a 37°C per 1 h; c) Giemsa *staining* sui campioni trattati.

Dopo 1 h, gli *arrays* vengono lavati con PBS, asciugati e viene applicata la colorazione di Giemsa (Figura 2.3.2.c) per l'analisi colorimetrica. Immagini al microscopio ottico sono state ottenute.

2.4 Fabbricazione di microdispositivi fluidici in PFPE-DMAs

In questo lavoro di tesi sono stati realizzati primi prototipi di dispositivi microfluidici chiusi costituiti interamente da PFPE-DMAs. I dispositivi microfluidici sono generalmente composti da una rete di microcanali (*layer* a) e uno strato di copertura (*layer* b), che permette la chiusura del dispositivo (*sealing*), legati insieme in maniera reversibile o irreversibile (*bonding*) a seconda della loro futura applicazione.

Nel caso della specifica applicazione di questo lavoro di tesi, è stato pensato di realizzare un *pattern* di eparina sul *layer* b (schema in figura 2.4.1) per poter ottenere dispositivi microfluidici funzionalizzati per l'immobilizzazione selettiva di cellule *target* sul *pattern* presente all'interno del canale. La possibilità di eseguire i test cellulari in condizioni

dinamiche, flussando soluzioni attraverso il microcanale, permettono di evitare l'adesione cellulare aspecifica o di rimuovere eventuali proteine o cellule adese aspecificatamente sfruttando, le forze idrodinamiche del fluido in movimento.

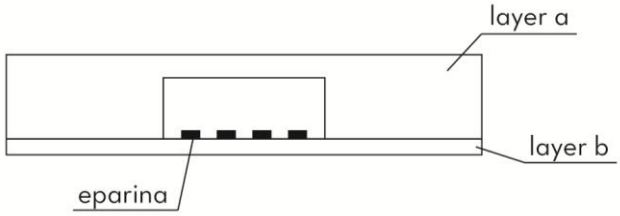


Figura 3.4.1: Dispositivo microfluidico con *pattern* di eparina su *layer* b.

Microcanali chiusi interamente realizzati in PFPE-DMAs sono stati ottenuti sfruttando due diversi metodi di fabbricazione come descritto nei paragrafi seguenti.

2.4.1 Metodi di fabbricazione

2.4.1.1 Fotolitografia

La fotolitografia (§2.2.2) è il primo metodo utilizzato per la fabbricazione di microcanali in PFPEs. Il protocollo prevede l'utilizzo non solo del blend come nel caso della procedura di *patterning*, ma anche del PFPE-DMA 2000, entrambi descritti nel paragrafo §2.1.2.

Il processo si può riassumere nei seguenti *steps* ed è schematizzato in figura 2.4.3:

- preparazione di uno strato in PFPE-DMA 2000 con Darocur al 4% w/v versandone 0,5 g su un vetrino di dimensioni 3,5x2,5 cm ed esposizione ai raggi UV per 25s, tempo di esposizione corrispondente a una percentuale di reticolazione di circa il 55 % (*layer* I).
- Preparazione di uno strato di PFPE-DMA 2000 (*layer* II) deposto sopra al *layer* I sottoposto a 1000 rpm per 50s tramite *spin-coater*: questo strato viene microstrutturato con il canale.
- Esposizione del *layer* II per 25 s (55% circa di conversione), filtrando la radiazione UV attraverso una fotomaschera in acetato disegnata con la geometria del canale di 1mm di larghezza (figura 2.4.2).
- Sviluppo del canale in acetone per rimuovere il materiale del *layer* II non fotoreticolato. Infine il sistema composto da *layer* I e II viene staccato dal vetrino.

In corrispondenza dell'inizio del canale viene realizzato un *inlet* tramite l'utilizzo di un punzone di diametro 1.35 mm.

- Realizzazione di un substrato di blend (*layer* III), tramite *spin coater (*1500 rpm per 30s), funzionalizzato con un *pattern* di fotobiotina sfruttando il processo di µ-CP descritto precedentemente in §2.2.1.
- *Bonding* tra il sistema costituito dal *layer* I e II con il *layer* III tramite esposizione agli UV dopo averli messi a contatto in maniera che il *pattern* risulti centrato rispetto alla larghezza del canale. L'esposizione agli UV per 10 minuti permette di completare la conversione dei *layers*.

Figura 2.4.2: Fotomaschera posizionata su un substrato di PFPE 2000 pronto ad essere esposto alla radiazione UV.

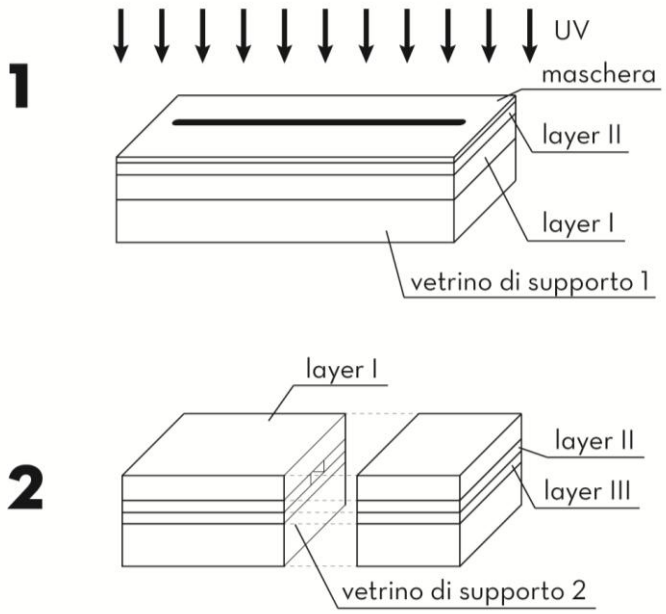


Figura 2.4.3: Schema riassuntivo dei *layers* che costituiscono il dispositivo ottenuto per fotolitografia.

Il *bonding* tra i due strati avviene secondo il seguente principio [119]: quando i tempi di esposizione non sono relativamente lunghi, il grado di reticolazione del polimero rimane basso, ciò significa che non tutti i doppi legami vengono convertiti. I gruppi residui, che rendono le superfici ancora reattive, vengono sfruttati per legare covalentemente due superfici con basso grado di reticolazione, semplicemente accoppiandole e riesponendole agli UV. L'interazione della radiazione ultravioletta con residui di fotoiniziatore permette la liberazione di radicali liberi che, reagendo con i gruppi vinilici residui, riavviano la reticolazione all'interfaccia tra i due *layers*, legandoli insieme.
I tempi di esposizione dei vari *layers* sono stati decisi in funzione dei dati ottenuti tramite DSC, che permettono di stimare la percentuale di conversione e di conseguenza di valutare la presenza di doppi legami C=C residui non reagiti, necessari per i vari *steps*.

2.4.1.2 *Soft*-litografia: Replica *Molding*

La tecnica *soft*-litografica di replica *molding* è stata già precedentemente descritta a proposito della realizzazione degli stampi in PDMS nel paragrafo §2.2.1. Essa può essere utilizzata come alternativa alla fotolitografia nella fabbricazione di microcanali, in questo caso le dimensioni di quest'ultimi risultano maggiori a causa dell'utilizzo di un *master* che presenta un canale centrale di 2,5 mm di larghezza.
Una soluzione di PFPE-DMA 2000 con fotoiniziatore viene colata sul *master* e successivamente esposto ai raggi UV per circa 15 minuti per ottenere la completa conversione del polimero.
Il protocollo prevede le seguenti fasi:

- versare PFPE-DMA 2000 con Darocur al 4% w/v sul il *master* (Figura 2.4.4) (*layer* 1).

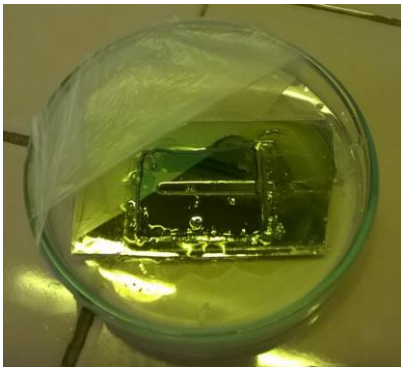


Figura 2.4.4: *Master* utilizzato per replica *molding* per la creazione di microcanali, è stata mantenuta una cornice di PFPE 2000 per ridurre lo spreco di materiali.

- Esporre alla radiazione UV nel bromografo per 60 s.
- Estrarre il *layer* 1 parzialmente reticolato.
- Ricavare un *inlet* tramite l'utilizzo di un punzone di diametro 1.35 mm.
- Parallelamente preparare un substrato in blend di PFPE (*layer* 2) sottoponendolo a 1500 rpm per 30 s con *spin coater*. Su questo strato viene realizzato un *pattern* di avidina coniugata con fluoresceina autoassemblato su uno di fotobiotina, come visto in precedenza nel paragrafo §2.1.2.
- Porre i due *layers* a contatto ed esporre per 10 minuti nel bromografo per ottenere il *bonding.*

Uno schema riassuntivo è mostrato in figura 2.4.5.

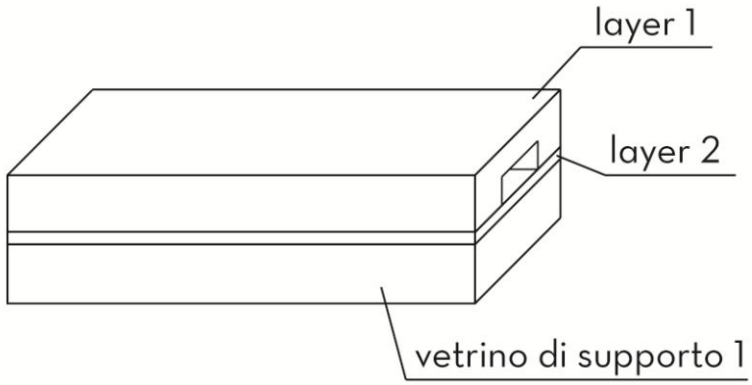


Figura 2.4.5: Schema riassuntivo dei *layers* che costituiscono il dispositivo ottenuto per replica *molding*.

2.4.2 Caratterizzazione dei microcanali

2.4.2.1 Prove di *leakage*

Al fine di valutare la pervietà dei microcanali realizzati e l'effettivo *bonding* tra i *layers*, si è utilizzato un dispositivo, un *holder* in PMMA costituito da:

- una base di appoggio per il microcanale di dimensioni (3x4 cm), maggiori rispetto a esso, avente alle estremità quattro fori filettati. Nella figura 2.4.6, la base presenta solo i fori per l'alloggiamento del *reservoir* in PMMA in corrispondenza dell'*inlet*;
- due barrette con fori centrali di diversi diametri (2.5 mm, 3.3 mm e 5 mm) che costituiscono i *reservoirs* e due fori laterali distanziati in maniera tale da accoppiarsi con i fori filettati della base;
- due viti per bloccare le barrette alla base.

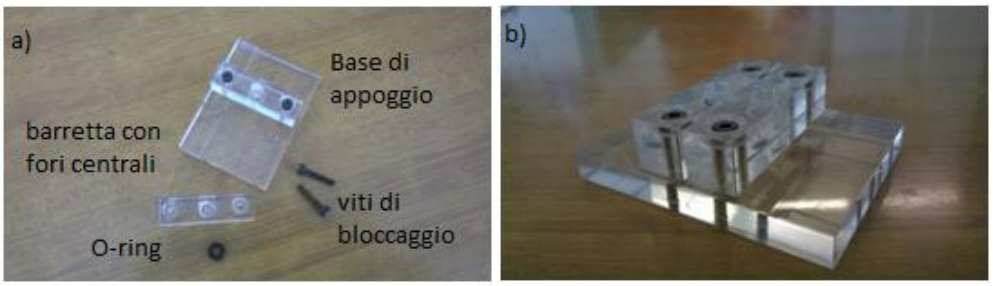


Figure 2.4.6: a) e b) *Holder* con componenti utilizzato per controllare la pervietà dei canali ottenuti sia per replica *molding* sia per fotolitografia.

Il microcanale è stato posizionato sulla base di appoggio, e sopra sono state adagiate le barrette con i *reservoirs* in corrispondenza dei fori. Il sistema è stato bloccato serrando le viti. Una siringa (Figura 2.4.7) con il liquido all'interno viene posta in corrispondenza del foro centrale e il liquido viene spinto all'interno del microcanale manualmente.

Figura 2.4.7: Dispositivo per prove di *leakage* con inserita una siringa per spingere il fluido all'interno dei microcanali.

Si è deciso di iniettare la fluoresceina al fine di ottenere un risultato immediato visibile a occhio nudo, che permettesse di valutare macroscopicamente la pervietà del canale.

2.4.2.2 Analisi al microscopio

I microcanali sono stati osservati attraverso il microscopio a contrasto di fase (§2.2.3.1) che ha permesso di valutare le dimensioni delle sezioni trasversali, la morfologia delle superfici e, dove presenti, i *patterns*, e al SEM, descritto nel paragrafo §2.2.3.4, in modo analogo ai substrati in PFPE con *arrays* di eparina metacrilata. Poiché, anche in questo caso, i microcanali in PFPEs non sono conduttori, è stato necessario rivestirli tramite *sputtering* con un film conduttore in oro. Inoltre, per osservare la geometria delle pareti,

ovvero la sezione trasversale dei microcanali, è stato necessario tagliare manualmente i campioni: dopo averli immersi in azoto liquido per rendere più fragile il materiale, sono stati incisi con una punta di diamante e piegati tra due vetrini.

2.4.3 Superfici di PFPE-DMAs microstrutturate

La tecnica di replica *molding* (§2.2.1) può essere sfruttata per la realizzazione di superfici microstrutturate con PFPE-DMAs.

Quest'ultimi possono essere centrati rispetto alla larghezza dei microcanali per ottenere un dispositivo microfluidico. Funzionalizzando la superficie delle microstrutture con biomolecole e inserendole all'interno di un canale microfluidico si può favorire l'interazione con le cellule *target* presenti nella soluzione iniettata nel dispositivo e permettere, quindi, una maggiore immobilizzazione selettiva.

La procedura prevede i seguenti passaggi:

- colare il blend (0,4g) su di un *master* di 1x1 cm in silicio in modo da ottenere uno spessore di 200 µm.
- Esporre nel bromografo in atmosfera inerte per 3 minuti. A questo punto il grado di reticolazione del polimero è tale che è possibile rimuovere lo strato e proseguire nella funzionalizzazione.
- Trattamento al plasma (§2.2.1), 150 W per 60 s, del substrato microstrutturato per favorire il legame con la fotobiotina.
- Porre una goccia di soluzione di fotobiotina (§2.2.1) su un vetrino di dimensioni 1x1 cm e lasciare asciugare.
- Utilizzare il vetrino ottenuto come stampo per trasferire la biomolecola al substrato, sul quale viene poggiato e mantenuto durante l'esposizione ai raggi UV per 10 minuti nel bromografo.
- Esporre il campione per 20 minuti senza vetrino.
- Procedere infine all'incubazione con avidina coniugata con fluoresceina per 1 h nel caso del campione di controllo, o all'incubazione con neutravidina per 1 h e successivamente con eparina biotinilata per 24 h (§2.2.1).

I substrati microstrutturati vengono caratterizzati tramite microscopio a contrasto di fase, microscopio a fluorescenza, analisi SEM e con colorazione per l'individuazione degli *arrays* di eparina.

Capitolo 3: Risultati e Discussione

Il principale obiettivo del capitolo seguente è la discussione dei risultati ottenuti in merito alla caratterizzazione dei materiali utilizzati in questo lavoro di tesi, i PFPE-DMAs e in particolare il blend, e la valutazione delle tecnologie di *patterning*, ottimizzate per funzionalizzare selettivamente substrati di blend con *arrays* di eparina. Infine vengono mostrati i risultati derivanti da primi tentativi di fabbricazione di microcanali, atti ad essere integrati in dispositivi microfluidici per la valutazione dei *microarrays* in condizioni dinamiche. Fondamentale per il nostro scopo, è risultata essere l'analisi della cinetica di reticolazione (§3.1.1) dei PFPEs e delle loro proprietà fisiche (§3.1.2.1), meccaniche (§3.1.2.2) e superficiali (§3.1.2.3). Nel paragrafo §3.2 viene illustrata la caratterizzazione dei *patterns* di eparina ottenuti tramite *micro-contact printing* (§3.2.1) e tramite fotolitografia (§3.2.2), confermando l'efficacia di queste tecnologie di *patterning* per la realizzazione di *microarrays* di eparina di differenti geometrie su substrati in blend. L'effettiva capacità di *sorting* dei *patterns* nei confronti di globuli rossi infetti viene validata da test cellulari statici, riportati in §3.3. Infine, in §3.4, vengono riportati risultati relativi alla fabbricazione di dispositivi microfluidici interamente realizzati in PFPE.

3.1. Sintesi e caratterizzazione dei substrati

3.1.1 Cinetica di reticolazione

3.1.1.1 Calorimetria differenziale a scansione - DSC

Lo studio della cinetica di reticolazione è importante per controllare la percentuale di conversione del polimero, parametro strettamente necessario per la realizzazione di *patterns* di biomolecole legate covalentemente al substrato. La spettroscopia FTIR viene spesso utilizzata a questo scopo, monitorando la progressiva attenuazione e scomparsa della banda a 1630 cm^{-1} corrispondente ai legami C=C; tuttavia, nel nostro caso, il metodo spettroscopico non risulta adatto a causa dell'elevato spessore dei campioni, che non permette la trasmissione dello spettro. Per questo motivo, come spiegato in §2.1.3.2, per studiare la cinetica di reticolazione viene utilizzata la calorimetria a scansione differenziale (DSC), durante la quale il campione viene sottoposto a una scansione in temperatura. Il risultato dell'analisi è un picco esotermico la cui area sottostante è associata all'entalpia residua di polimerizzazione radicalica, indotta termicamente. Maggiore è l'area sottesa dal picco, maggiore è la frazione di polimero reticolata termicamente. In altre

parole, un maggiore picco esotermico corrisponde a una minore frazione del polimero reticolata tramite precedente esposizione ai raggi UV.

Nel grafico 3.1.1 vengono riportati i picchi esotermici relativi al blend con Darocur all'1%.

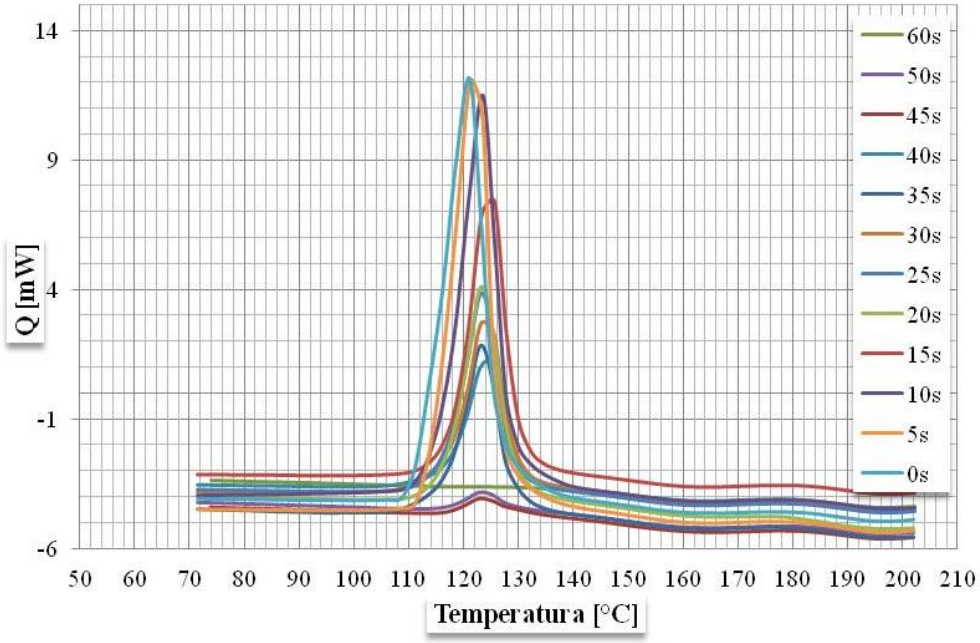


Grafico 3.1.1: Picchi esotermici ottenuti tramite DSC attraverso l'analisi di campioni di blend esposti alla luce UV per differenti intervalli di tempo. Aumentando il tempo di esposizione diminuisce l'area sottesa dal picco.

Dal grafico 3.1.1 riportato, è possibile notare come il picco esotermico maggiore sia relativo al campione totalmente reticolato dall'iniziatore termico, ovvero non esposto ai raggi UV (campione a 0s). Quest'ultimo funge da riferimento per il calcolo della percentuale di conversione. L'entalpia residua decresce man mano che il tempo di irraggiamento aumenta. Se il tempo di irraggiamento è maggiore, una frazione sempre minore di doppi legami ancora non reagiti reticolano termicamente durante l'analisi. Dall'area sottesa dal picco, è possibile dunque ricavare la percentuale di conversione del polimero tramite l'equazione 3.1.1.

$$\% \text{ Conversione} = \frac{\Delta H_{tot} - \Delta H_{res}}{\Delta H_{tot}} \qquad (3.1.1)$$

I dati ottenuti sono riportati in tabella 3.1.1.

Tabella 3.1.1: Percentuale di conversione del polimero e area di picco normalizzata per campioni a differente tempo di esposizione ottenuta tramite DSC.

Tempo di esposizione [s]	Area di picco normalizzata [J/g]	Conversione [%]
0	38,3	0
5	34,93	8,79
10	33,59	12,29
15	23,17	39,50
20	17,83	53,45
25	16,45	57,05
30	15,45	59,66
35	14,28	62,72
40	12,48	67,42
45	1,59	95,85
50	1,61	95,79
60	0	100

I dati precedentemente ottenuti vengono utilizzati per ricavare la curva di conversione riportata nel grafico 3.1.2:

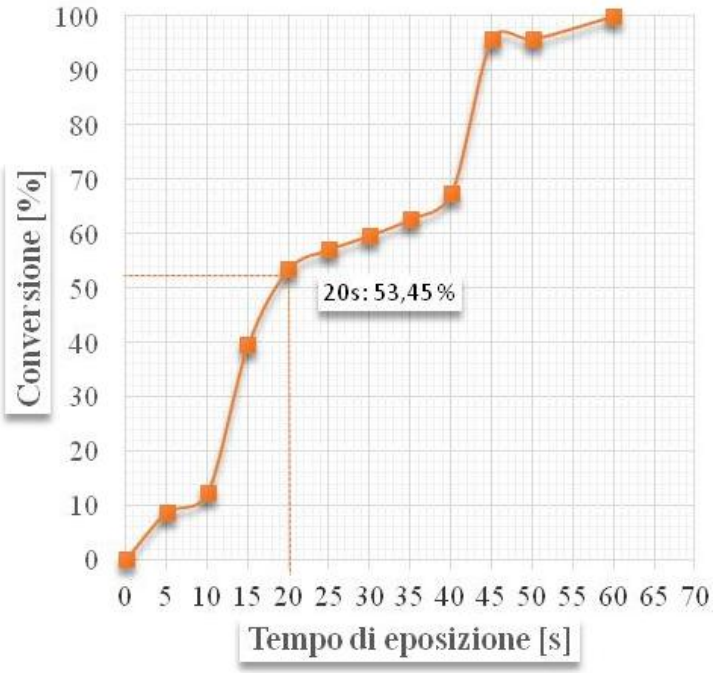


Grafico 3.1.2: Curva di conversione del blend in funzione del tempo di esposizione ai raggi UV. A 60s viene raggiunto il 100% di conversione.

Si nota come dopo 60s di esposizione ai raggi UV si raggiunge il 100% di conversione.

Per la realizzazione di *patterns* biomolecolari, vengono preparati substrati esposti ai raggi

UV per 20s che, secondo la curva ottenuta dall'analisi DSC, corrisponde ad una conversione di circa il 53%. Il polimero parzialmente reticolato presenta doppi legami non reagiti e disponibili per gli *steps* successivi. Infatti questi legami possono reagire con biomolecole funzionalizzate con gruppi fotoreattivi, come la fotobiotina (§1.2.2.1) e l'eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici (§1.2.2.3).

La curva di conversione ottenuta per il blend è stata confrontata con quelle ottenute per i suoi due componenti, PFPE-DMA 2000 Dar 4% e PFPE 4000-DMA Dar 1%, ottenute con lo stesso procedimento (grafico 3.1.3).

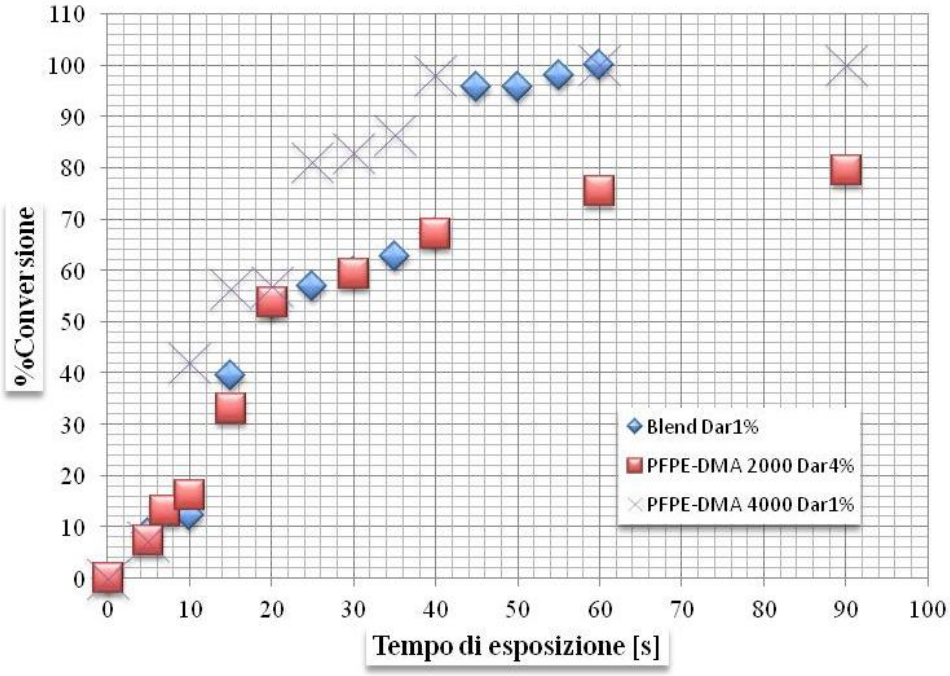


Grafico 3.1.3: Confronto tra le % di conversione in funzione del tempo di esposizione di blend, PFPE-DMA 2000 e PFPE-DMA 4000. Si nota come il PFPE-DMA 2000 non raggiunga il 100% di conversione dopo 100s di esposizione.

Dal grafico 3.1.3 emerge come il comportamento del blend risulti intermedio tra il PFPE-DMA 4000 e il PFPE-DMA 2000. Quest'ultimo, a differenza del PFPE-DMA 4000 che risulta completamente reticolato dopo 40s, non raggiunge il 100% di conversione anche dopo 100s di esposizione. Tale comportamento è riconducibile al fatto che, durante la reticolazione il polimero subisce alcune modifiche fisiche, passando da liquido viscoso a gomma viscoelastica e, eventualmente, a solido vetroso. Questi cambiamenti possono comportare variazioni di mobilità delle specie reattive, e modificare la velocità di propagazione della polimerizzazione all'interno del materiale.

3.1.1.2 Fotocalorimetria - DSC-UV

La cinetica di reticolazione è stata caratterizzata anche tramite fotocalorimetria (DSC-UV). Si riportano nel grafico 3.1.4 i picchi esotermici ottenuti dall'analisi relativa al blend.

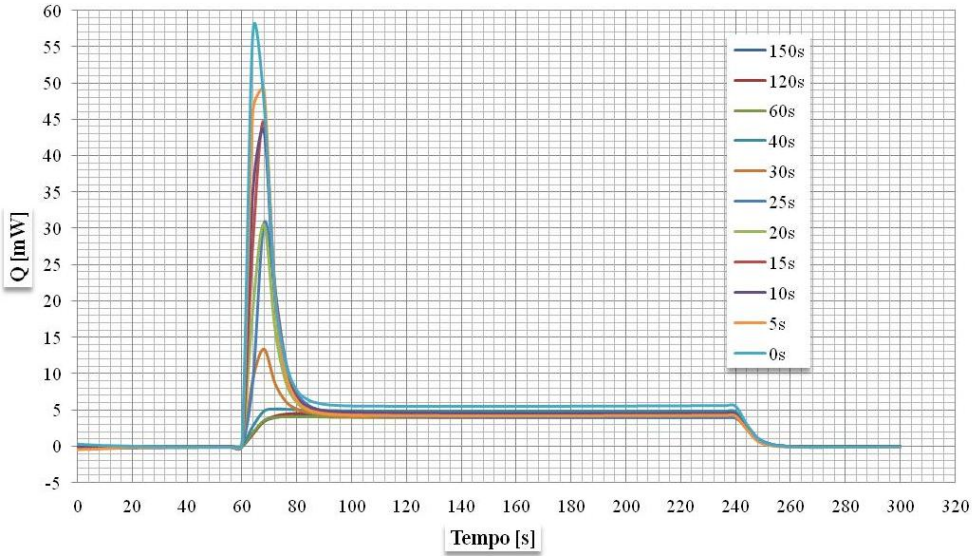


Grafico 3.1.4: Picchi di esotermia ottenuti per il blend tramite analisi di fotocalorimetria. Si nota come il picco esotermico maggiore sia relativo al campione non esposto ai raggi UV nel bromografo, ma completamente reticolato dalla sorgente UV presente nel calorimetro.

Sfruttando l'equazione per la conversione 3.1.1, utilizzata per l'analisi dei dati della DSC, sono state calcolate le percentuali di conversione e le relative curve, riportate nella tabella e nel grafico seguente.

Tabella 3.1.2: % di conversione e area di picco in funzione del tempo di esposizione relativi al blend ottenuti tramite DSC-UV.

Tempo di esposizione [s]	Area di picco normalizzata [J/g]	Conversione [%]
0	38,23	0
5	38,06	0,44
10	32,15	15,90
15	27,96	26,86
20	21,29	44,31
25	17,77	53,52
30	9,09	76,22
40	2,39	93,75
60	0	100
120	0	100
150	0	100

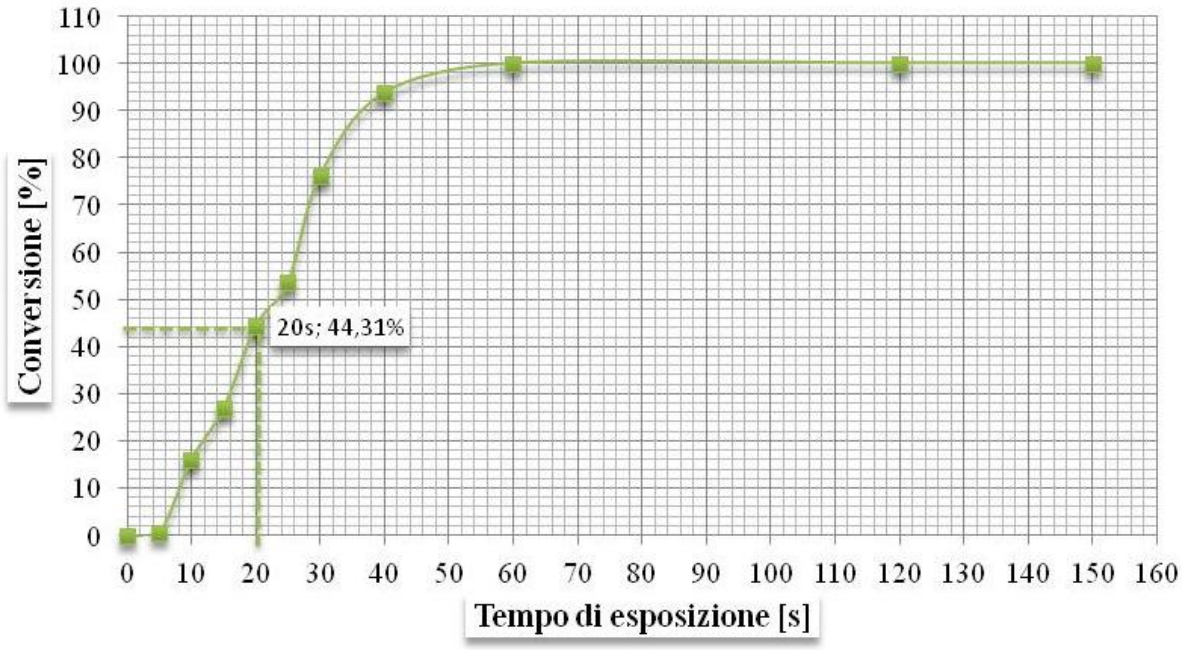


Grafico 3.1.5: Curva di conversione in funzione del tempo di esposizione relativa al blend Dar 1%. Come è possibile notare il 100% di conversione viene raggiunto a 60s, in accordo con quanto rilevato tramite DSC.

Come mostrato in tabella 3.1.2 e dal relativo grafico 3.1.5, il 100% di conversione viene raggiunto con un tempo di esposizione di 60s, in accordo con i dati ottenuti con l'analisi DSC. Dopo 20s di esposizione, la percentuale di conversione del polimero risulta del 44,31%, percentuale di poco inferiore al valore riportato dalla DSC. Dai dati ottenuti tramite l'analisi DSC-UV, quindi, il substrato esposto per 20s ai raggi UV presenta doppi legami non reagiti che possono essere sfruttati per realizzare *patterns* biomolecolari, in accordo ai dati ottenuti tramite DSC.

In aggiunta, si è effettuato un confronto tra i dati ottenuti analizzando tramite DSC-UV un campione sottile ("*thin*") e uno massivo ("*thick*") (grafico 3.1.6). Mentre i campioni *thin* presentano il 100% di conversione già dopo 20s di esposizione, i campioni massivi raggiungono il 100% di conversione dopo 60s. Tale differenza dipende dal fatto che col procedere della reazione di reticolazione, le modifiche fisiche avvengano dapprima nei *layers* superficiali, e procedono poi verso gli strati più profondi del campione. I *layers* superficiali già reticolati, schermano i raggi UV che non penetrano nei *layers* più interni non permettendo la completa conversione del polimero. Inoltre l'intensità della luce UV decresce lungo lo spessore del campione.

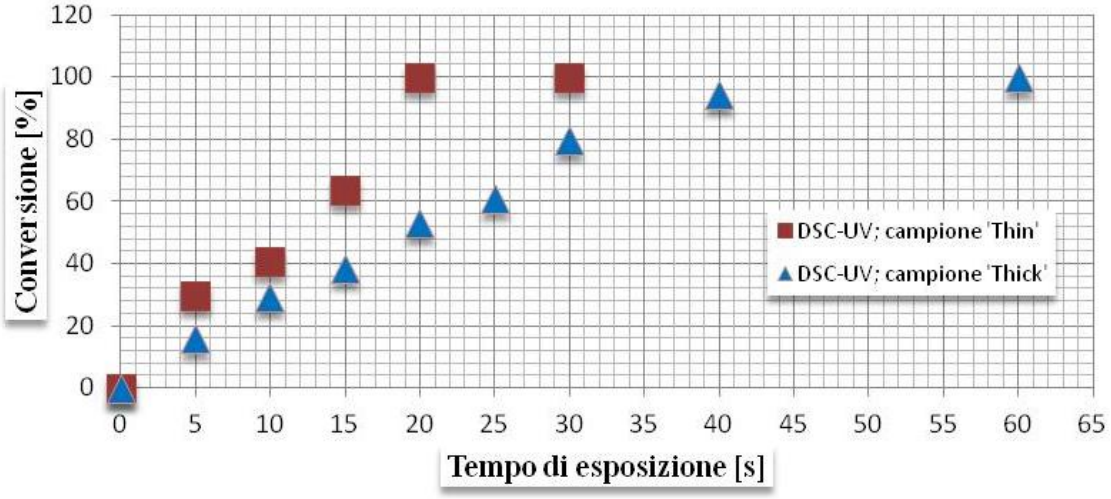


Grafico 3.1.6: Confronto dei valori di conversione ottenuti tramite DSC-UV per campioni *thick* e per campioni *thin*. Questi ultimi raggiungono il 100% di conversione già dopo 20s di esposizione, mentre i campioni *thick* mostrano una totale reticolazione dopo 60s.

3.1.2 Proprietà dei materiali

3.1.2.1 Temperature di transizione termica

I PFPE-DMAs sono generalmente caratterizzati da due temperature di transizione vetrosa (T_g), una relativa alla parte del fluorocarbonio e una relativa ai gruppi idrocarburici, derivanti dalla polimerizzazione dei gruppi metacrilici terminali del polimero [89].

La curva ottenuta tramite analisi DSC di un campione di blend totalmente reticolato viene riportata nel grafico 3.1.7, nel quale si riscontra la presenza di una sola temperatura di transizione vetrosa (T_g), relativa alla parte del fluorocarbonio. Per l'individuazione della seconda T_g è stata utilizzata l'analisi dinamico meccanica (§3.1.2.2) in quanto la bassa sensibilità dello strumento DSC non ne permette l'identificazione. Il valore di T_g relativo al blend è di -111°C (grafico 3.1.7), intermedio rispetto ai valori ottenuti per il PFPE-DMA 2000 (-110°C), e per il PFPE-DMA 4000 (-116,7°C).

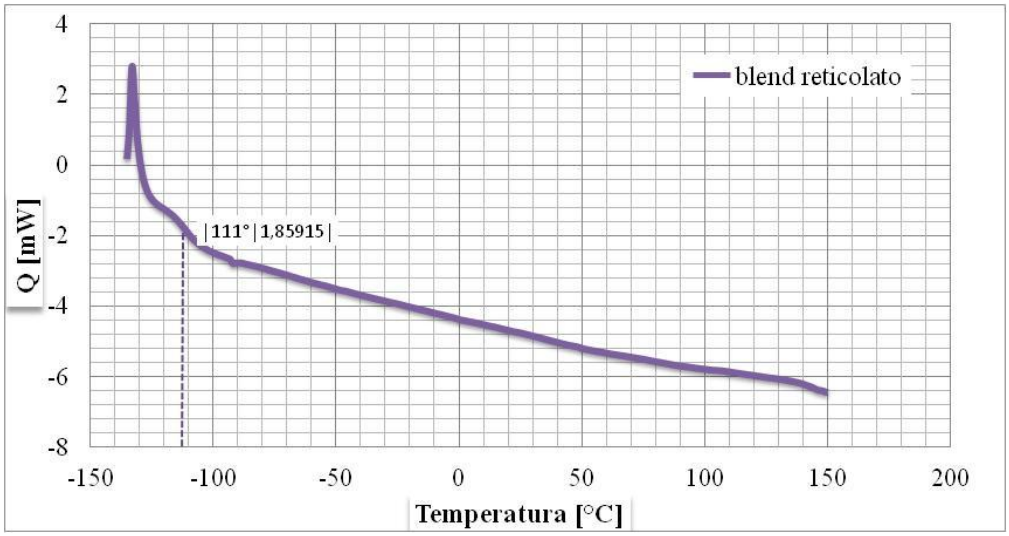


Grafico 3.1.7: Curva ottenuta tramite analisi DSC del blend

La differenza registrata tra le T_g dei due PFPE-DMAs e del loro blend può essere attribuita al loro differente peso molecolare. In particolare il PFPE-DMA 4000 con il maggiore peso molecolare mostra una minore temperatura di transizione, indice di una maggiore mobilità delle catene.

3.1.2.2 Analisi dinamico-meccanica - DMA

L'analisi dinamico-meccanica (DMA) permette lo studio delle componenti conservativa (G') e dissipativa (G") dello *shear modulus* del PFPE. Le curve vengono registrate come funzione dell'ampiezza d'oscillazione a frequenza e temperatura costante. Vengono effettuate due prove a due differenti temperature, una a 60°C, una a 25°C, valori di temperatura ai quali i PFPE-DMAs presentano il *plateau* gommoso [121], ovvero il materiale possiede un'elasticità governata dalla sola componente entropica. Allo stato gommoso, il valore di G' viene associato alla densità di reticolazione del polimero, secondo l'equazione 3.1.2:

$$G'=\alpha RT \qquad (3.1.2)$$

in cui G' è la componente conservativa del modulo [MPa], α è la densità di reticolazione [mol/cm^3], T la temperatura assoluta in [K] e R la costante dei gas espressa in [J/(mol*K)]. Per i materiali elastomerici G' è direttamente proporzionale alla temperatura, come descritto dall'equazione 3.1.2.

L'andamento di G' in funzione dell'ampiezza di oscillazione è riportato nel grafico 3.1.8.

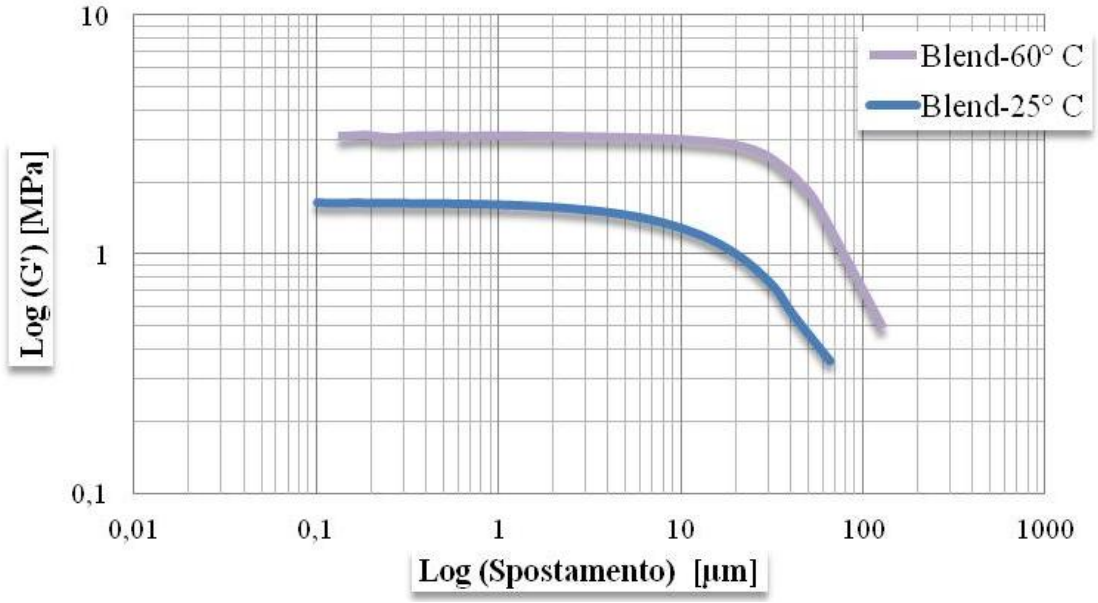


Grafico 3.1.8: Componente conservativa del modulo a temperatura costante di 60°C e di 25°C per campioni in blend con tempo di esposizione di 10 minuti.

Come si può notare dal grafico, i valori di G' sono maggiori per il test effettuato a 60°C, a causa della temperatura più elevata, in accordo con l'equazione 3.1.2.

Come è possibile osservare dai dati in tabella 3.1.3, il PFPE-DMA 4000 presenta modulo elastico minore, caratteristica che influisce sul suo ottimo comportamento *antifouling* (§1.3.1). Il blend presenta caratteristiche intermedie tra i due PFPEs.

Tabella 3.1.3: Confronto tra le componenti elastiche (G') e i moduli elastici (E) ottenuti per il blend, il PFPE-DMA 2000 e PFPE-DMA 4000.

Materiale	G' [MPa]	E [MPa]
Blend	2.99	8.97
PFPE-DMA 2000	5.9	17.7
PFPE-DMA 4000	0.28	0.84

Nel grafico 3.1.9 è riportato l'andamento di G' e G'' in funzione della temperatura. La DMA permette inoltre di valutare la seconda temperatura di transizione vetrosa non osservabile con la DSC. Come mostrato nel grafico 3.1.10 la T_g relativa alla parte uretano-metacrilica

si attesta approssimativamente a 15°C dove ha un picco tanδ (= $\frac{E''}{E'}$, *phase angle*).

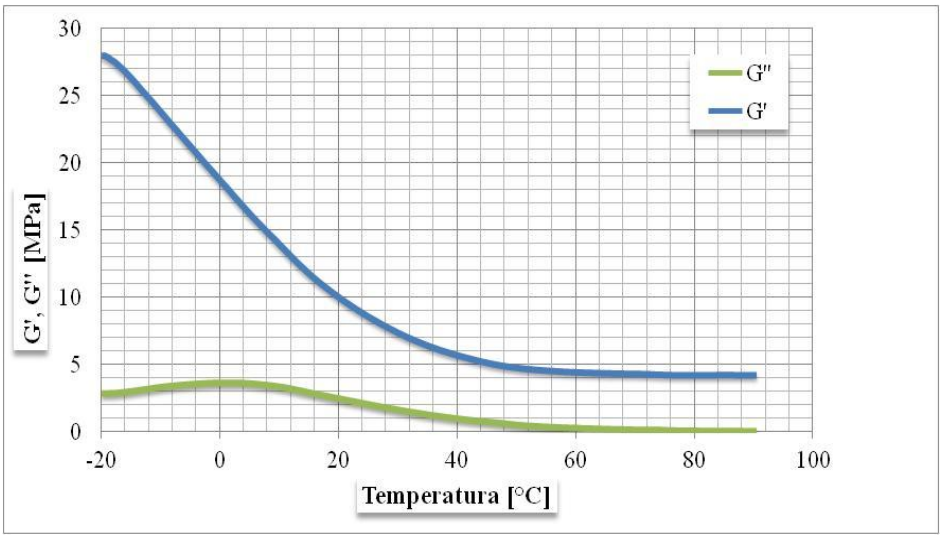


Grafico 3.1.9: G' e G'' in funzione della temperatura del blend

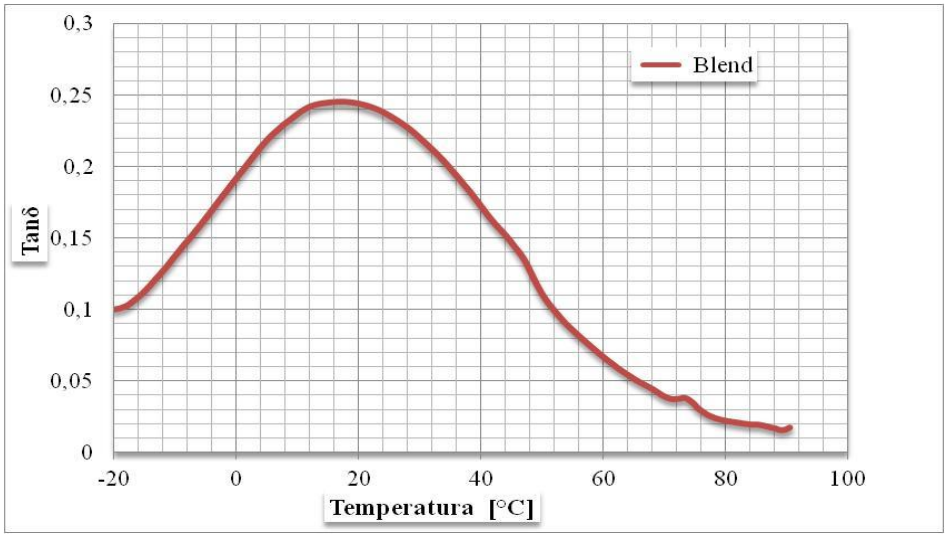


Grafico 3.1.10: Tanδ in funzione della temperatura del blend. La seconda temperatura di transizione vetrosa viene individuata a circa 15°C.

Le curve della DMA mostrano un *plateau* a 60°C, corrispondente al *plateau* gommoso del materiale.

3.1.2.3 Angolo di contatto ed energia superficiale

Le proprietà di superficie sono fondamentali per le applicazioni oggetto di questo lavoro. La loro importanza può essere attribuita a due fattori: in primo luogo, le interazioni con le biomolecole dipendono fortemente dall'energia superficiale; in secondo luogo, le

caratteristiche della superficie sono predominanti a livello dei microsistemi.

L'energia superficiale viene calcolata misurando l'angolo di contatto statico usando come liquidi sonda prima l'acqua poi il diiodometano. I valori medi sono calcolati su sei misure effettuate su ogni campione. In tabella 3.1.4 vengono indicati i dati ottenuti con le misure di angolo di contatto statico con acqua.

Tabella 3.1.4: Misure di angoli di contatto statico con acqua.

Materiale	Valore medio [°]	Deviazione standard
PFPE-DMA 2000	113	0,8
PFPE-DMA 4000	114	1
Blend	111	1,8

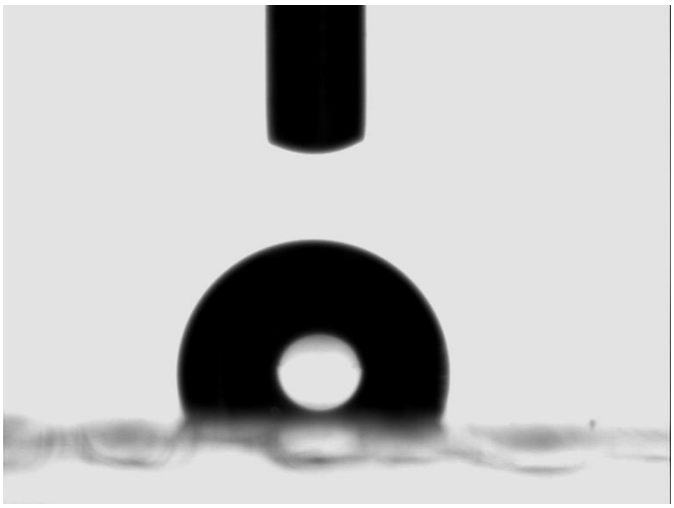


Figura 3.1.1: Profilo di una goccia di acqua depositata su un substrato di blend.

I risultati indicano che tutte le superfici in PFPE-DMA sono idrofobiche, con angoli di contatto con l'acqua maggiori di 90°. Non risultano sostanziali differenze tra i diversi PFPE-DMAs, le misure sono comprese tra i 111 e i 113°.

Per facilitare la realizzazione di un *pattern* di biomolecole sul substrato in PFPE tramite *micro-contact printing*, si potrebbe rendere la superficie maggiormente idrofilica, questa modifica permetterebbe un trasferimento più efficace della biomolecola dallo stampo in PDMS al substrato (§1.2.1.2). A questo scopo si è valutato se un trattamento al plasma potesse aumentare la bagnabilità delle superfici del blend, bagnabilità che è stata studiata tramite misure di angolo di contatto statico con acqua. I valori ottenuti sono riportati in tabella 3.1.5.

Tabella 3.1.5: Misure di angoli di contatto statico con acqua su substrato di blend prima e dopo il trattamento al plasma.

Condizioni	**Blend [°]**
$\boldsymbol{t_{exp}}$ **= 20s**	105 ± 17.7
$\boldsymbol{t_{exp}}$ **= 20s – 150W 60s**	90 ± 6.4
$\boldsymbol{t_{exp}}$ **= 5 min**	111 ± 1.8
$\boldsymbol{t_{exp}}$ **= 5 min – 150W 60s**	65 ± 0.6

Emerge dunque una differenza non significativa tra angoli di contatto statico nel caso del substrato in blend reticolato 20s plasmato (150W per 60s) e substrato realizzato alle stesse condizioni, ma non plasmato. Le condizioni di reticolazione indicate sono quelle relative al substrato utilizzato per la realizzazione del *pattern* biomolecolare. Alla luce dei dati analizzati, si è deciso di non plasmare i substrati, anche perché il trattamento al plasma comporta l'eliminazione dei doppi legami residui presenti sulla superficie, necessari al *grafting* delle biomolecole al substrato.

A partire dalle misure di angolo di contatto statico con acqua e con diiodometano, sono state calcolate le energie superficiali (SFT), riportate in tabella 3.1.6 con le relative componenti polari e dispersive. I valori vengono stimati con il metodo di Wu, metodo che permette di discriminare tra le due componenti. Viene utilizzata l'equazione 3.1.3 per il calcolo della tensione all'interfaccia γ_{sl}:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{sv} + \gamma_{lv} - \frac{4\,\gamma_{sv}^{d}\,\gamma_{lv}^{d}}{\gamma_{sv}^{d} + \gamma_{lv}^{d}} - \frac{4\,\gamma_{sv}^{p}\,\gamma_{lv}^{p}}{\gamma_{sv}^{p} + \gamma_{lv}^{p}} \qquad (3.1.3)$$

nella quale i termini *sv* e *lv* si riferiscono al solido e al liquido utilizzato per testarlo, i termini *d* e *p* indicano le componenti dispersiva e polare della tensione superficiale, di conseguenza $\gamma_{sv} = \gamma_{sv}^{s} + \gamma_{sv}^{p}$.

Tabella 3.1.6: Valori di tensione superficiale e loro componenti calcolate con il metodo di Wu ottenuti per i vari PFPE-DMAs.

Materiale	SFT polare [mN/m]	SFT dispersiva [mN/m]	SFT totale [mN/m]
PFPE-DMA2000	3.7	11.13	14.83
[%]	24.0	76.0	
PFPE-DMA 4000	3.18	12.32	15.5
[%]	20.0	80.0	
Blend	3.78	12.11	15.89
[%]	23	77	

E' evidente che per i PFPE-DMAs la componente dispersiva, associata alla catena di fluorocarbonio, risulta predominante rispetto alla parte polare, relativa ai gruppi uretani. Questo è dovuto al fatto che la frazione dei gruppi uretani è minore rispetto a quella relativa ai fluorocarboni.

L'energia superficiale totale è stata calcolata anche con il metodo dell'equazione di stato (EOS - *Equation Of State*), che non permette però di distinguere le due componenti. I dati sono riportati in tabella 3.1.7.

Tabella 3.1.7: Tensioni superficiali determinate con il metodo EOS.

Materiale	SFT totale [mN/m]
PFPE-DMA 2000	14.26
PFPE-DMA 4000	14.93
Blend	15.38

I dati ottenuti sono lievemente inferiori, ma non divergono da quelli ottenuti col metodo di Wu, né si osservano sostanziali differenze tra i tre materiali. I bassi valori di energia superficiale ottenuti garantiscono proprietà *antifouling* in linea con quanto riportato in §1.3.1.

In seguito sono state effettuate anche misure di angolo di contatto dinamico per la stima dell'angolo avanzante (θ_a) e recedente (θ_r) e per valutare l'isteresi superficiale $\Delta\theta$, dovuta a

un'eventuale riorganizzazione dei gruppi funzionali superficiali all'interfaccia liquido-solido. L'isteresi viene definita come la differenza tra θ_a e θ_r, ed è dovuta all'eterogeneità chimica della superficie [122]. In particolare, θ_a è maggiormente influenzato dai domini idrofobici o a bassa energia, mentre θ_r dalle zone polari e idrofiliche [123]. I risultati delle misure dinamiche sono riportati in tabella 3.1.8.

Tabella 3.1.8: Valori di angoli di contatto dinamici e relativa isteresi per le superfici in PFPEs.

	PFPE-DMA 2000	**PFPE-DMA 4000**	**Blend**
	Angolo di contatto ± DS [°]	Angolo di contatto ± DS [°]	Angolo di contatto ± DS [°]
$\boldsymbol{\theta_a}$	115,41±0.38	101,5±1,9	112,67±0,22
$\boldsymbol{\theta_r}$	92,34±0,42	66,0±4,03	81,52 ±0,24
$\boldsymbol{\Delta\theta}$	23,07±0,12	35,49±2,27	31,14 ±0.43

Tutte le superfici di PFPE-DMA presentano isteresi. I grafici 3.1.11-3.1.13 riportano il cambiamento dell'isteresi nel tempo. Esso è indice del riarrangiamento dei gruppi funzionali in superficie e all'interfaccia solido-liquido [124]. θ_a e θ_r risultano abbastanza costanti nel tempo per i PFPE-DMAs, rivelando un comportamento puramente termodinamico. La riorganizzazione superficiale può essere attribuita in questo caso ai gruppi uretani polari. Il blend mostra anche in questo caso un comportamento medio tra il PFPE-DMA 4000 e il PFPE-DMA 2000 confermando le sue proprietà intermedie tra i due materiali. Il fenomeno di riarrangiamento è maggiore nel caso del PFPE-DMA 4000, per questo motivo si osserva una maggiore isteresi dell'angolo di contatto; infatti il più alto peso molecolare comporta una minore densità di reticolazione e dunque una maggiore mobilità delle catene, favorendo il riarrangiamento.

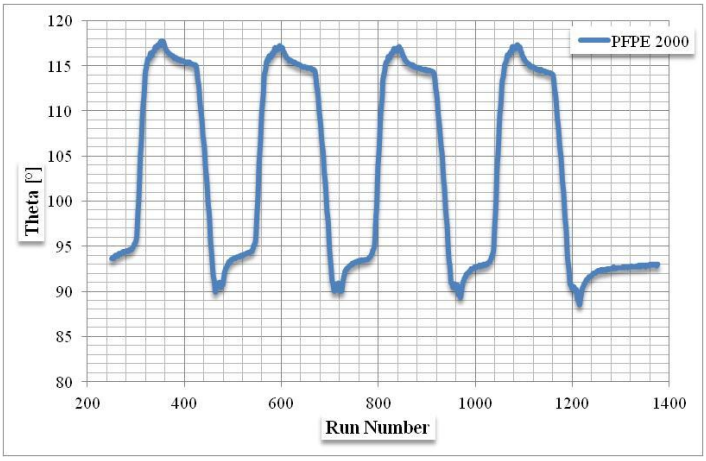


Grafico 3.1.11: Andamento dell'isteresi nel tempo relativa al PFPE 2000.

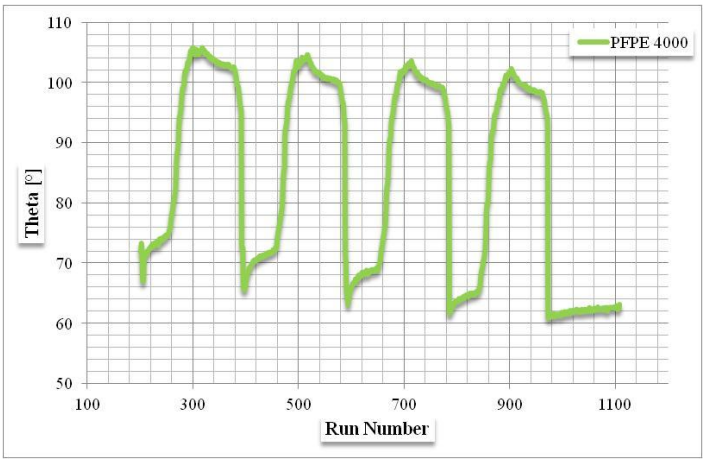


Grafico 3.1.12: Andamento dell'isteresi nel tempo relativa a PFPE 4000.

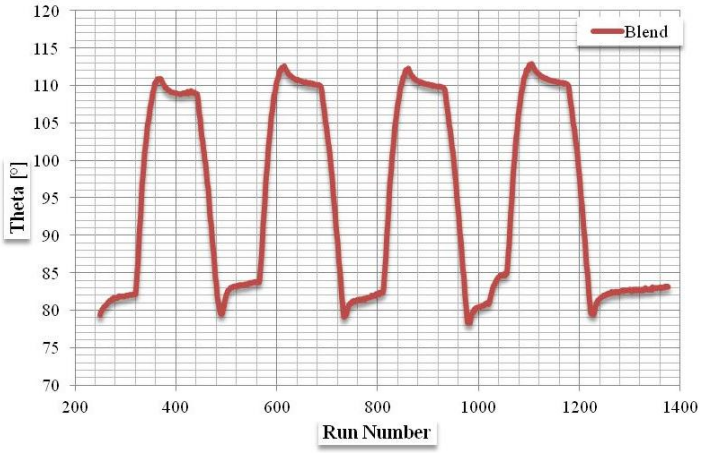


Grafico 3.1.13: Andamento dell'isteresi nel tempo relativa al blend.

3.1.2.4 Proprietà *antifouling* e *fouling-release*

Per confermare le proprietà *antifouling* e *fouling-release* di PFPE-DMAs 2000 e 4000, già esplorate in un precedente lavoro [93], i cui risultati sono riportati nel paragrafo §1.3.1, è stato utilizzato un *microcontact arrayer* per testare l'adesione delle proteine al substrato; l'utilizzo di questo strumento presenta i seguenti vantaggi:

- testare diverse proteine a stretto contatto sul medesimo substrato.
- Parallelizzazione dei test con differenti concentrazioni della stessa proteina.
- Automatizzazione delle fasi di *printing*, di lavaggio e di asciugatura così da ridurre il più possibile la variabilità dei risultati derivanti dai processi manuali.
- Mantenimento dei campioni in condizioni costanti di umidità e temperatura in fase di *printing* e incubazione.

Sono stati utilizzati tre diversi tipi di proteine a quattro differenti concentrazioni (0,002, 0.02, 0,2 e 2 mg/ml):

- albumina da siero bovino (BSA).
- Streptavidina (StreptAv).
- Immunoglobulina G (IgG), proteina molto utilizzata nelle applicazioni biomediche.

Le proprietà *antifouling* sono state valutate analizzando l'intensità di fluorescenza (*brightness*), sia qualitativamente che quantitativamente, delle immagini ottenute e considerando la *brightness* come indicazione della adesione aspecifica proteica al substrato. La figura 3.1.2, riportata come esempio dei due comportamenti limite, mostra come il fenomeno dell'adsorbimento aspecifico si ha chiaramente sulle superfici di polimetilmetacrilato (PMMA): infatti, l'intensità di fluorescenza dopo il lavaggio (Figura 3.1.2.b) decresce in piccola quantità se comparata all'immagine precedente al lavaggio (Figura 3.1.2.a). Al contrario, l'intensità di fluorescenza dopo la procedura di lavaggio è quasi pari a zero sul PFPE-DMA 4000 indice di mancata adesione aspecifica. Lo stesso comportamento è stato osservato per tutti gli altri materiali a base di PFPE e risulta comparabile con quello dei substrati di polietilenglicole metacrilato (PEG-MA), materiale con ottime caratteristiche *antifouling* (le cui immagini non sono state riportate).

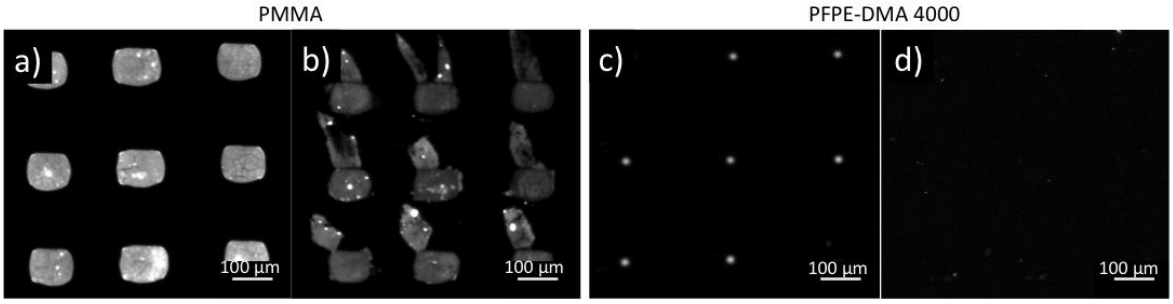


Figura 3.1.2: Esempio di *arrays* prima della procedura di lavaggio con acqua (a e c) e dopo (b e d), ottenuti con *printing* di streptavidina AF555 0,2 mg/ml rispettivamente su superfici di PMMA e PFPE-DMA 4000.

Si nota, inoltre, la differenza nella dimensione degli *spots* ottenuti sui due substrati prima del lavaggio (Figura 3.1.2 a e c). Mentre per il PMMA, le dimensioni degli *spots* corrispondono ai 100 µm di diametro nominale della goccia depositata dalla punta (§2.1.4), per il PFPE-DMA 4000 gli *spots* sono inferiori di circa dieci volte. Probabilmente, l'elevata idrofobicità del substrato di PFPE-DMA non favorisce il rilascio della goccia sul campione; la deposizione, infatti, avviene per semplice contatto del *pin* con la superficie, senza l'uso di sistemi di spinta. Questo comportamento della goccia sulle diverse superfici è stato osservato per tutte le soluzioni di proteine testate e, quindi, i risultati quantitativi riportati saranno presentati solo per le concentrazioni di 0,2 mg/ml, in quanto analoghe a quelle utilizzate successivamente nelle fasi di *patterning*.

È stata stimata la quantità delle proteine adsorbite comparando i dati dell'intensità di fluorescenza degli *spots* dell'*array* depositato sui vari substrati. Il risultato ottenuto per concentrazioni di 0,2 mg/ml è mostrato nei grafici 3.1.14 a, b e c, esso conferma che il fenomeno dell'adsorbimento aspecifico è più alto sul substrato di PMMA rispetto a tutti i materiali a base di PFPE, che invece mostrano una *brightness* simile al PEG-MA.

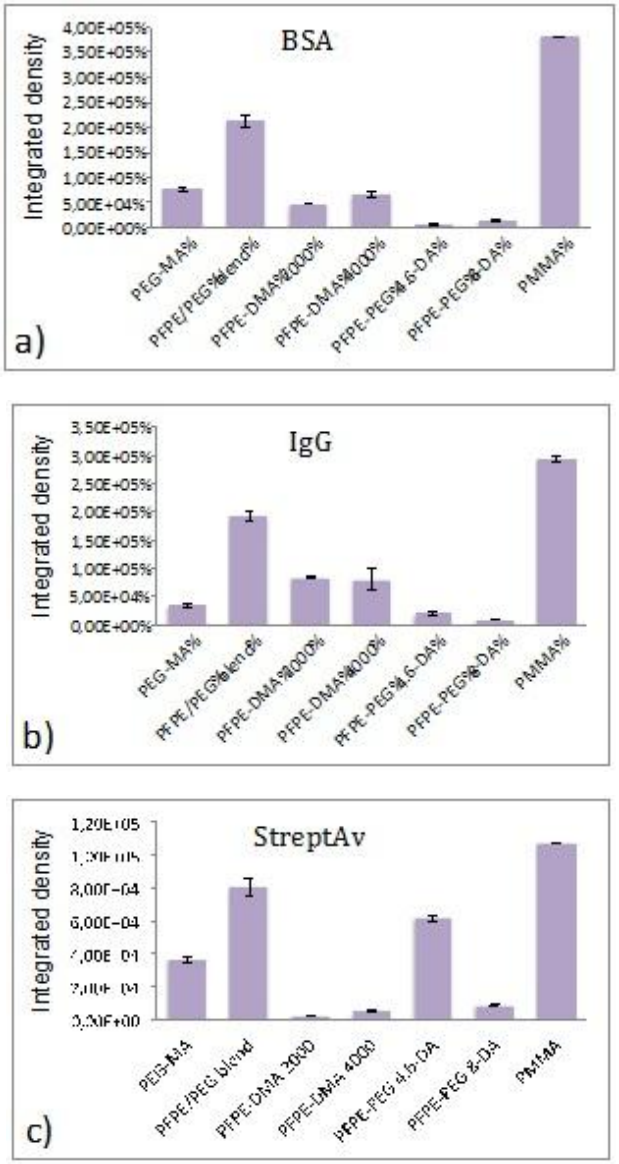


Grafico 3.1.14: a) BSA, b) IgG, e c) StreptAv integrale della densità misurata per gli *arrays* ottenuti dopo lavaggio e asciugatura con aria. Inoltre, la *brightness* misurata per il PMMA risulta la più elevata mentre quella dei materiali a base di PFPE è confrontabile con il PEG-MA, noto materiale con proprietà *antifouling*.

In generale, il valore più alto è stato ottenuto con le IgG, mentre la minore adesione aspecifica è stata osservata per la streptavidina. Questo è fondamentale considerando che il complesso biotina-avidina è uno dei maggiormente utilizzati per le strategie chimiche utilizzate per il *printing* di biomolecole, al fine di effettuare immobilizzazioni selettive su superfici.

Infine, i risultati confermano il possibile utilizzo di PFPE-DMA 4000 e PFPE-DMA 2000 come materiali per la fabbricazione di dispositivi *antifouling* e *fouling-release*.

3.2 *Patterning* di Biomolecole

3.2.1 Risultati preliminari

Secondo quanto riportato in letteratura [93], il PFPE-DMA a più alto peso molecolare (PFPE-DMA 4000) risulta, fra i vari perfluoropolieteri fotoreticolabili, il candidato migliore per la realizzazione del *pattern* di biomolecole poichè caratterizzato da migliore proprietà di *antifouling* e *fouling-release*, conseguenza della sua bassa tensione superficiale combinata con basso valore di modulo elastico. Le proprietà *antifouling* e *fouling-release* permettono l'immobilizzazione selettiva di cellule *target* sulla superficie, evitando l'adsorbimento aspecifico di biomolecole e proteine (*antifouling*) o permettendone l'eventuale rimozione tramite forze idrodinamiche (*fouling-release*). Nella nostra attività sperimentale abbiamo ottimizzato processi di *soft*-litografia e di fotolitografia per la realizzazione di *patterns* di eparina su superfici di PFPE-DMAs. In entrambi i casi, il punto chiave si è rivelato essere la deposizione di biomolecole fotoreattive, su substrati in PFPE-DMA parzialmente reticolati, aventi doppi legami residui, che reagiscono con i gruppi fotoreattivi coniugati alle molecole esca. In particolare, il primo *step* del *μ-contact printing* per il *grafting* dell'eparina prevede il trasferimento di fotobiotina da uno stampo elastomerico a un substrato parzialmente reticolato in PFPE-DMA 4000, e il loro *co-cross linking* dopo un'ulteriore esposizione agli UV. La reazione tra fotobiotina e PFPE-DMA 4000 avviene tra il gruppo fotoreattivo fenilazide della fotobiotina, e i doppi legami C=C non reagiti del substrato parzialmente reticolato (§1.2.2.1). Successivamente viene sfruttata l'interazione altamente specifica di biotina e avidina. La fotobiotina legata al substrato promuove una soprastruttura ordinata di avidina che si autoassembla (*self-assembly)* con due siti di legame affacciati sul substrato e gli altri due verso l'esterno. La forte affinità tra avidina-biotina viene sfruttata anche per dimostrare l'efficiente coniugazione della fotobiotina con i doppi legami C=C non reagiti del substrato. Infatti utilizzando l'avidina coniugata con fluoresceina (avidina-FITC), che va a legarsi all'*array* di fotobiotina sul substrato in PFPE-DMA sottostante, è possibile ottenere immagini al microscopio a fluorescenza del *pattern* ottenuto. Nella figura 3.2.1, il basso segnale fluorescente dell'*array* dimostra che l'avidina-FITC non si è legata e dunque attesta la scarsa efficienza di *printing* della biotina. Causa principale di questo fenomeno è l'elevata idrofobicità del PFPE-DMA 4000 che non favorisce il trasferimento della biotina dallo stampo

elastomerico al substrato stesso. L'ottimo comportamento *antifouling* del materiale è invece un risultato positivo ottenuto in queste prove preliminari, come è possibile osservare dal basso segnale in fluorescenza del *background*.

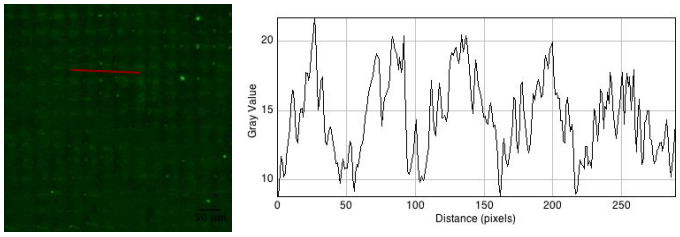


Figura 3.2.1: L'avidina-FITC si lega all'*array* di fotobiotina sul substrato di PFPE-DMA. Il basso segnale di fluorescenza rivela la scarsa efficienza del trasferimento di fotobiotina tramite *μ-contact printing*.

Lo stesso procedimento di *grafting* della fotobiotina tramite *μ-contact printing* e successiva coniugazione con avidina-FITC, è stato implementato su un substrato di PFPE-DMA 2000 parzialmente reticolato. Nella figura 3.2.2, la coniugazione dell'avidina-FITC alla sottostante fotobiotina è verificata dal forte segnale in fluorescenza derivante dagli *spots*, che permette di attestare l'efficienza del *grafting* di fotobiotina, favorito molto probabilmente da un'alta densità di gruppi uretani del PFPE-DMA a più basso peso molecolare rispetto al PFPE-DMA 4000 [125]. Tuttavia il forte segnale di fluorescenza del *background* è indice di un adsorbimento aspecifico di avidina-FITC.

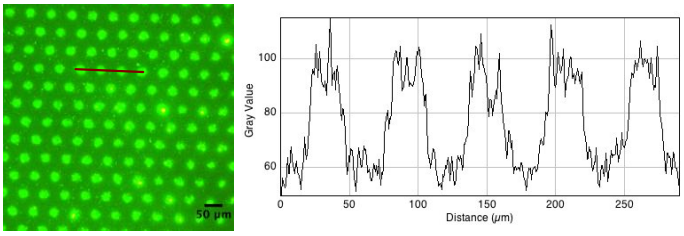


Figura 3.2.2: *Self-assembly* di avidina-FITC su fotobiotina immobilizzata su PFPE-DMA 2000. Il grafico accanto dimostra una distribuzione uniforme. Tuttavia il forte segnale di rumore in fluorescenza proveniente dal *background*, rivela un'assorbimento aspecifico di avidina-FITC sulla superficie del PFPE-DMA 2000.

Infine, la stessa procedura di *printing* di fotobiotina e *self-assembly* di avidina-FITC viene effettuata su un substrato di blend, costituito al 50% da PFPE-DMA 4000 ad alto peso molecolare e al restante 50% da PFPE-DMA 2000 a basso peso molecolare. L'obiettivo è di combinare le ottime proprietà di *fouling-release* del PFPE-DMA 4000 con l'affinità migliore del PFPE-DMA 2000 con la biotina. Come mostrato in figura 3.2.3, si ha un forte segnale in fluorescenza dagli *spots* dell'*array*, indice di un efficiente trasferimento e *grafting* della fotobiotina. Inoltre viene abbattuto il rumore di *background*.

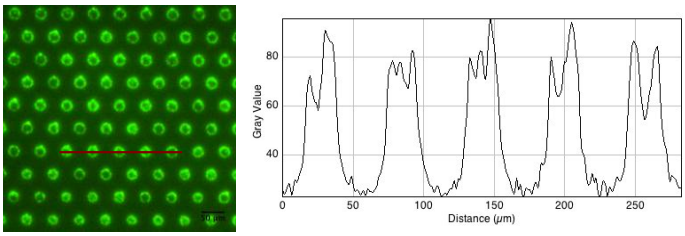


Figura 3.2.3: *μ-contact printing* della fotobiotina realizzato con successo su un substrato in blend. Esso mostra ottime proprietà di *antifouling* e efficiente *grafting* della fotobiotina.

In accordo con questi risultati preliminari, la seguente attività sperimentale di *patterning* di biomolecole (eparina biotinilata ed eparina metacrilata) è stata effettuata su substrati di blend dei due PFPE-DMAs.

Un altro aspetto ottimizzato è legato all'autofluorescenza del polimero, causata dall'utilizzo di fotoiniziatori le cui strutture molecolari presentano anelli aromatici. A tal fine è stato necessario valutare il fotoiniziatore da utilizzare per la reticolazione del blend. Visti i risultati ottenuti dalle analisi dei substrati in fluorescenza, il Darocur 1173 (1 % w/w) è stato selezionato. Tra i fotoiniziatori aromatici testati, infatti, il Darocur è l'unico che permette di ridurre il rumore di *background*, che ostacola il segnale fluorescente derivante dalle molecole biologiche. Nella figura 3.2.4 vengono riportate le immagini relative a substrati reticolati tramite l'uso di quattro fotoiniziatori diversi. E' possibile notare come il segnale fluorescente cresca all'aumentare degli anelli aromatici presenti nella struttura molecolare dei fotoiniziatori. Di conseguenza il Darocur, cha ha il minor numero di anelli, è risultato quello con il segnale di autofluorescenza più basso.

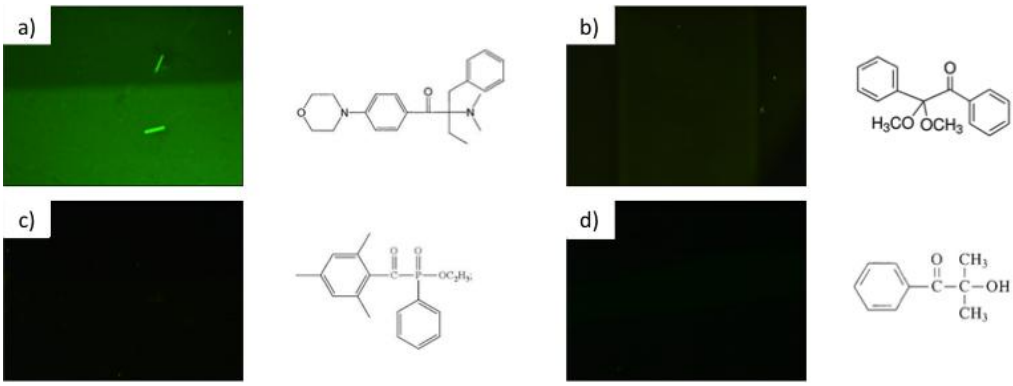


Figura 3.2.4: Vengono riportati i segnali in fluorescenza dei quattro fotoiniziatori: a) Irgacure 369; b) 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA); c) Lucirin tpo-l; d) Darocur. Quest'ultimo ha intensità del segnale di autofluorescenza più basso, legato al minor numero di anelli aromatici nella struttura, pertanto presenta la miglior performance tra i quattro fotoiniziatori considerati.

3.2.2 *μ-contact printing* (μ-CP)

Come già detto in §2.2.1, la prima strategia utilizzata per ottenere un *pattern* di eparina su un substrato di blend di PFPEs prevede principalmente tre *steps* e può essere schematizzata (Figura 3.2.5) come segue:

I. μ-CP di fotobiotina reattiva ai raggi UV su substrato parzialmente reticolato di blend. La successiva esposizione agli UV del substrato funzionalizzato con l'*array* di fotobiotina permette la reazione del gruppo fotoattivo aril-azide della biotina con i doppi legami residui C=C presenti sulla superficie del blend parzialmente reticolato.

II. Sfruttando la forte affinità del complesso biotina-avidina, un *array self-assembled* di neutravidina, proteina tetramerica, si genera su quello sottostante di fotobiotina.

III. La struttura tetramerica della neutravidina, che presenta quattro siti di legame identici per la biotina viene sfruttata per legare ulteriormente eparina biotinilata ai siti di legame del *pattern* di neutravidina ancora liberi.

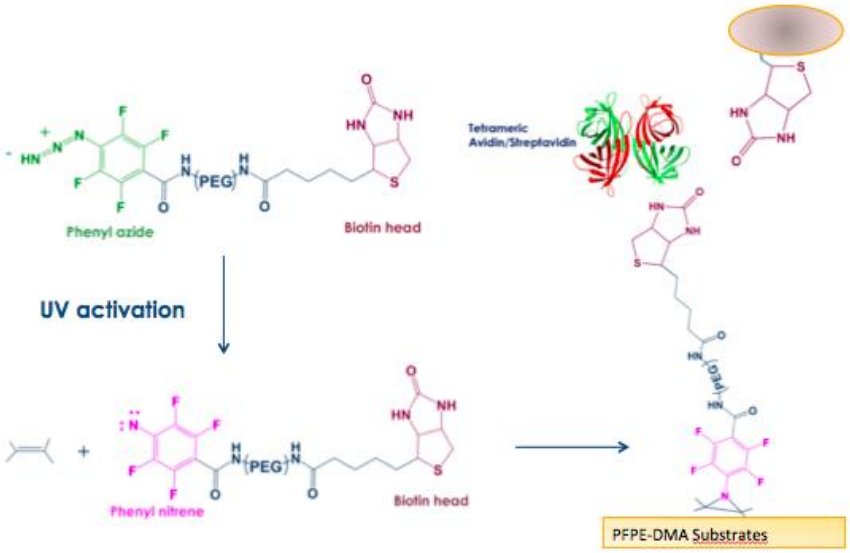


Figura 3.2.5: *Steps* del procedimento ottimizzato per ottenere un *pattern* di eparina sfruttando la tecnica di μ-CP e il meccanismo di riconoscimento molecolare avidina-biotina. Il processo prevede l'attivazione della fotobiotina con raggi UV che reagisce con doppi legami C=C presenti sulla superficie parzialmente reticolata del blend di PFPE. Successivamente l'*array* di fotobiotina viene incubato con una soluzione di streptavidina che si lega selettivamente dove è localizzata la fotobiotina. Infine si sfruttano i siti di legame per la biotina ancora liberi presenti sulla streptavidina per l'autoassemblaggio di un ulteriore molecola biotinilata. Come molecole biotinilate sono state utilizzate biotina fluorescente ed eparina biotinilata.

Per verificare l'efficienza dello *step* I, come visto nei risultati preliminari (§3.2.1) è stata incubata streptavidina coniugata con fluoresceina sugli *arrays* di fotobiotina. Le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza. Nelle immagini in figura 3.2.6, è possibile osservare che il *pattern* ottenuto presenta un forte segnale in fluorescenza selettivo dove sono localizzati gli *spots*, permettendo di verificare l'efficienza dello *step* I (§3.2.1).

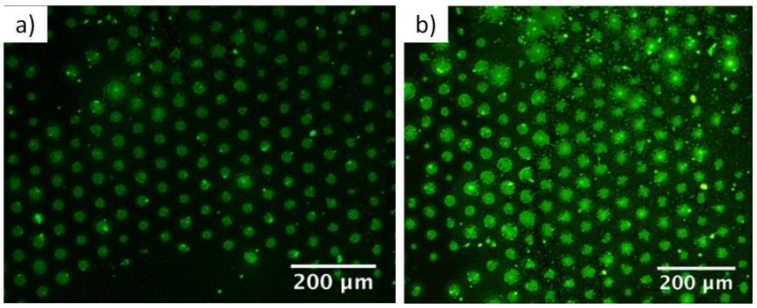


Figura 3.2.6: a) e b) Immagini al microscopio a fluorescenza di *arrays* di avidina-FITC su blend.

Lo *step* II, che prevede il *self-assembly* tra fotobiotina e neutravidina, è stato validato incubando biotina fluorescente (biotina-FITC) su un *array* di neutravidina coniugato al sottostante *array* di fotobiotina realizzato tramite µ-CP. Dalle immagini in figura 3.2.7 si può notare l'efficienza del *self-assembly* di biotina fluorescente sul *pattern* sottostante di neutravidina. Inoltre la bassa fluorescenza del *background* prova che non avvengono fenomeni di adsorbimento aspecifico e conferma le proprietà *antifouling* e *fouling-release* dei PFPEs. Inoltre si osserva l'abbattimento del segnale di autofluorescenza, conseguenza della scelta di un fotoiniziatore (Darocur 1173) con un ridotto numero di anelli aromatici, che permette la riduzione del rumore di fluorescenza (§3.2.1).

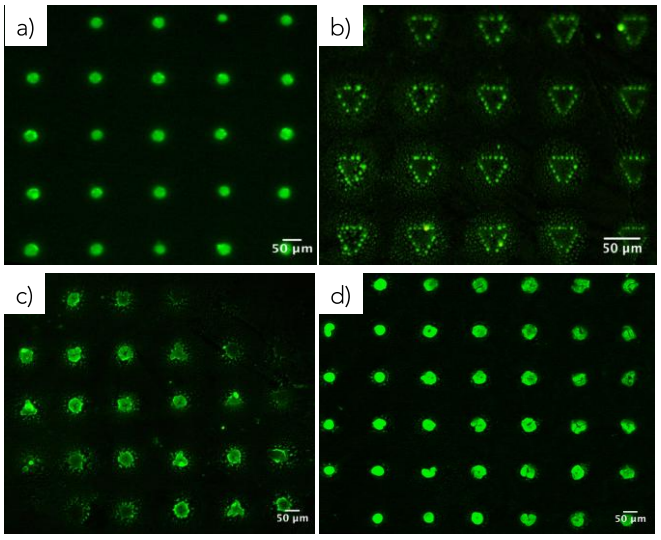


Figura 3.2.7: Immagini al microscopio a fluorescenza dell'*array* di biotina-FITC in diverse geometrie: a), c) e d) alternano triangoli, quadrati e cerchi (≈ 25 µm); b) *dots* triangolari (ϕ 25 µm). Si nota un eccellente comportamento *antifouling* del blend.

Sono state testate diverse geometrie dell'*array* (Figura 3.2.8), ottenute modificando la microstruttura dello stampo elastomerico. La geometria dell'*array* può influire sull'efficienza di cattura delle cellule.

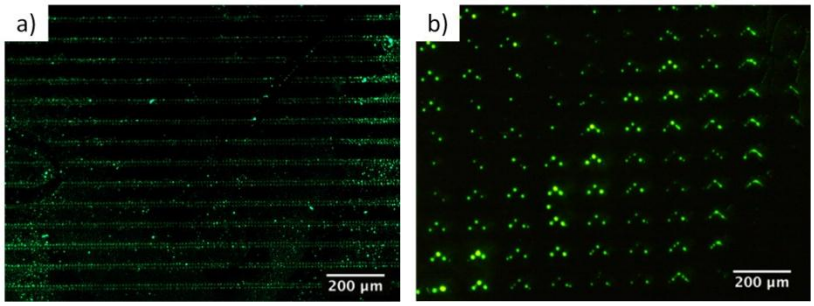


Figura 3.2.8: Immagini ottenute con microscopio a fluorescenza di *pattern* con biotina fluorescente: a) campione con geometria G5 a linee parallele; b) campione con geometria L3 a frecce.

Dalle immagini 3.2.9 è possibile osservare come si siano ottenuti *patterns* con differenti design e geometrie osservabili sia in fluorescenza che a contrasto di fase.

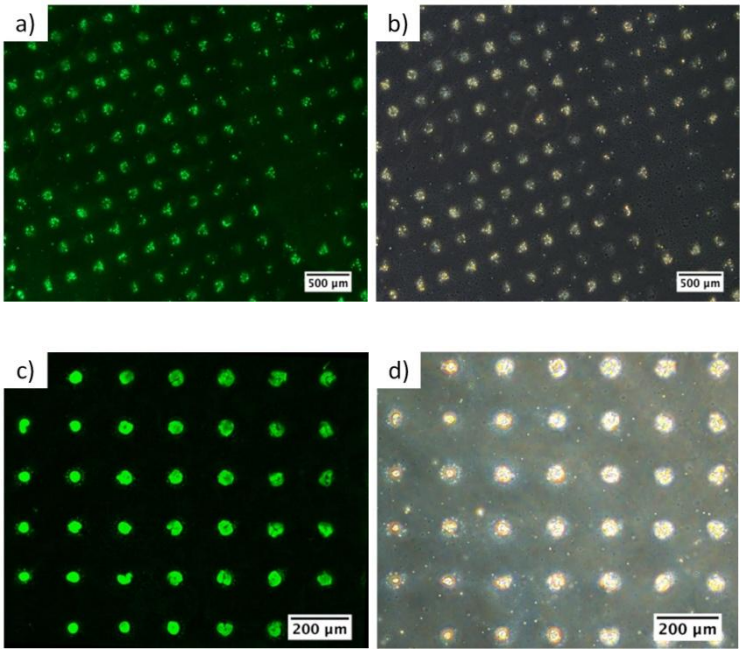
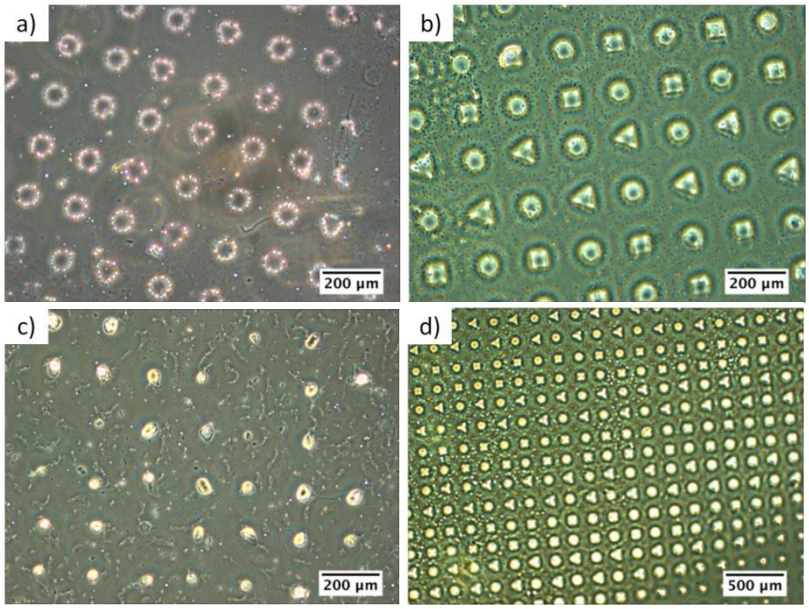


Figura 3.2.9 Immagini di due campioni rispettivamente, a) e c), in fluorescenza e, b) e d), a contrasto di fase di *arrays* di biotina-FITC su blend

Verificata l'efficienza degli *steps* I, II e III, *arrays* di eparina sono stati ottenuti implementando lo stesso processo, ma sostituendo nello *step* III la biotina-FITC con eparina biotinilata. Immagini dei *patterns* di diverse geometrie che sono stati realizzati sono state ottenute al microscopio ottico in contrasto di fase (Figura 3.2.10).



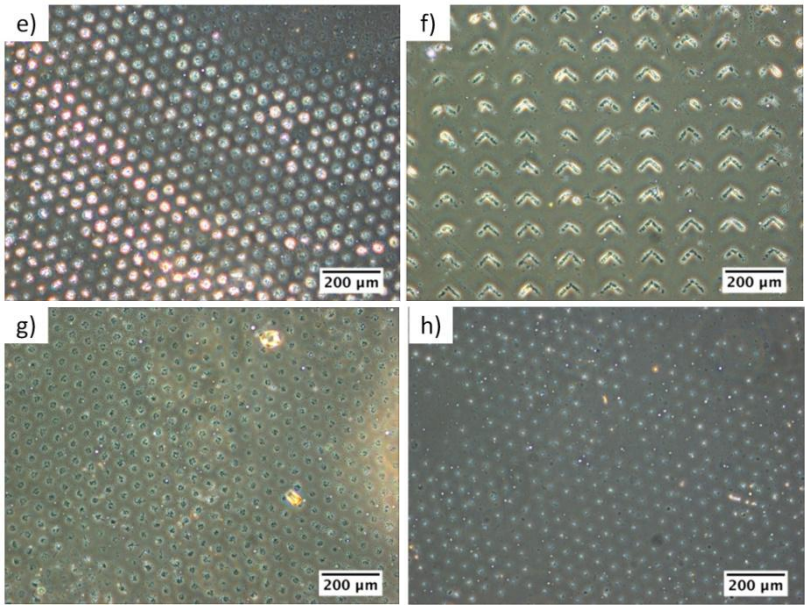


Figura 3.2.10: Immagini del microscopio a contrasto di fase di *arrays* di eparina biotinilata in diverse geometrie: a), c) O2; b), d) M3; e), g), h) *dots* di forma circolare (ϕ 25 µm) distanziati di 10 µm; f) L3.

Alcuni campioni con il *pattern* in eparina biotinilata realizzati tramite µ-CP sono stati sottoposti alla colorazione Alcian Blue. I risultati sono poco visibili al microscopio ottico, come è possibile notare nelle figure seguenti. Solamente i bordi degli spot presentano un colore blu indice della presenza di eparina.

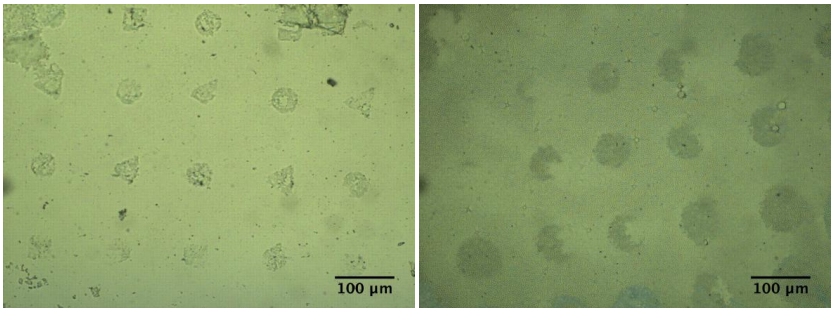


Figura 3.2.11: Colorazione Alcian Blue di *arrays* di eparina realizzati tramite *micro-contact printing*.

Nonostante le immagini in fluorescenza attestino l'efficienza della strategia di *grafting* adottata, si sono riscontrati numerosi aspetti critici legati all'implementazione di questo processo. In particolare, il passaggio più critico è risultato essere il *micro-contact printing* di fotobiotina su blend, *step* I fondamentale per garantire il successo dell'intera procedura di *grafting* dell'eparina. Al fine di ridurre al minimo le problematiche riscontrate, sono stati ottimizzati i parametri utilizzati nei processi per la realizzazione del *pattern* quali: il grado

di conversione del substrato, i pesi da utilizzare durante la fase di *printing* dello stampo elastomerico sul substrato, tempo di incubazione della replica elastomerica con la soluzione di fotobiotina, la concentrazione della stessa, il metodo e il tempo di asciugatura. Per quanto riguarda il primo parametro è stato ottimizzato il tempo di esposizione agli UV del blend, sfruttando i attraverso i dati ottenuti con l'analisi della cinetica di reticolazione. Quando il grado di conversione del polimero è basso (< di 30% di conversione), il contatto e la pressione della replica di PDMS può o rovinare la morfologia del substrato, come illustrato nella figura 3.2.12, o causare microstrutturazione del substrato (Figura 3.2.13). Questa può essere ridotta o evitata diminuendo il peso posto sulla replica durante la fase di *printing*.

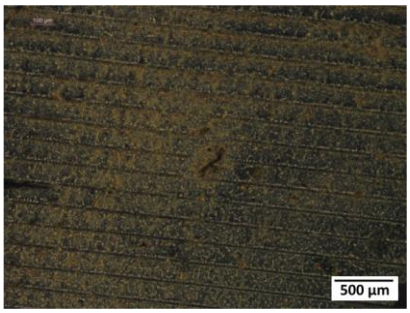


Figura 3.2.12: Substrato con superficie danneggiata a causa della scarsa reticolazione in seguito al contatto con la replica in PDMS con geometria G5.

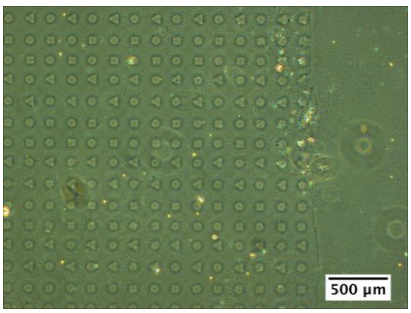


Figura 3.2.13: Il *pattern* non è dovuto al *grafting* della molecola, ma alla microstrutturazione del substrato in blend a causa del peso eccessivo applicato sulla replica, geometria M3, durante il *printing*.

Altro parametro ottimizzato è il tempo di asciugatura della replica in PDMS dopo la deposizione della soluzione di fotobiotina. Come riportato in studi di letteratura [33, 34], per favorire l'assorbimento di proteine sulla superficie della replica in fase di incubazione, la replica viene sottoposta a un trattamento al plasma al fine di aumentarne la bagnabilità. In questo lavoro di tesi si è deciso di non sottoporre la replica in PDMS a un trattamento al

plasma, al fine di non aumentare l'affinità della proteina al PDMS stesso e favorire conseguentemente il trasferimento della fotobiotina dalla superficie idrofobica del PDMS al substrato idrofobico in blend. Conseguenza principale del non trattamento al plasma del PDMS è un *printing* non omogeneo. Esso è in parte dovuto al fatto che durante l'*inking* la goccia di fotobiotina, che viene depositata sulla replica, non ricopre completamente l'area microstrutturata. Per ovviare a questo inconveniente e coprire interamente l'area della replica di PDMS è necessaria una quantità maggiore di soluzione. Ciò può comportare la presenza di eccesso di materiale sulla replica e conseguentemente sul substrato (Figura 3.2.14.c). In secondo luogo durante la fase di asciugatura della goccia di fotobiotina sulla replica, si ha un'evaporazione del solvente non uniforme, che comporta una disposizione della fotobiotina prevalentemente ai bordi della replica, con una generazione di anelli concentrici su di essa. Altro punto critico è la deposizione dello stampo in PDMS sul substrato, la quale deve essere effettuata con attenzione ed evitando il *dragging* dello stampo (Figura 3.2.14.a). Questo *step* può comportare anche un contatto parziale tra replica e substrato, con conseguente non omogeneità del *printing* (Figura 3.2.14.b).

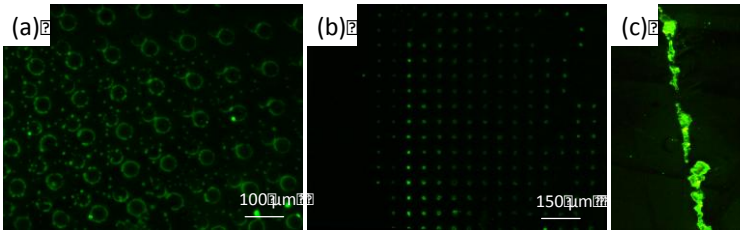


Figura 3.2.14: a) *Dragging* dello stampo sul substrato che comporta un doppio *printing* dell'*array;* b) *Pattern* non uniforme; c) Materiale in eccesso e formazione di agglomerati.

In conclusione, nonostante la presenza di vari *steps* nel protocollo descritto e nonostante e l'ampia variabilità di parametri che possono influenzare la ripetibilità del processo di μ-CP, la strategia adottata presenta il vantaggio di possedere un'ampia versatilità. Infatti, l'*array* di avidina (ottenuti implementando lo *step* I e II del processo) rappresenta una piattaforma versatile per l'immobilizzazione di una qualsiasi molecola funzionalizzata con biotina, che si lega ai due siti di legami ancora liberi dell'avidina. Variando quindi l'esca biotinilata è possibile immobilizzare sulla superficie diverse popolazioni di cellule rare.

Il microscopio a forza atomica (AFM) è stato utilizzato per indagare la topografia delle superfici in blend selettivamente funzionalizzate con eparina. La scansione avviene su

un'area di dimensioni 50x50 µm, in *tapping mode*. Le analisi vengono effettuate dopo ogni *step* del processo di *grafting* per valutare come cambia la dimensione degli *spots* col procedere degli *step*. Le altezze ottenute sono riportate in tabella numero 3.2.1.

Tabella 3.2.1: Altezze relative dello *spot* ad ogni *step* del *grafting*, corrispondente al legame di una biomolecola.

	Fotobiotina	**Neutravidina**	**Eparina biotinilata**
Altezza [nm]	357.07 ± 144.66	851.55 ± 154.79	1203.02 ± 291.84

E' possibile notare come col procedere degli *step* cresca l'altezza dello *spot* di 350-400 nm. Al termine del III *step*, che prevede il *grafting* di eparina biotinilata, la dimensione degli *spots* è circa di 1200 nm.

Allo stesso modo nelle immagini in figura 3.2.15 è possibile osservare i vari *steps* del *grafting*.

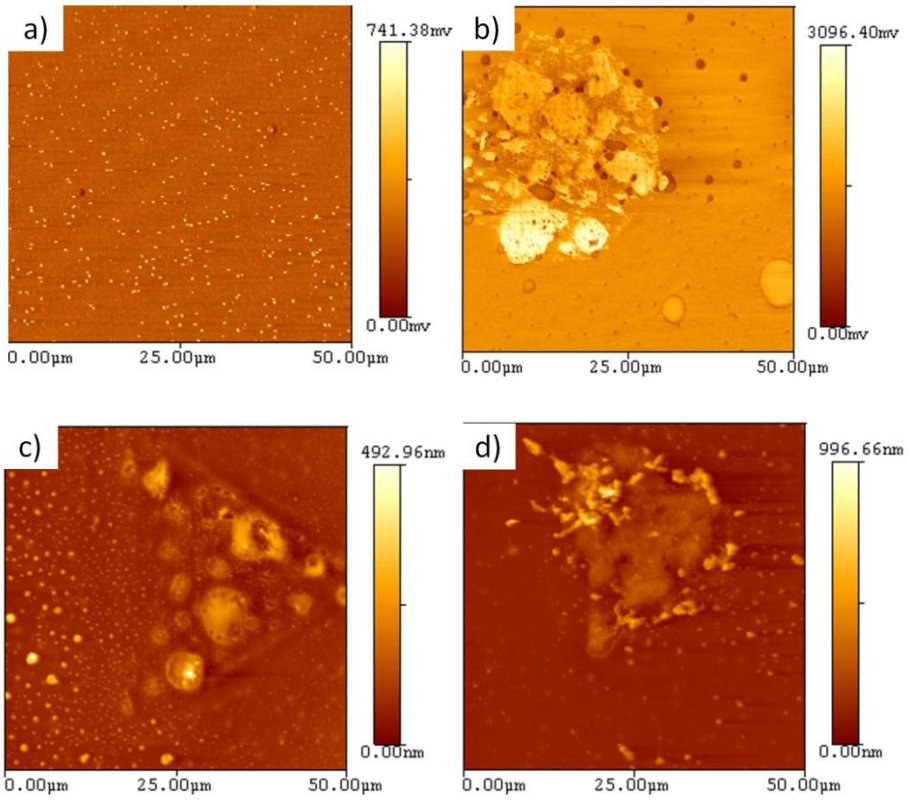


Figura 3.2.15: Immagini dello spot ottenute tramite AFM dei vari steps del *grafting*: a) blend parzialmente reticolato; b) *spot* con *grafting* di fotobiotina c) *spot* con *grafting* di neutravidina d) *spot* con *grafting* di eparina.

3.2.3 Fotolitografia

Un processo manuale di fotolitografia tramite fotomaschera è stato ottimizzato, come già descritto (§2.2.2), per realizzare *pattern* di eparina funzionalizzata con gruppi metacrilici, tramite *grafting* diretto con il blend. L'eparina metacrilata è stata sintetizzata nei nostri laboratori sfruttando una semplice reazione con anidride metacrilica, la cui efficienza è stata verificata tramite spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (^{1}H-NMR).

La spettroscopia NMR è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame. Per grado di metacrilazione si intende la percentuale di gruppi ossidrilici e di gruppi amminici, legati a quelli solfati, originariamente presenti nell'eparina, ai quali, durante la reazione di sintesi precedentemente descritta (§2.2.2.1), sono stati coniugati gruppi metacrilati. L'avvenuta metacrilazione del campione è stata valutata dallo spettro ottenuto dalle analisi ^{1}H-NMR. I picchi rappresentanti gli idrogeni nei doppi legami di carbonio, indici della formazione di un legame tra i gruppi carbossilici –COOH derivati dall'anidride metacrilica e i gruppi ossidrilici e solfati dell'eparina, sono stati identificati nella regione 5.5-5.2 ppm dello spettro ^{1}H-NMR, inoltre, il picco a 2.1 ppm, rappresentante l'idrogeno nel gruppo metilico, è sia caratteristico della molecola di eparina che della metacrilazione con anidride metacrilica. Si è proceduto quindi al calcolo dell'integrale sotteso dall'area dei picchi di interesse, in quanto nella spettroscopia ^{1}H le aree associate ai vari picchi sono direttamente proporzionali al numero dei protoni che danno origine al segnale stesso. Comparando i valori dei vari integrali si ricava il rapporto fra i protoni della molecola. Il grado di metacrilazione è stato ottenuto normalizzando, rispetto al picco dell'idrogeno metile, la differenza tra l'integrale dell'eparina metacrilata e lo stesso picco ottenuto per l'eparina di controllo non metacrilata. Il valore percentuale del grado di metacrilazione rispetto al controllo è di circa 25% in accordo con i valori riportati in letteratura [51].

Il grafico 3.2.1 riporta gli spettri ^{1}H-NMR del campione di eparina metacrilata e del campione di controllo non metacrilato. Il picco a 4.7 ppm è dovuto alla presenza di solvente residuo non completamente eliminato durante il processo di liofilizzazione; l'intensità di questo picco rispetto agli altri picchi caratteristici delle molecole comporta problemi nell'individuazione di picchi di intensità inferiore riducendo così la possibilità di avere un'analisi altamente precisa.

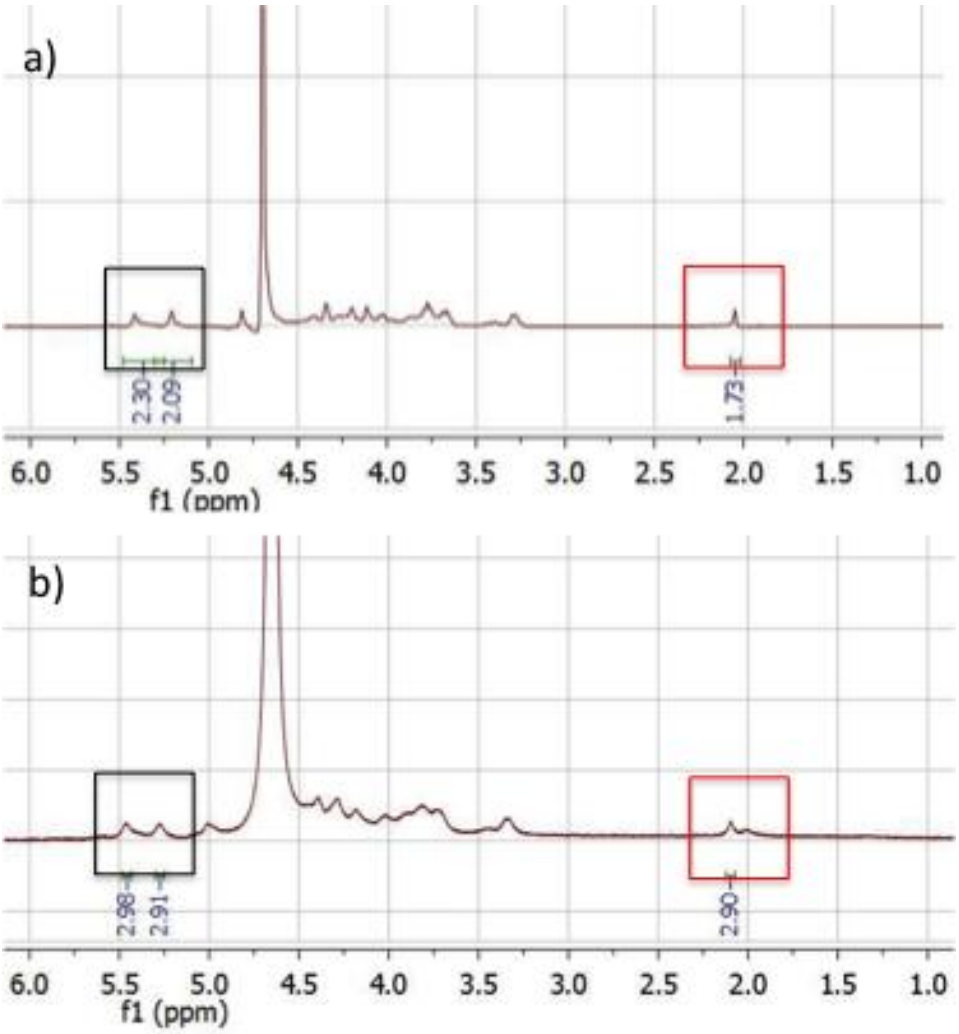


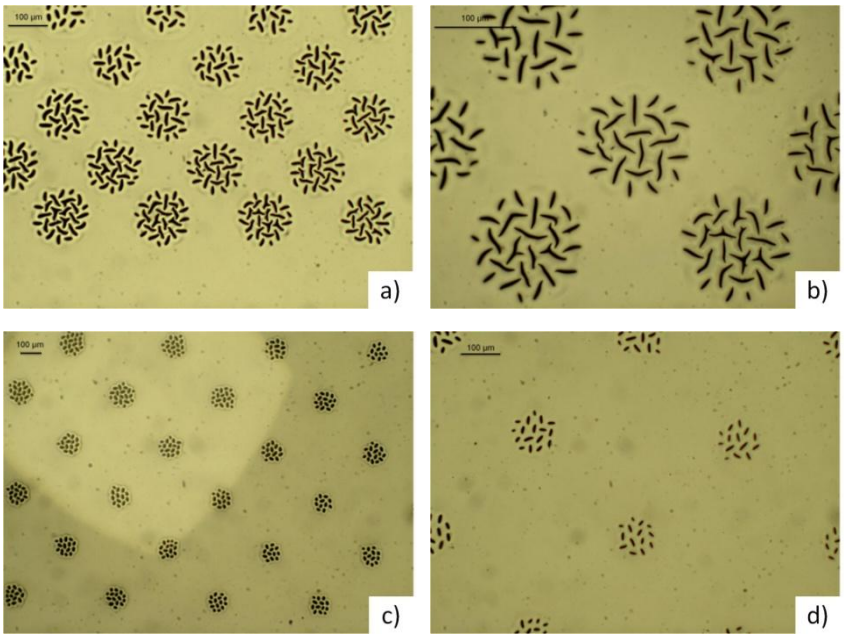
Grafico 3.2.1: Spettro NMR dell'eparina a) prima e b) dopo la metacrilazione. Riquadrati in rosso sono visibili i picchi corrispondenti ai doppi legami del carbonio e in rosso quelli del gruppi metilico. Sotto ogni picco sono riportati i valori degli integrali che crescono da a) a b).

La strategia di *grafting* adottata prevede la reazione dei gruppi metacrilici coniugati all'eparina con i doppi legami C=C non reagiti del PFPE sottoreticolato.

Inoltre, come controllo qualitativo, 200 µl di soluzione a 0,5 a 1 mg/ml sono stati esposti a radiazione UV e si è osservata una reticolazione massiva della soluzione (Figura 3.2.16). Il gel ottenuto se successivamente posto in acqua, non si scioglie.

Figura 3.2.16: Gel ottenuto dalla soluzione di eparina funzionalizzata dopo una prova di reticolazione massiva.

Nelle immagini in figura 3.2.17 è possibile osservare i *patterns* di eparina ottenuti. Il protocollo utilizzato risulta efficiente e ripetibile. Il *grafting* diretto dell'eparina al substrato permette la riduzione del numero di *steps* richiesti dal protocollo rispetto a quello con il µ-CP. Gli *spots* riproducono con elevata risoluzione i disegni stampati sulle maschere, *dots* di forma circolare, in coincidenza dei quali si può osservare la formazione di increspature durante l'irraggiamento a causa della reazione di coniugazione dell'eparina metacrilata con il substrato.



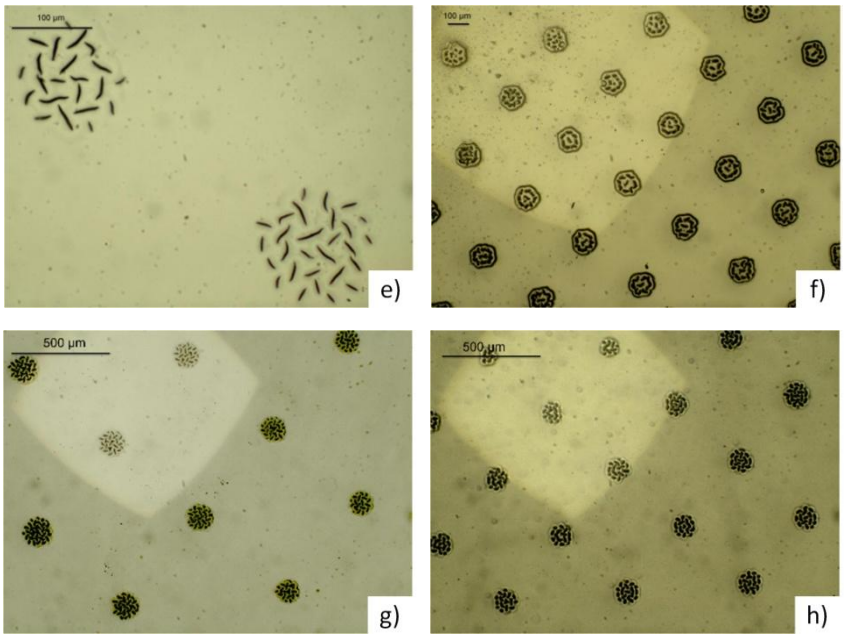


Figura 3.2.17: *Arrays* di eparina metacrilata legata al substrato in blend osservati al microscopio ottico. La disposizione e la dimensione dei *dots* risulta variabile: a), b) diametro *dots* e distanza tra gli *spots* 100 µm; c), d), e), f) *dots* di 100 µm distanziati di 500 µm; g) dots di 100 µm distanziati di 700 µm; h) *dots* di 50 µm distanziati di 500 µm.

Sono stati utilizzati differenti tipi di maschere, con *dots* di dimensioni di 50 e 100 µm, e con disposizioni spaziali diverse. Si è potuto osservare come in *patterns* con *dots* troppo ravvicinati (posti a distanza di 100 µm in direzione x, e di 25 µm tra una linea e l'altra, in direzione y) l'efficienza del processo si riduce (Figura 3.2.18). Inoltre il legame tra eparina e substrato non avviene in tutti gli *spots*, ma con una prevalenza per i *dots* al bordo della maschera, fenomeno dovuto all'elevata idrofobicità del substrato che non consente uno *spreading* omogeneo della goccia di soluzione, causando l'accumulo di materiale ai bordi.

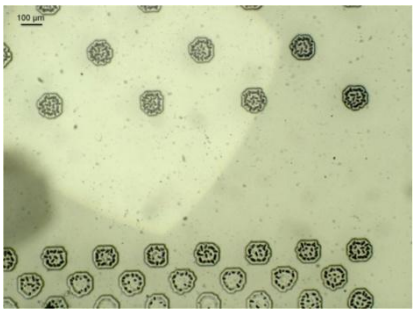


Figura 3.2.18: Differenza nell'efficienza di *grafting* dell'eparina metacrilata tra *pattern* con disposizione spaziale diversa: in alto distanza tra i *dots* di 500 µm, in basso di 100 µm.

Immagini SEM di *arrays* di eparina metacrilata sono riportate in figura 3.2.19 (a, b, c, d). Il

più alto ingrandimento consente la visualizzazione della morfologia all'interno del singolo *spot* dove risultano presenti filamenti di 2 µm di lunghezza.

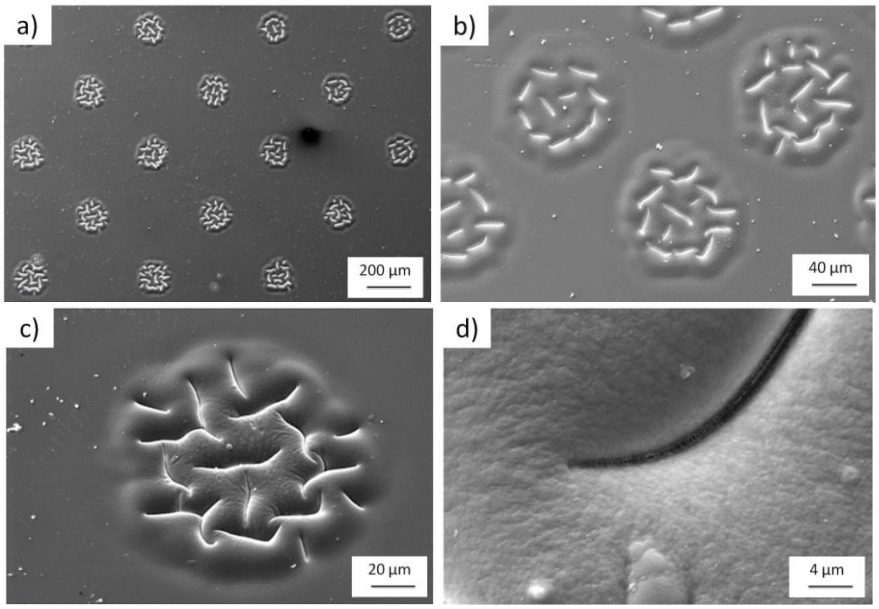


Figura 3.2.19: Immagini al SEM dello stesso campione, ad ingrandimenti sempre maggiori, con *pattern* di eparina metacrilata su blend con *dots* di 100 µm distanziati di 500 µm.

Sfruttando inoltre la microanalisi, è stata analizzata la composizione superficiale in atomi in tre punti distinti del campione: all'interno di uno spot privo di increspature, sul substrato di PFPE non funzionalizzato e all'interno dello *spot* con gli avvallamenti.

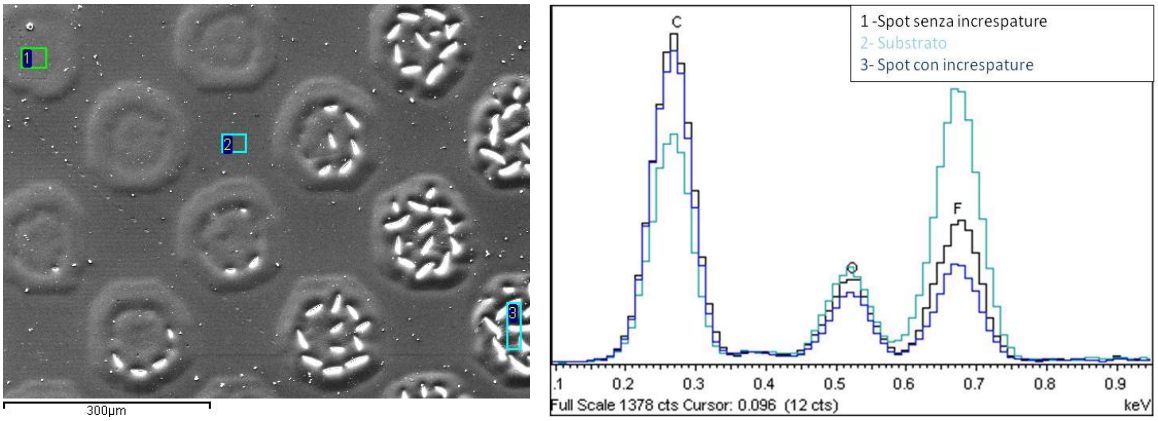


Figura 3.2.20: Microanalisi al SEM di un campione con pattern di eparina metacrilata su blend. La linea 1 nera fa riferimento allo spot privo di increspature, la linea 2 azzurra fa riferimento al substrato, la linea 3 blu fa riferimento allo spot con increspature.

Dalla microanalisi emerge che il substrato di PFPE non funzionalizzato (profilo 2 di colore azzurro nel grafico di figura 3.2.20) presenta un quantitativo maggiore di fluoro (tipico dei

PFPE) e uno ridotto di carbonio, mentre nello *spot* con all'interno le increspature con i microfilamenti la quantità di fluoro (profilo 3 di colore blu nella figura 3.2.20) diminuisce in maniera significativa, mentre la quantità di carbonio aumenta. Lo *spot* privo di creste presenta un comportamento intermedio tra i due casi (profilo 1 di colore nero nella figura 3.2.20). Le quantità di ossigeno risultano invece confrontabili in tutti e tre i casi analizzati. Il ridotto contenuto di fluoro in corrispondenza degli *spots*, in parallelo all'aumento del segnale di carbonio può essere conferma dell'avvenuta deposizione dell'eparina che durante l'analisi di superficie scherma il PFPE sottostante.

Per valutare l'effettivo *grafting* di eparina è stata eseguita una colorazione qualitativa adatta al riconoscimento della molecola: Alcian Blue. La prima prova effettuata è stata massiva: una goccia di 10 µl (concentrazione 1 mg/ml) è stata posta su un substrato e lasciata asciugare a temperatura ambiente; è stata poi esposta a radiazione UV per 10 minuti e, infine, l'eccesso di eparina è stato lavato con PBS e acqua distillata. La colorazione del *macrospot* è stata effettuata con una soluzione di *staining.*
Immagini della colorazione della goccia sono visibili in figura 3.2.21. Macroscopicamente (Figura 3.2.21.b) è ben individuabile un bordo azzurro: l'evaporazione del solvente genera degli anelli di eparina soprattutto agli estremi della goccia depositata, questi anelli sono stati poi osservati al microscopio ottico, dove è stato possibile vedere la colorazione blu (Figura 3.2.21.a).

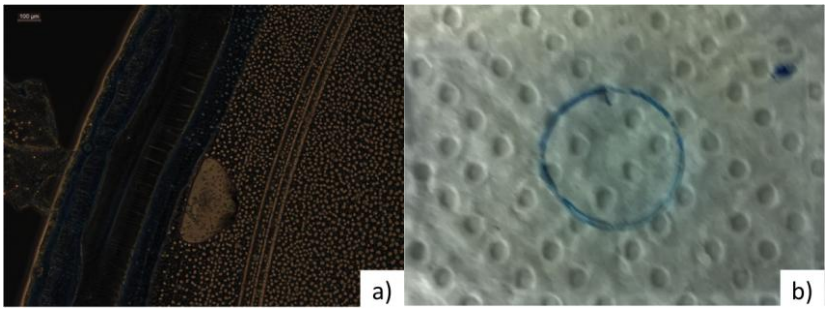


Figura 3.2.21: Colorazione con Alcian Blue di una goccia di eparina metacrilata legata ad un substrato di blend parzialmente reticolato (texp=20s).

La colorazione è stata poi effettuata su *pattern* di eparina metacrilata (0,5 mg/ml). Nelle immagini prese al microscopio ottico, figura 3.2.22, è osservabile una colorazione azzurra in corrispondenza degli avvallamenti che si creano negli *spots*, anche se non ben visibile poiché purtroppo la fotocamera del microscopio altera in parte i colori.

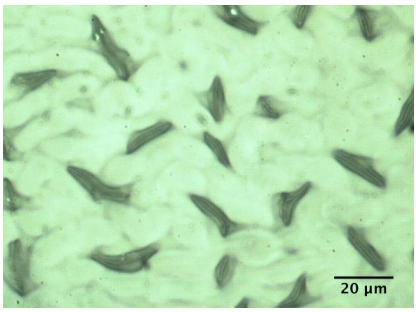


Figura 3.2.22: Colorazione Alcian Blue delle increspature all'interno di uno *spot* di eparina.

Si sono riscontrati dei punti critici anche durante il processo di *grafting* dell'eparina metacrilata tramite fotolitografia.

Substrati con basso grado di reticolazione (<30 %) subiscono un deterioramento con la deposizione della soluzione di eparina e l'esposizione ai raggi UV con la fotomaschera (Figura 3.2.23.a). Allo stesso tempo però substrati con un elevato grado di reticolazione (>70%), non permettono il legame con i gruppi metacrilici dell'eparina, a causa della scarsa presenza di doppi legami C=C residui reattivi in superficie. Il *pattern* ottenuto con queste condizioni è dovuto alla sola microstrutturazione del substrato dovuta alla reticolazione con tempistiche differenti dal materiale circostante, e non sono presenti increspature negli *spots* (Figura 3.2.23.b).

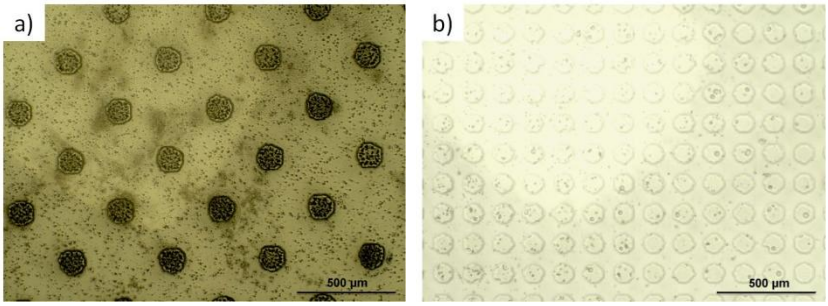


Figura 3.2.23: a) Substrato danneggiato dovuto a scarsa reticolazione b) assenza di increspature negli *spots* dovuta a eccessiva reticolazione del substrato

L'uso di concentrazioni troppo elevate di eparina metacrilata comporta la formazione di agglomerati ai bordi della fotomaschera (Figura 3.2.24).

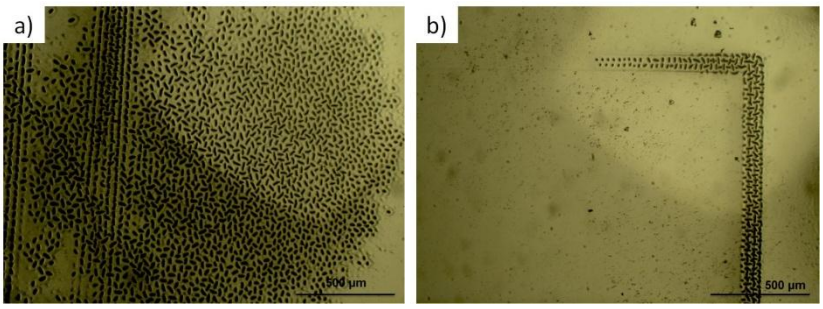


Figura 3.2.24: Immagini al microscopio ottico di campioni con eparina metacrilata in concentrazione troppo elevata: a) agglomerato; b) bordo della maschera.

L'utilizzo di fotomaschere con *dots* ravvicinati causa una disomogeneità dei legami tra eparina metacrilata e substrato. Il *grafting* infatti si concentra nei *dots* più esterni, mentre i *dots* interni non presentano increspature (Figura 3.2.25), probabilmente a causa del fatto che l'eparina presente nella goccia di soluzione si distribuisca principalmente lungo i bordi, in modo analogo ai problemi di asciugatura della goccia di fotobiotina riscontrati in §3.2.2.

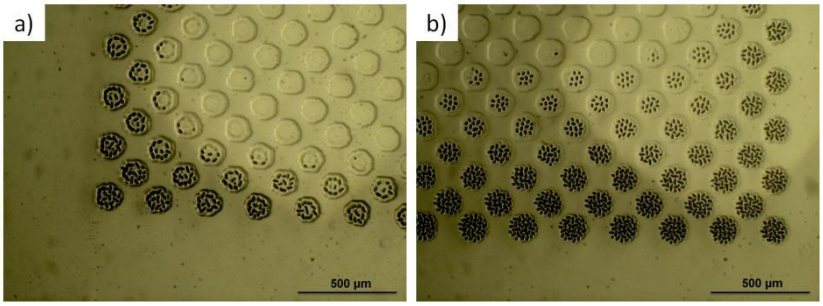


Figura 3.2.25: Immagini al microscopio ottico di eparina metacrilata su blend nel caso di *pattern,* a), b), con *dots* ravvicinati (10 µm in direzione y).

3.3 Test cellulari statici

Sono stati effettuati dei test cellulari statici preliminari sugli *arrays* di eparina ottenuti su substrati di blend sia tramite µ-CP che tramite fotolitografia. Essi permettono di validare l'effettiva capacità da parte dell'eparina di immobilizzare selettivamente (*sorting*) globuli rossi infetti da un campione di sangue infettato da malaria, dunque comprendente anche globuli rossi sani.

Gli *arrays* sono stati incubati con un campione di sangue infetto contenente sia eritrociti infetti (5% allo stadio finale) che sani. Dopo 1 ora i campioni sono stati sciacquati per rimuovere le cellule eventualmente adese aspecificatamente. Per visualizzare se le cellule immobilizzate sugli *spots* di eparina fossero infette o meno i campioni sono stati trattati

con un processo di colorazione Giemsa. Tale colorante si intercala selettivamente al DNA, e dal momento che i globuli rossi sani sono privi di nucleo, e quindi di materiale genico, l'unico DNA che si colora è quello del parassita.

Come si vede dalle immagini in figura 3.3.1, i globuli rossi non infetti, privi di nucleo, si presentano così in un grigio uniforme (Figura 3.3.1.a), quelli in cui, invece, è presente il *Plasmodium* presentano il citoplasma di colore blu, mentre il materiale genomico all'interno del nucleo varia dal rosso al porpora (Figura 3.3.1 b, c, d).

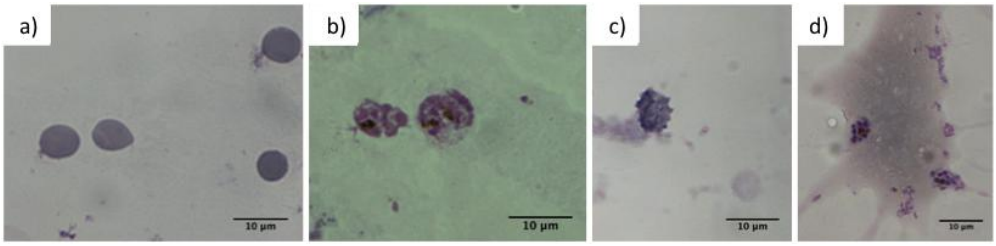


Figura 3.3.1: a) globuli rossi non infetti aderiscono al substrato blend privo di *pattern*; b) c) e d) i globuli rossi infettati da *P.falciparum* aderiscono in corrispondenza dei *dots* di eparina. il DNA del parassita appare viola.

Immagini di microscopia ottica ottenuti sui campioni testati con le cellule e trattati col Giemsa mostrano come le cellule tendano a formare agglomerati non geometricamente ben definiti, ma di dimensioni riconducibili al *pattern* sottostante di eparina, anche se con bassa risoluzione spaziale. La non perfetta distribuzione è, probabilmente, dovuta al fatto che i *patterns* ottenuti non sempre presentavano una risoluzione ottimale. Infatti, come riportato in §3.2.1 l'asciugatura della goccia di fotobiotina sulla replica utilizzata nel µ-CP comporta un accumulo di materiale ai bordi, causando di conseguenza l'accumulo anche di eparina e di cellule durante i test statici. Questo fenomeno risulta visibile anche nella figura 3.3.4.

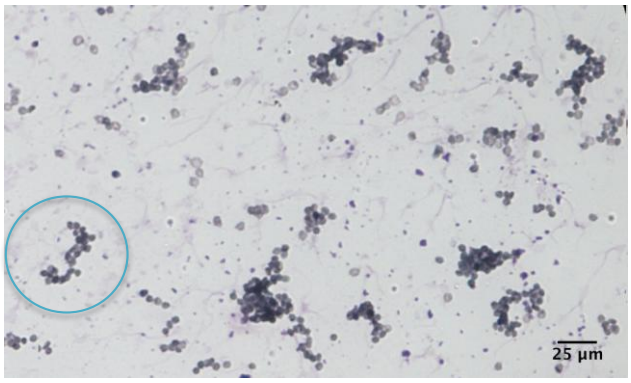


Figura 3.3.2: globuli rossi formano agglomerati in corrispondenza degli *spots* di eparina.

Dall'analisi delle immagini ad elevate risoluzioni prese con microscopio ottico è stato possibile osservare due fenomeni sui campioni. In alcuni casi si sono formati grossi agglomerati di globuli rossi in corrispondenza degli *spots* (Figura 3.3.2). In un singolo agglomerato è difficile mettere a fuoco simultaneamente tutte le cellule in quanto queste sono disposte su superfici con elevata rugosità e quindi disposte su differenti piani focali. Di conseguenza definire se una cellula adesa risulta infetta osservando un'unica immagine può risultare ingannevole e fraintendibile. Tuttavia, le cellule che costituiscono agglomerati appaiono di colore porpora, fatto che conferma la presenza del parassita. I globuli rossi sani vengono parzialmente adsorbiti in modo aspecifico a causa delle condizioni statiche mantenute durante i test effettuati (Figura 3.3.3.a). Analizzando altri campioni, si nota come poche cellule vengano immobilizzate, ma esse presentano citoplasma selettivamente colorato in blu e DNA in porpora, a conferma della presenza del parassita (Figura 3.3.1.b).

Inoltre, su alcuni *spots* sono presenti solamente frammenti di DNA libero del parassita. Infatti, durante il risciacquo del campione è possibile la rottura della membrana cellulare con conseguente rilascio del parassita e di frammenti di DNA al di fuori del globulo rosso. Questi frammenti vengono immobilizzati in corrispondenza dei *dots* di eparina (Figura 3.3.3.b) sul substrato. Un simile comportamento viene indicato in letteratura [66], dove si riporta il legame selettivo tra eparina libera in soluzione e frammenti del DNA del parassita liberi in soluzione.

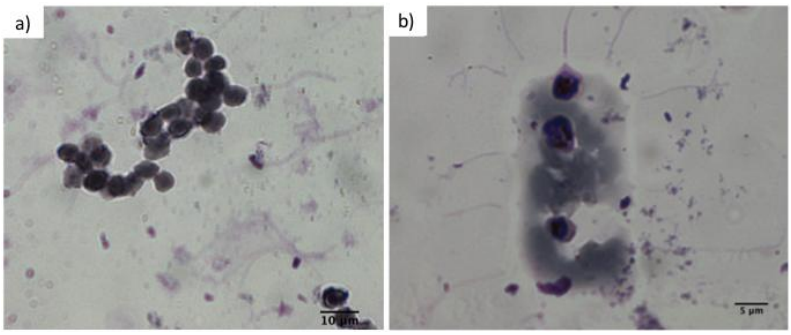


Figura 3.3.3: a) Agglomerati di globuli rossi costituiti sia da cellule infette sia da cellule sane; b) Cellule infette e frammenti di DNA immobilizzati sullo *spot* di eparina.

Nelle figure 3.3.4 e 3.3.5 si osserva la disposizione di cellule infette lungo gli *spots* di eparina.

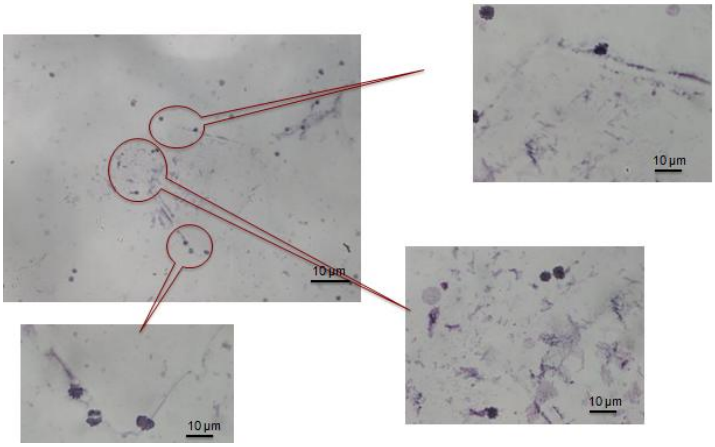


Figura 3.3.4: Cellule infette disposte lungo gli *spots* di eparina. In questo caso lo *spot* presenta una geometria triangolare.

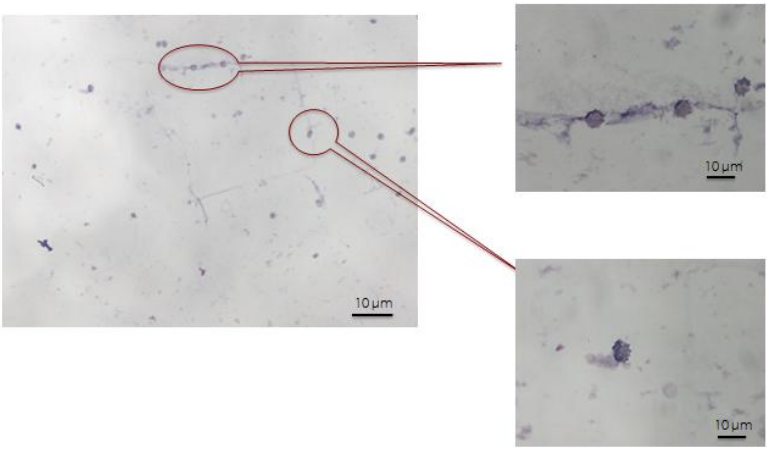


Figura 3.3.5: Cellule infette disposte lungo gli *spots* di eparina. In questo caso lo *spot* presenta una geometria quadrata.

In conclusione, i test statici preliminari confermano la possibilità di sfruttare gli *arrays* di eparina realizzati su substrati *fouling-release* in blend per immobilizzare selettivamente globuli rossi infetti provenienti da un campione di sangue costituito da una popolazione eterogenea di eritrociti sani e malati.

In futuro per eliminare il fenomeno di adsorbimento aspecifico di globuli rossi sani sarà interessante validare il meccanismo di riconoscimento eparina-eritrociti infetti tramite test eseguiti in condizioni dinamiche. L'integrazione degli *arrays* all'interno di dispositivi microfluidici consente, infatti, di simulare queste condizioni, e permette di sfruttare le proprietà *fouling-release* dei substrati, grazie alle quali le forze idrodinamiche causano il distacco dei globuli rossi sani aspecificatamente adesi. A tal scopo prove preliminari di realizzazione di microcanali sono riportate nel paragrafo seguente §3.4. E' necessario

segnalare infine che non esistono dati sul comportamento di globuli rossi infetti su superfici in PFPE.

3.4 Metodi di fabbricazione di microcanali

3.4.1 Fotolitografia

Nel corso di questo lavoro di tesi sono stati fabbricati dei prototipi di dispositivi microfluidici in PFPE-DMAs. Gli *arrays* di eparina realizzati come descritto in §2.2.1, possono successivamente essere integrati all'interno di questi dispositivi permettendo di aumentare la selettività nel processo di immobilizzazione delle cellule *target*. Infatti, eventuali cellule adese aspecificatamente potrebbero essere rimosse dalle forze idrodinamiche esercitate dai fluidi in movimento in fase di coltura evitando così l'adesione aspecifica degli eritrociti non infetti e la rimozione di cellule adese aspecificatamente.

La fotolitografia è il primo metodo utilizzato per la fabbricazione di microcanali. Il processo si può riassumere nei seguenti *steps*:

- preparazione di un strato in PFPE-DMA 2000 tramite esposizione ai raggi UV per 25s corrispondente a una percentuale di reticolazione di circa il 55% (*layer* I).
- Preparazione di uno strato di PFPE-DMA 2000 deposto sopra al *layer* I (*layer* II).
- Esposizione del *layer* II per 25s (55% circa di conversione), filtrando la radiazione UV attraverso una fotomaschera disegnata con la geometria del canale che si intende riprodurre.
- Sviluppo del canale in acetone. Realizzazione di un substrato di blend (*layer* III) funzionalizzato con un *pattern* di fotobiotina sfruttando il processo di μ-CP descritto precedentemente in §2.2.1.
- *Bonding* tra il sistema costituito dal *layer* I e II con il *layer* III tramite esposizione agli UV dopo averli messi a contatto. L'esposizione agli UV permette di completare la conversione dei *layers*.

La figura 3.4.1 mostra il dispositivo microfluidico ottenuto.

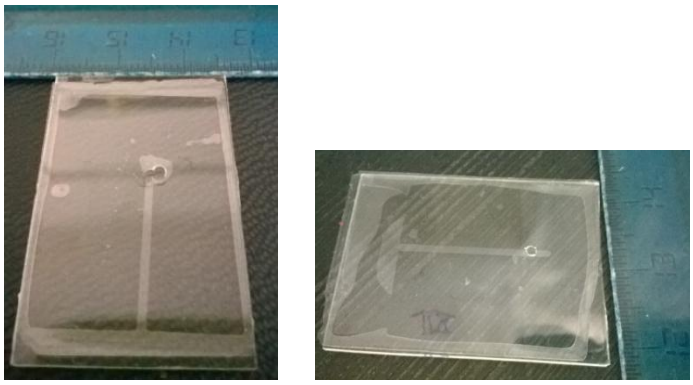


Figura 3.4.1: Microcanali ottenuti con fotolitografia in cui è stato praticato un *inlet* tramite punzonatura.

3.4.2 Replica *Molding*

I microcanali in PFPE-DMAs sono stati fabbricati anche sfruttando la tecnica *soft*-litografica di replica *molding*. Il processo può essere riassunto nei seguenti passaggi:

- Uno stampo microstrutturato in PFPE-DMA 2000 viene realizzato colando la miscela di prepolimero e fotoiniziatore su un *master* in SU8 ed esponendo ai raggi UV. Il tempo di esposizione necessario per ottenere uno stampo massivo con percentuale di conversione di circa il 50% è maggiore rispetto a quanto richiesto per raggiungere la stessa conversione con i film "*thin*" (§3.1.1). Per questo motivo il campione è stato esposto per 60 s (*layer* 1).
- Realizzazione di un substrato di blend (*layer* 2) funzionalizzato con un *pattern* di fotobiotina sfruttando il processo di μ-CP, descritto in precedenza in §2.2.1.
- I due *layers* sono posti a contatto ed esposti ai raggi UV per ottenere il *bonding*.

Il dispositivo chiuso è riportato in figura 3.4.2. La geometria del canale non è tuttavia ben definita. Infatti lo strato iniziale di PFPE-DMA 4000 depositato al di sopra del *master* viene realizzato con una quantità massiva di materiale, e di conseguenza possiede uno spessore maggiore. Variando lo spessore del *layer* è necessario ottimizzare la cinetica di reticolazione che è fortemente influenzata da questo parametro (§3.1.1.2). Tempi ottimali di esposizione corrispondono a una percentuale di conversione che assicuri sia la presenza di doppi legami residui sulla superficie necessari per il *bonding*, sia una struttura reticolata che permetta la replica del *master* con buona risoluzione.

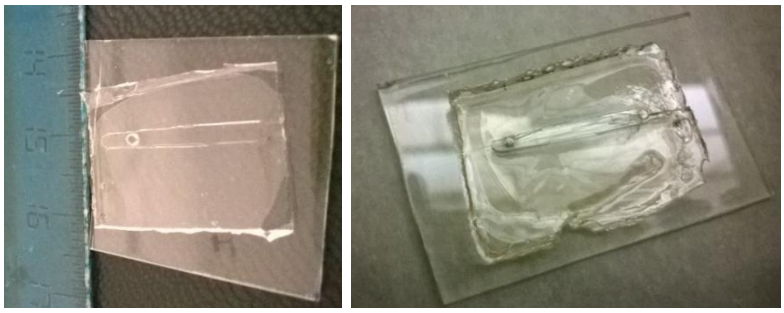


Figura 3.4.2: Microcanali realizzati tramite replica *molding*.

La tenuta e la pervietà dei canali ottenuti con il processo di fotolitografia e di replica *molding* sono state valutate qualitativamente flussando soluzione fluorescente all'interno del canale attraverso un *inlet* realizzato tramite punzonatura. Come si può notare nelle immagini riportate (Figura 3.4.3), entrambi i canali permettono il passaggio della fluoresceina, a conferma sia dell'effettivo *bonding* tra le superfici, sia della tenuta del canale, che non risulta collassato.

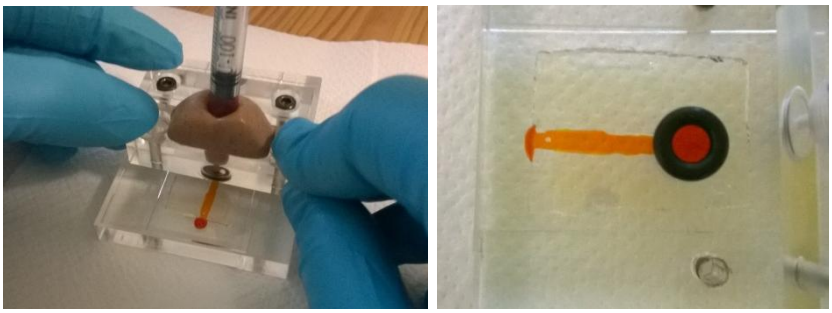


Figura 3.4.3: Prova di *leakage* su microcanali.

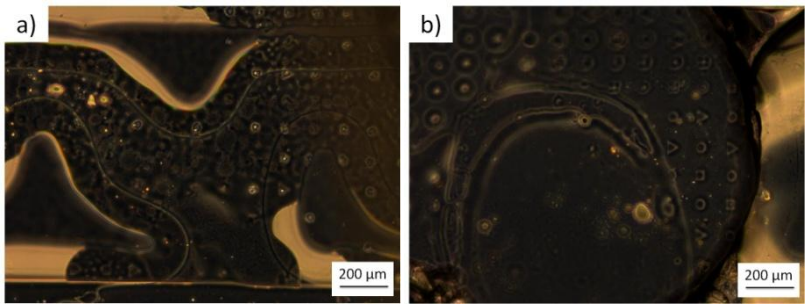


Figura 3.4.4: a), b) immagini al microscopio ottico del dispositivo microfluidico con *pattern* di avidina-FITC interno al canale.

Non è stata possibile la visualizzazione del *pattern* di avidina-FITC autoassemblata sulla fotobiotina tramite microscopio a fluorescenza, a causa di un forte segnale di rumore causato dall'autofluorescenza del PFPE-DMA 2000 (§3.2.1).

La sezione trasversale dei microcanali in PFPE-DMA è stata osservata al SEM, in modo da valutarne la dimensione e la morfologia. Come è possibile notare nelle figure 3.4.5, i microcanali non risultano collassati. Le dimensioni ottenute sono di 2mm x 150µm nel caso dei microcanali realizzati tramite replica *molding*, e di 1mm x 30µm nel caso di microcanali fabbricati tramite fotolitografia.

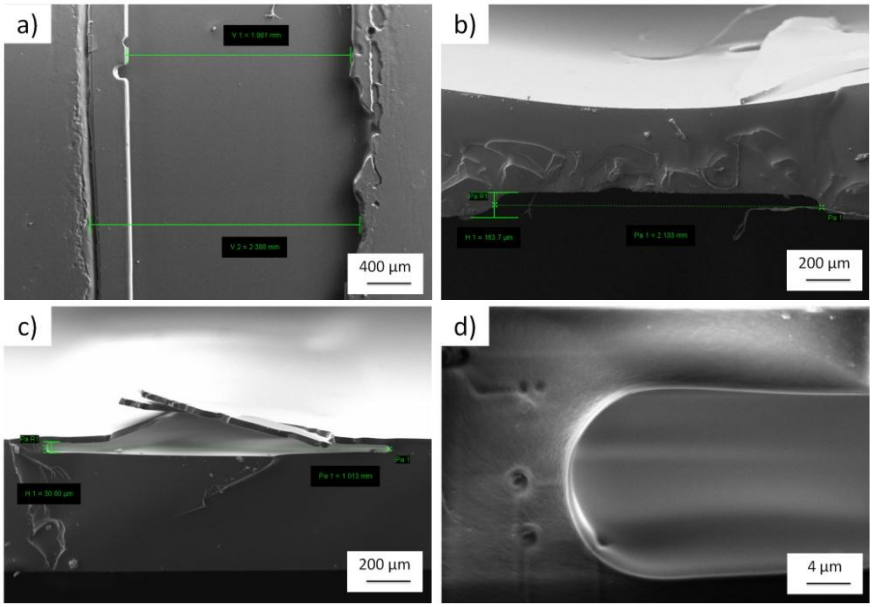


Figura 3.4.5: Immagini al SEM di microcanali fabbricati con, a) e b), replica *molding* e, c) e d), fotolitografia.

La scarsa risoluzione dei canali realizzati è dovuta alla rifrazione laterale della radiazione UV in fase di esposizione. Il parametro relativo al tempo di esposizione ai raggi UV risulta da ottimizzare, non solo per migliorare la capacità di replica del PFPE-DMA, ma anche, nel caso della fotolitografia, per evitare sovraesposizione e conseguente scarsa risoluzione geometrica.

3.4.3 Superfici di PFPE-DMAs microstrutturate

Nel caso dei PFPE-DMAs la *soft*-litografia può essere sfruttata anche per realizzare substrati 3D microstrutturati, in modo analogo a quanto descritto per la realizzazione delle repliche in PDMS utilizzate per il µ-CP.

Le repliche microstrutturate in PFPE-DMAs possono essere successivamente funzionalizzate con eparina biotinilata sfruttando il processo di µ-CP descritto in §2.2.1, che prevede il *photografting* della fotobiotina selettivo sulla superfici delle microstrutture e l'autoassemblaggio di eparina biotinilata, sfruttando la neutravidina come *linker*

intermedio. Le superfici microstrutturate funzionalizzate possono essere successivamente accoppiate con un microcanale in PFPE-DMA. La presenza delle microstrutture aumenta la probabilità di interazione dell'eparina con le cellule *target*, in quanto viene ridotta l'area di passaggio del fluido, e permettere una maggiore immobilizzazione selettiva in condizioni dinamiche. I substrati sono stati realizzati sia in blend sia in PFPE-DMA 2000.
Come dimostrato dalle immagini di microscopia ottica ed elettronica (Figure 3.4.6 e 3.4.7), il PFPE replica la microstruttura del *master* con elevata risoluzione.

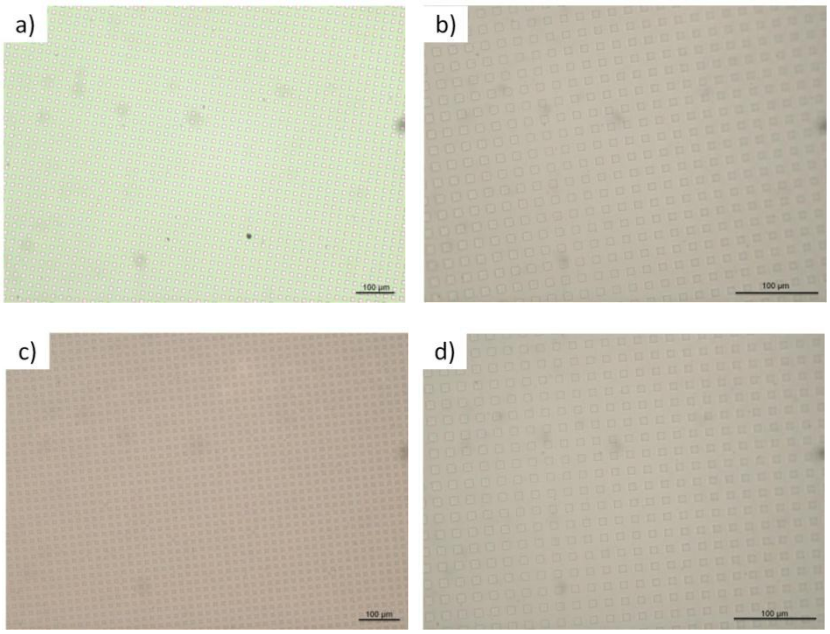


Figura 3.4.6: a) *Master* utilizzato come stampo e superfici microstrutturate ottenute in b) PFPE-DMA 2000 e c), d) in blend.

Nella figura 3.4.7 c, le strutture sono alte circa 0,5 µm.

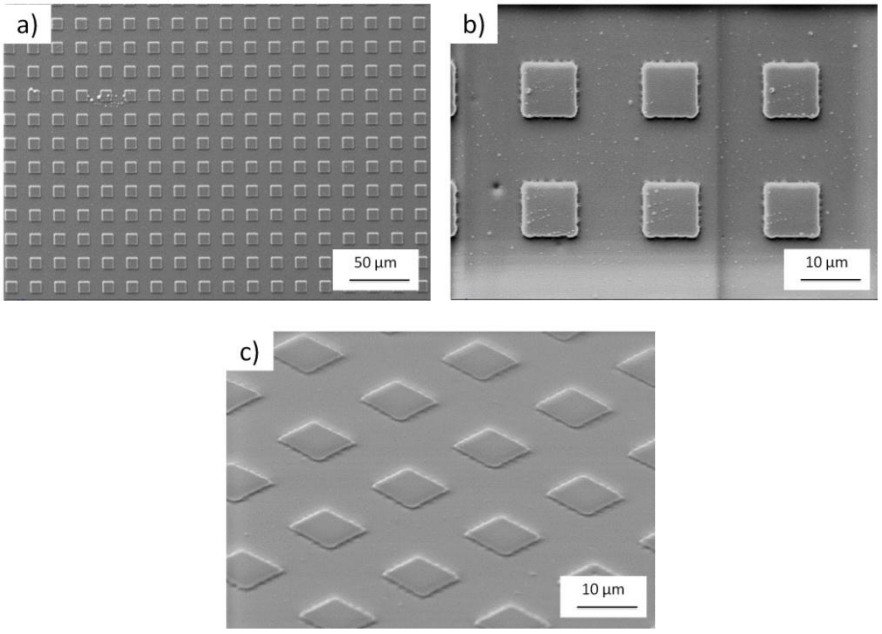


Figura 3.4.7: Immagini al SEM a), b) di substrati microstrutturati in PFPE-DMAs a ingrandimenti differenti; la figura c) è stata ottenuta inclinando il campione di 68° per valutare l'altezza delle microstrutture ottenute.

Prima di assemblare il dispositivo microfluidico integrato con l'*array* di eparina, è stato validato il processo di *photografting* della fotobiotina sulla superficie microstrutturata. Per la validazione dello *step* di *grafting* della fotobiotina, l'*array* viene incubato con avidina-FITC. L'utilizzo dell'avidina fluorescente (§3.2.2) permette la visualizzazione dei *pattern*s ottenuti con il microscopio a fluorescenza (figura 3.4.8). Il segnale in fluorescenza dell'*array* non è omogeneo, indice di un *printing* non uniforme. In particolare la fotobiotina risulta concentrata ai bordi delle microstrutture. Questa disomogeneità può essere riconducibile a due fattori: la scarsa planarità della superficie microstrutturata in blend, e le sue proprietà di relativa rigidezza non ne consentono il *conformal contact* in fase di *inking* (§3.2.2). Conseguentemente solo alcune aree della microstruttura sono a contatto con la soluzione di fotobiotina, e il *grafting* della biomolecola non è possibile nelle zone non a contatto; inoltre è possibile che l'asciugatura della goccia di soluzione di fotobiotina sulla superficie in PFPE-DMA microstrutturata non risulti omogenea, in modo analogo alle problematiche riscontrate per le repliche in PDMS nella procedura di µ-CP (§3.2.2).

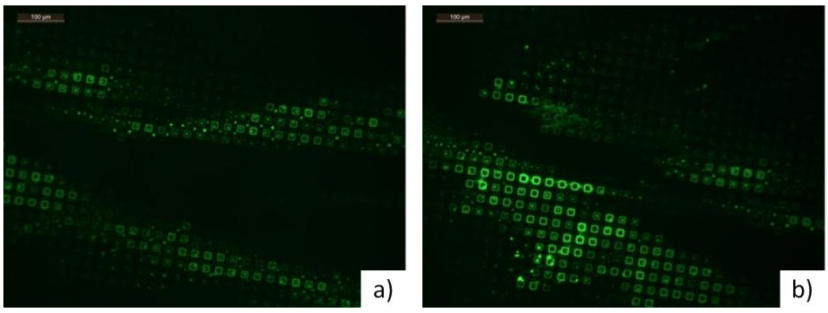


Figura 3.4.8: a), b) Immagini al microscopio fluorescente di substrati microstrutturati funzionalizzati con avidina-FITC.

Il *grafting* di eparina sulle superfici microstrutturate in blend in seguito a colorazione con Alcian Blue, è stato verificato tramite microscopio ottico. Tuttavia le immagini ottenute (non riportate), non permettono una visualizzazione della colorazione, in modo analogo a quanto riportato in §3.2.2.

Le prove preliminari effettuate, sebbene alcuni parametri debbano essere ancora ottimizzati, confermano la possibilità di realizzare dispositivi interamente in PFPE-DMAs che integrino una microstruttura funzionalizzata con esche biomolecolari, atti all'immobilizzazione selettiva di cellule rare, in condizioni dinamiche.

Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi, l'obiettivo principale è stato quello di realizzare *patterns* funzionalizzati con eparina su superfici con proprietà *antifouling/fouling-release*, come i perfluoropolieteri dimetacrilati (PFPE-DMAs), allo scopo di immobilizzare e isolare in modo selettivo globuli rossi infetti dal parassita della malaria. Sono stati sintetizzati PFPE-DMAs fotoreticolabili caratterizzati da ottime proprietà *antifouling* e *fouling-release* e su di essi si sono, quindi, ottenute differenti tipologie di *patterns* funzionalizzati con eparina. Due tecniche di *patterning* sono state sviluppate e ottimizzate per l'ottenimento di questi *arrays*: il *micro-contact printing* per funzionalizzare superfici di PFPE-DMAs con eparina biotinilata, sfruttando la nota interazione avidina-biotina; la fotolitografia per ottenere, invece, *patterns* con eparina metacrilata legata in maniera diretta al PFPE-DMA.

Controllando la cinetica di reticolazione dei PFPE-DMAs è possibile controllare la presenza in superficie di doppi legami C=C non reagiti, che sono stati sfruttati nelle strategie di *patterning* adottate per l'immobilizzazione delle molecole.

Tre sono i PFPE-DMAs che sono stati utilizzati: il PFPE-DMA 4000, il PFPE-DMA 2000, e un blend costituito da una miscela 50:50 dei due materiali. I materiali sono stati caratterizzati tramite l'analisi della cinetica di reticolazione, l'analisi dinamico-meccanica, l'individuazione delle temperature di transizione e la misura dell'angolo di contatto e dell'energia superficiale, cercando una possibile relazione tra la loro struttura e le proprietà meccaniche e superficiali. Le proprietà *antifouling* e *fouling-release*, sono state sia indagate in un precedente lavoro, i cui risultati indicano il PFPE-DMA 4000 come miglior candidato, sia validate da successivi test. La necessità di utilizzare materiali con questo tipo di proprietà è dovuta all'esigenza di evitare l'adsorbimento di proteine e l'adesione di cellule in maniera non specifica sulle superfici realizzate. Dall'analisi delle varie proprietà esaminate si è giunti alla conclusione di utilizzare come substrato per la realizzazione dei *patterns* un blend 50:50 di PFPE-DMAs.

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) e la fotocalorimetria (DSC-UV) sono state sfruttate per l'analisi della cinetica di reticolazione dei PFPE-DMAs, e per ricavare le curve di conversione del materiale in funzione del tempo di esposizione agli UV. Tale relazione ha permesso di ottimizzare il tempo di esposizione dei substrati agli UV per ottenere un film di polimero con doppi legami C=C residui che possono essere sfruttati nelle strategie di *grafting* delle molecole esca. Per la realizzazione dei *patterns* i substrati

in blend sono stati esposti alla radiazione UV per 20s corrispondente a una percentuale di conversione compresa di circa il 50 %.

La DSC e la DMA hanno, inoltre, permesso l'individuazione delle due temperature di transizione vetrosa del blend, -111°C e 15°C, relative, rispettivamente, alla catena in fluorocarbonio alla parte uretano-metacrilica.

Una caratterizzazione superficiale, tramite misure di angolo di contatto, ha mostrato il comportamento idrofobico dei PFPE-DMAs.

In conclusione, come già detto, il blend è risultato, dall'analisi dei risultati ottenuti, il materiale con adeguate proprietà di superficie e meccaniche per favorire la realizzazione dei *patterns* e permettere le analisi a contatto con le cellule e le proteine limitando le adesioni non volute.

Dopo la caratterizzazione dei materiali, sono state studiate e ottimizzate strategie di *patterning* per la funzionalizzazione di substrati di blend di PFPE-DMAs.

Nel primo processo utilizzato come strategia di *grafting*, l'*array* di eparina viene realizzato legando selettivamente l'eparina biotinilata al sottostante *pattern* di avidina che funge da *linker* intermedio con un *array* di fotobiotina realizzato sul blend attraverso un processo di *micro-contact printing.* In generale, l'*array* di neutravidina legato alla fotobiotina potrebbe essere sfruttato come piattaforma versatile per l'immobilizzazione di una qualsiasi molecola esca biotinilata che può essere scelta a seconda della cellula *target* che si vuole catturare. Biomolecole marcate con fluorofori, sono state sfruttate per validare l'efficienza dei vari *steps* del processo di *grafting* della fotobiotina e in seguito dell'eparina. L'autoassemblaggio di molecole con il procedere degli *steps* è supportata da una crescita degli *spots* studiata tramite analisi con microscopio a forza atomica. Il processo fotolitografico sviluppato sfrutta, invece, la reazione tra gruppi metacrilici coniugati all'eparina con doppi legami C=C non reagiti presenti sulla superficie del blend. Il *grafting* diretto dell'eparina su blend tramite fotolitografia senza l'utilizzo di *linker* intermedi permette di semplificare la procedura di immobilizzazione della biomolecola, aumentando l'efficacia e la replicabilità del processo di *patterning* rispetto a quanto ottenuto con il *micro-contact printing*.

L'effettiva capacità di interazione preferenziale degli *arrays* di eparina nei confronti di globuli rossi infettati da malaria è stata verificata tramite test cellulari statici, effettuati incubando gli *arrays* con un campione di sangue infetto costituito sia da globuli rossi sani

che globuli rossi infetti. Risultati preliminari mostrano la tendenza delle cellule ad interagire preferenzialmente col substrato di blend funzionalizzato formando agglomerati in corrispondenza degli *spots* di eparina, inoltre il comportamento *antifouling* delle superfici non favorisce l'adesione aspecifica di cellule sul resto della superficie.

Con lo scopo di incrementare la selettività di cattura degli *arrays* di eparina su blend e di sfruttare le proprietà di *fouling-release* del substrato stesso, gli *arrays* di eparina su blend possono essere integrati in dispositivi microfluidici, in grado di simulare le condizioni dinamiche tipiche del circolo sanguigno. Questi dispositivi permetterebbero di sviluppare farmaci antimalarici in condizioni dinamiche, più vicine alle condizioni fisiologiche, studiando le risposte delle cellule immobilizzate nel microcanale al passaggio del flusso di farmaco. Tali dispositivi possono integrare superfici 2D e 3D funzionalizzate con l'*array* di eparina. A tal scopo sono stati fabbricati i primi prototipi di microcanali in PFPE-DMAs, tramite fotolitografia e replica *molding*; questi dispositivi sono caratterizzati da buona tenuta e non si osservano fenomeni di *leakage*. Per l'integrazione di superfici 2D prove preliminari di integrazione del *pattern* all'interno dei canali sono state effettuate, accoppiando la superficie funzionalizzata col canale. Allo stesso modo, una superficie 3D funzionalizzata può essere allineata all'interno del canale: per questo motivo sono state realizzate superfici microstrutturate in PFPE-DMAs. Il vantaggio di una superficie microstrutturata funzionalizzata rispetto a quella 2D consiste nel favorire l'interazione con le cellule *target* in quanto la presenza di zone rialzate va a ridurre la sezione di passaggio di tutte le cellule iniettate.

In conclusione, lo studio effettuato in questo lavoro di tesi ha permesso di conseguire interessanti risultati, riassumibili nei seguenti punti:

- selezione e caratterizzazione di materiali polimerici (PFPE-DMAs) contraddistinti da ottime proprietà *antifouling* e *fouling-release*, e la cui struttura ha gruppi funzionali che possono essere sfruttati per il legame con biomolecole aventi gruppi fotoreattivi, necessaria alla realizzazione del *pattern*. Individuazione del miglior candidato con coniughi i vantaggi dei due PFPE-DMAs analizzati (blend), in termini di proprietà *antifouling* e di efficacia del *grafting*.
- Sviluppo e ottimizzazione di protocolli di *patterning*, che presentino caratteristiche di versatilità (*micro-contact printing*) e di facilità d'uso e implementazione (fotolitografia) e che siano efficienti per il *grafting* di biomolecole.

- Realizzazione su substrati *antifouling* di *microarrays* di eparina in grado di effettuare un'immobilizzazione selettiva delle cellule *target* (globuli rossi infettati da malaria) e di evitare l'adesione aspecifica di proteine e cellule non *target*.
- Fabbricazione di dispositivi microfluidici in PFPE-DMAs integranti superfici bidimensionali e tridimensionali funzionalizzate.

La possibilità di realizzare su superfici *antifouling* funzionalizzate con *microarrays* di eparina con funzione di esca per la cattura di globuli rossi infettati da malaria può presentare diverse prospettive per il futuro in ambito biomedicale, soprattutto nello studio dell'interazione tra eparina e globulo rosso per lo sviluppo di farmaci selettivi nei confronti delle cellule infette. Inoltre l'ampia versatilità dell'interazione tra avidina e biotina utilizzata nel protocollo di *micro-contact printing*, permette di sfruttare esche biomolecolari funzionalizzate con biotina che abbiano affinità per cellule rare. E' possibile, inoltre, variare la dimensione degli *spots*, al fine di immobilizzare singole cellule sulla superficie.

Alcuni protocolli presenti in questa tesi sono stati implementati solo in stadi iniziali, possono dunque essere sviluppati in modo più approfondito in futuro. In particolare, emerge la necessità di validare l'immobilizzazione selettiva di cellule anche in condizioni dinamiche, tramite l'integrazione di superfici con *patterns* funzionalizzati all'interno di dispositivi microfluidici. I protocolli utilizzati per la fabbricazione di microcanali e di superfici in PFPEs microstrutturate necessitano di un'ottimizzazione dei parametri e di una maggiore progettazione nell'ambito di variabili biofluidodinamiche. Inoltre la caratterizzazione dei microcanali è stata per lo più effettuata tramite metodi ottici, senza valutare la resistenza meccanica e alla pressione degli stessi. E' necessaria l'ottimizzazione del protocollo di *micro-contact printing* nella fase di realizzazione del *pattern* integrato, in particolare per quanto riguarda la fase di incubazione e di rimozione delle biomolecole in eccesso. Anche nel caso della funzionalizzazione delle superfici in PFPEs microstrutturate è necessario perfezionare alcuni aspetti, al fine di ottenere un *grafting* omogeneo, evitando il collasso delle strutture. L'obiettivo futuro è la realizzazione di dispositivi che simulino le condizioni fisiologiche e che permettano di sfruttare al meglio le caratteristiche dei materiali individuati.

Bibliografia

[1] Veiseh, M., Zareie, M. H. & Zhang, M. Highly Selective Protein Patterning on Gold−Silicon Substrates for Biosensor Applications. *Langmuir* **18,** 6671–6678 (2002).

[2] Chen, C. S. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science (80-.).* **276,** 1425–1428 (1997).

[3] Asthana, A., Asthana, Y., Sung, I.-K. & Kim, D.-P. Novel transparent poly(silazane) derived solvent-resistant, bio-compatible microchannels and substrates: application in microsystem technology. *Lab Chip* **6,** 1200–1204 (2006).

[4] Yarmush, M. L. & King, K. R. Living-cell microarrays. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11,** 235–257 (2009).

[5] Castel, D., Pitaval, A., Debily, M.-A. & Gidrol, X. Cell microarrays in drug discovery. *Drug Discov. Today* **11,** 616–22 (2006).

[6] Théry, M. *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* **7,** 947–953 (2005).

[7] El-Ali, J., Sorger, P. K. & Jensen, K. F. Cells on chips. *Nature* **442,** 403–411 (2006).

[8] Xu, T., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J. J. & Boland, T. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* **26,** 93–99 (2005).

[9] Huang, Y. *et al.* Dielectrophoretic cell separation and gene expression profiling on microelectronic chip arrays. *Anal. Chem.* **74,** 3362–3371 (2002).

[10] Gong, P. & Grainger, D. W. Nonfouling surfaces: a review of principles and applications for microarray capture assay designs. *Methods Mol. Biol.* **381,** 59–92 (2007).

[11] Falsey, J. R., Renil, M., Park, S., Li, S. & Lam, K. S. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug. Chem.* **12,** 346–353 (2001).

[12] Belov, L., De la Vega, O., Dos Remedios, C. G., Mulligan, S. P. & Christopherson, R. I. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res.* **61,** 4483–4489 (2001).

[13] Flaim, C. J., Chien, S. & Bhatia, S. N. An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. *Nat. Methods* **2,** 119–125 (2005).

[14] Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8,** 1775–1789 (2007).

[15] Ganesan, R., Kratz, K. & Lendlein, A. Multicomponent protein patterning of material surfaces. *Journal of Materials Chemistry* **20,** 7322 (2010).

[16] Blawas, A. S. & Reichert, W. M. Protein patterning. *Biomaterials* **19,** 595–609 (1998).

[17] Norde, W. & Lyklema, J. Why proteins prefer interfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2,** 183–202 (1991).

[18] Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schröder, H., Niemeyer, C. M. & Waldmann, H. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew. Chemie Int. Ed.* **47,** 9618–9647 (2008).

[19] Savage, D. *et al.* in *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook* 1–23 (1992).

[20] Choi, H. J., Kim, N. H., Chung, B. H. & Seong, G. H. Micropatterning of biomolecules on glass surfaces modified with various functional groups using photoactivatable biotin. *Anal. Biochem.* **347,** 60–66 (2005).

[21] Schena M. *DNA Microarrays: A Practical Approach*, Oxford University Press, 1999.

[22] Cagnin S, Cimetta E, Guiducci C, Martini P, Lanfranchi G. Overview of Micro- and Nano-Technology Tools for Stem Cell Applications: Micropatterned and Microelectronic Devices. *Sensors* 2012; **12**(11)**:** 15947-15982.

[23] Rebollar E, Frischauf I, Olbrich M, Peterbauer T, Hering S, Preiner J *et al.* Proliferation of aligned mammalian cells on laser-nanostructured polystyrene. *Biomaterials* 2008; **29**(12)**:** 1796-1806.

[24] Bettinger CJ, Zhang Z, Gerecht S, Borenstein JT, Langer R. Enhancement of In Vitro Capillary Tube Formation by Substrate Nanotopography. *Advanced Materials* 2008; **20**(1)**:** 99-103.

[25] Teixeira AI, McKie GA, Foley JD, Bertics PJ, Nealey PF, Murphy CJ. The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* 2006; **27**(21)**:** 3945-3954.

[26] Kane, R. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* **20,** 2363–2376 (1999).

[27] Scouten, W. H. [2] A survey of enzyme coupling techniques. *Methods in Enzymology* **135,** 30–65 (1987).

[28] Cabral, J. M. & Kennedy, J. F. Covalent and coordination immobilization of proteins. *Bioprocess Technol.* **14,** 73–138 (1991).

[29] Waser R. *Nanoelectronics and Information Technology*, Wiley, 2005.

[30] Kaufmann, T. & Ravoo, B. J. Stamps, inks and substrates: polymers in microcontact printing. *Polymer Chemistry* **1,** 371 (2010).

[31] Bernard, A., Renault, J. P., Michel, B., Bosshard, H. R. & Delamarche, E. Microcontact printing of proteins. *Adv. Mater.* **12,** 1067–1070 (2000).

[32] Lee, J. N., Park, C. & Whitesides, G. M. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **75,** 6544–6554 (2003).

[33] Olander, B., Wirsén, A. & Albertsson, A. C. Oxygen microwave plasma treatment of silicone elastomer: Kinetic behavior and surface composition. *J. Appl. Polym. Sci.* **91,** 4098–4104 (2004).

[34] James *al.* Patterned protein layers on solid substrates by thin stamp microcontact printing. *Langmuir* **14,** 741–744 (1998).

[35] Mayer M, Yang J, Gitlin I, Gracias DH, Whitesides GM. Micropatterned agarose gels for stamping arrays of proteins and gradients of proteins. *PROTEOMICS* 2004; **4**(8)**:** 2366-2376.

[36] Foley J, Schmid H, Stutz R, Delamarche E. Microcontact printing of proteins inside microstructures. *Langmuir* 2005; **21**(24)**:** 11296-303.

[37] Schmalenberg KE, Buettner HM, Uhrich KE. Microcontact printing of proteins on oxygen plasma-activated poly(methyl methacrylate). *Biomaterials* 2004; **25**(10)**:** 1851 7.

[38] Hyun J, Chilkoti A. Micropatterning biological molecules on a polymer surface using elastomeric microwells. *J Am Chem Soc* 2001; **123**(28)**:** 6943-4.

[39] Qin D, Xia YN, Whitesides GM. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature Protocols* 2010; **5**(3)**:** 491-502.

[40] Kumar A, Whitesides GM. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ``ink" followed by chemical etching. *Applied Physics Letters* 1993; **63**(14)**:** 2002-2004.

[41] Perl A, Reinhoudt DN, Huskens J. Microcontact Printing: Limitations and Achievements. *Advanced Materials* 2009; **21**(22)**:** 2257-2268.

[42] Wendeln C, Ravoo BJ. Surface Patterning by Microcontact Chemistry. *Langmuir* 2012; **28**(13)**:** 5527-5538.

[43] Xia, Y. & Whitesides, G. M. SOFT LITHOGRAPHY. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28,** 153–184 (1998).

[44] Whitesides, G. & Ostuni, E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu.Rev.*…(2001).at<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bioeng.3.1.335>.

[45] Pandurangi RS, Lusiak P, Desai S, Kuntz RR. Chemistry of Bifunctional Photoprobes: 4. Synthesis of the Chromogenic, Cleavable, Water Soluble, and Heterobifunctional Sulfosuccinimidyl (N-methylamino Perfluoroaryl Azido Benzamido)-ethyl-1,3′-Dithiopropionate: An Efficient Protein Cross-Linking Agent. *Bioorganic Chemistry*; **26**(4)**:** 201-212 (1998).

[46] Wilde LM, Farace G, Roberts CJ, Davies MC, Sanders GH, Tendler SJ *et al.* Molecular patterning on carbon based surfaces through photobiotin activation. *Analyst*; **126**(2)**:** 195-8 (2001)

[47] Hengsakul M, Cass AEG. Protein Patterning with a Photoactivatable Derivative of Biotin. *Bioconjugate Chemistry*; **7**(2)**:** 249-254 (1996).

[48] Bhatia, S. K., Hickman, J. J. & Ligler, F. S. New approach to producing patterned biomolecular assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **114,** 4432–4433 (1992).

[49] Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science (80-.).* **260,** 920–926 (1993).

[50] Rabenstein, D. L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* **19,** 312–331 (2002).

[51] Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation Danielle S.W. Benoit a, Kristi S. Anseth a,b,*Acta Biomaterialia **1** 461–470(2005).

[52] Okiro, E. A. *et al.* Age patterns of severe paediatric malaria and their relationship to Plasmodium falciparum transmission intensity. *Malar. J.* **8,** 4 (2009).

[53] Snow, R. W., Korenromp, E. L. & Gouws, E. Pediatric mortality in Africa: Plasmodium falciparum malaria as a cause or risk? in *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **71,** 16–24 (2004).

[54] Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415,** 673–9 (2002).

[55] Udomsangpetch, R. *et al.* Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J. Exp. Med.* **169,** 1835–1840 (1989).

[56] Pasloske, B. L. & Howard, R. J. Malaria, the red cell, and the endothelium. *Annu. Rev. Med.* **45,** 283–295 (1994).

[57] Griffith, K. S., Lewis, L. S., Mali, S. & Parise, M. E. Treatment of malaria in the United States: a systematic review. *JAMA* **297,** 2264–2277 PMID 17519416 (2007).

[58] Barragan, A. *et al.* The Duffy-binding-like domain 1 of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood* **95,** 3594–3599 (2000).

[59] Chen, Q. *et al.* Identification of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) as the Rosetting Ligand of the Malaria Parasite P. falciparum. *J. Exp. Med.* **187,** 15–23 (1998).

[60] Gangnard, S. *et al.* Functional and immunological characterization of the var2CSA-DBL5e{open} domain of a placental Plasmodium falciparum isolate. *Mol. Biochem. Parasitol.* **173,** 115–122 (2010).

[61] Cardin, A. D. & Weintraub, H. J. R. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9,** 21–32 (1989).

[62] Huang, X. J., Guduru, D., Xu, Z. K., Vienken, J. & Groth, T. Immobilization of heparin on polysulfone surface for selective adsorption of low-density lipoprotein (LDL). *Acta Biomater.* **6,** 1099–1106 (2010).

[63] Sperling, C., Salchert, K., Streller, U. & Werner, C. Covalently immobilized thrombomodulin inhibits coagulation and complement activation of artificial surfaces in vitro. *Biomaterials* **25,** 5101–5113 (2004).

[64] Valle-Delgado, J.Urban, P. & Fernandez-Busquets, X. Demonstration of specific binding of heparin to Plasmodium falciparum-infected vs. non-infected red blood cells by single-molecule force spectroscopy. *Nanoscale* **5,** 3673–3680 (2013).

[65] Urbán, P. Estelrich, J. Cortés, A. & Fernàndez-Busquets, X. A nanovector with complete discrimination for targeted delivery to Plasmodium falciparum-infected versus non-infected red blood cells in vitro. *J. Control. Release* **151,** 202–11 (2011).

[66] Marques, J. *et al.* Application of heparin as a dual agent with antimalarial and liposome targeting activities toward Plasmodium-infected red blood cells. *Nanomedicine* **10,** 1719–1728 (2014).

[67] Na-Bangchang, K. & Karbwang, J. Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **23,** 387–409 (2009).

[68] White, N. J. The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends in Parasitology* **18,** 458–464 (2002).

[69] Fernàndez-Busquets, X. Heparin-functionalized nanocapsules: Enabling targeted delivery of antimalarial drugs. *Future Med. Chem.* **5,** 737–739 (2013).

[70] Xu, F. J. *et al.* Spatially well-defined binary brushes of poly(ethylene glycol)s for micropatterning of active proteins on anti-fouling surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **24,** 773–780 (2008).

[71] Kim, P. *et al.* Fabrication of nanostructures of polyethylene glycol for applications to protein adsorption and cell adhesion. *Nanotechnology* **16,** 2420 (2005).

[72] Gingell, D., Owens, N., Hodge, P., Nicholas, C. V & O'Dell, R. Adsorption of a novel fluorescent derivative of a poly(ethylene oxide)/poly(butylene oxide) block copolymer on octadecyl glass studied by total internal reflection fluorescence and interferometry. *J. Biomed. Mater. Res.* **28,** 505–513 (1994).

[73] Malmsten, M., Emoto, K. & Van Alstine, J. M. Effect of Chain Density on Inhibition of Protein Adsorption by Poly(ethylene glycol) Based Coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **202,** 507–517 (1998).

[74] Jo, S. & Park, K. Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s. *Biomaterials* **21,** 605–616 (2000).

[75] Kirby, B. J., Wheeler, A. R., Zare, R. N., Fruetel, J. A. & Shepodd, T. J. Programmable modification of cell adhesion and zeta potential in silica microchips. *Lab Chip* **3,** 5–10 (2003).

[76] Ostuni, E., Grzybowski, B. A., Mrksich, M., Roberts, C. S. & Whitesides, G. M. Adsorption of proteins to hydrophobic sites on mixed self-assembled monolayers. *Langmuir* **19,** 1861–1872 (2003).

[77] Andrade, J. D. & Hlady, V. in *Biopolymers/Non-Exclusion HPLC* **79,** 1–63 (1986).

[78] Kwon, S., Kim, H. Ha, J.-W. & Lee, S.-Y. Prevention of protein and polymeric nanoparticles adsorption using perfluoropolyether. *J. Ind. Eng. Chem.* **17,** 259–263 (2011).

[79] Hu, Z. *et al.* Optically Transparent, Amphiphilic Networks Based on Blends of Perfluoropolyethers and Poly(ethylene glycol). *J. Am. Chem. Soc.* **130,** 14244–14252 (2008).

[80] Yarbrough, J. C. *et al.* Contact Angle Analysis, Surface Dynamics, and Biofouling Characteristics of Cross-Linkable, Random Perfluoropolyether-Based Graft Terpolymers. *Macromolecules* **39,** 2521–2528 (2006).

[81] Wang, Y. *et al.* Photocurable Amphiphilic Perfluoropolyether/Poly(ethylene glycol) Networks for Fouling-Release Coatings *Macromolecules* **44,** 878–885 (2011).

[82] Rolland, J. P., Van Dam, R. M., Schorzman, D. A., Quake, S. R. & DeSimone, J. M. Solvent-Resistant Photocurable "Liquid Teflon" for Microfluidic Device Fabrication. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 2322–2323 (2004).

[83] Bajpai, A. K. Blood protein adsorption onto a polymeric biomaterial of polyethylene glycol and poly[(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-acrylonitrile] and evaluation of in vitro blood compatibility. *Polym. Int.* **54,** 304–315 (2005).

[84] Turri S, Scicchitano M, Simeone G, Claudio T. Chemical approaches toward the definition of new high-solid and high-performance fluorocoatings. *Progress in Organic Coatings*; **32**(1–4)**:** 205-213 (1997).

[85] Tonelli C, Trombetta T, Scicchitano M, Simeone G, Ajroldi G. New fluorinated thermoplastic elastomers. *Journal of Applied Polymer Science*; **59**(2)**:** 311-327 (1996).

[86] Pilati F, Toselli M, Vallieri A, Tonelli C. Synthesis of polyesters-perfluoropolyethers block copolymers. *Polymer Bulletin*; **28**(2)**:** 151-157 (1992).

[87] Turri S, Scicchitano M, Tonelli C. End group chemistry of fluoro-oligomers: Highly selective syntheses of diepoxy, diallyl, and tetraol derivatives. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*; **34**(16)**:** 3263-3275 (1996).

[88] Hu Z. Novel Perfluoropolyethers as Fouling-Release Coatings. University of North Carolina, 2011.

[89] Baier, R. E., Depalma, V. A., Goupil, D. W. & Cohen, E. Human platelet spreading on substrata of known surface chemistry. *J. Biomed. Mater. Res.* **19,** 1157–1167 (1985).

[90] Kendall, K. The adhesion and surface energy of elastic solids. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **4,** 1186–1195 (1971).

[91] Magin, C. M., Cooper, S. P. & Brennan, A. B. Non-toxic antifouling strategies. *Mater. Today* **13,** 36–44 (2010).

[92] Gudipati, C. S., Finlay, J. A., Callow, J. A., Callow, M. E. & Wooley, K. L. The antifouling and fouling-release perfomance of hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-poly(ethylene glycol) (PEG) composite coatings evaluated by adsorption of biomacromolecules and the green fouling alga ulva. *Langmuir* **21,** 3044–3053 (2005).

[93] Elena Molena, Caterina Credi, Carmela De Marco, Marinella Levi, Stefano Turri, Giovanni Simeone. Protein antifouling and fouling-release in perfluoropolyether surfaces, *Applied Surface Science* **309**, 160–167 (2014).

[94] G. M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*,**442**(7101):368–373 (2006).

[95] T. A. Franke and A. Wixforth. Microfluidics for miniaturized laboratories on a chip. *Chemphyschem a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, **9**(15):2140–2156 (2008).

[96] K. T. Haraldsson, J. B. Hutchison, R. P. Sebra, B. T. Good, K. S. Anseth, and C. N. Bowman. 3d polymeric microfluidic device fabrication via contact liquid photolithographic polymerization (clipp). *Sensors and Actuators B: Chemical*, **113**(1):454–460 (2006).

[97] X. Sun, J. Liu, and M. L. Lee. Surface modification of polymer microfluidic devices using in-channel atom transfer radical polymerization. *Electrophoresis*, **29**(13):2760–2767 (2008).

[98] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, and S. R. Quake. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters*, **86**(18):4163, (2001).

[99] N. R. Beer, E. K. Wheeler, L. Lee-Houghton, N. Watkins, S. Nasarabadi, N. Hebert, P. Leung, D. W. Arnold, C. G. Bailey, and B. W. Colston. On-chip single-copy real-time reverse-transcription pcr in isolated picoliter droplets. *Analytical Chemistry*, **80**(6):1854–1858, (2008).

[100] D. B. Wolfe, R. S. Conroy, P. Garstecki, B. T. Mayers, M. A. Fischbach, K. E. Paul, M. Prentiss, and G. M. Whitesides. Dynamic control of liquidcore/ liquid-cladding optical waveguides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(34):12434–12438, (2004).

[101] Z. Li, Z. Zhang, T. Emery, A. Scherer, and D. Psaltis. Single mode optofluidic distributed feedback dye laser. *Opt. Express*, **14**(2):696–701, (2006).

[102] P. J. Obeid, T. K. Christopoulos, H. J. Crabtree, and Backhouse C. J. Microfabricated device for dna and rna amplification by continous flow polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction with cycle number selection. *Analytical Chemistry*, **75**(2):288–295, (2003).

[103] D. N. Schafer, E. A. Gibson, E. A. Salim, A. E. Palmer, R. Jimenez, and J. Squier. Microfluidic cell counter with embedded opticalfibers fabricated by femtosecond laser ablationand anodic bonding. *Opt. Express*, **17**(8):6068– 6073, (2009).

[104] C. W. Yung, J. Fiering, A. J. Mueller, and D. E. Ingber. Micromagneticmicrofluidic blood cleansing device. *Lab on a Chip***, 9**(9):1171–1177, (2009).

[105] H. Sugino, K. Ozaki, Y. Shirasaki, T. Arakawa, S. Shoji, and T. Funatsu. Onchip microfluidic sorting with fluorescence spectrum detection and multiway separation. *Lab on a Chip*, **9**(9):1254–1260, (2009).

[106] T. Tachi, N. Kaji, Tokeshi M., and Y. Baba. Simultaneous separation, metering, and dilution of plasma from human whole blood in a microfluidic system. *Analytical Chemistry*, **81**(8):3194–3198, (2009).

[107] J. S. Lee, J. Ryu, and C. B. Park. High-throughput analysis of alzheimer's -amyloid aggregation using a microfluidic self-assembly of monomers. *Analytical Chemistry*, **81**(7):2751–2759, (2009).

[108] C. De Marco, S. Girardo, E. Mele, R. Cingolani, and D. Pisignano. Ultraviolet-based bonding for perfluoropolyether low aspect-ratio microchannels and hybrid devices. *Lab on a Chip*, **8**(8):1394–1397, (2008).

[109] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, **21**(1):27–40, (2000).

[110] C. , G. A. , and D. J. Beebe. Ultra rapid prototyping of microfluidic systems using liquid phase photopolymerization. *Lab on a Chip*, **2**(1):50–55, (2002).

[111] C. Decker. The use of uv irradiation in polymerization. *Polymer International*, **45**(2):133–141, (1998).

[112] K. Studer, C. Decker, E. Beck, and R. Schwalm. Overcoming oxygen inhibition in uv-curing of acrylate coatings by carbon dioxide inerting, part i. *Progress in Organic Coatings*, **48**(1):92–100, (2003).

[113] H. Becker and C. Gartner. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, **21**(1):12–26, (2000).

[114] C. Tsao and D. DeVoe. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*, **6**(1):1–16, (2009).

[115] Bongiovanni R, Medici A, Zompatori A, Garavaglia S, Tonelli C. Perfluoropolyether polymers by UV curing: design, synthesis and characterization. *Polymer International*; **61**(1)**:** 65-73 (2012).

[116] Priola A, Bongiovanni R, Malucelli G, Pollicino A, Tonelli C, Simeone G. UV-curable systems containing perfluoropolyether structures: Synthesis and characterisation. *Macromolecular Chemistry and Physics*; **198**(6)**:** 1893-1907 (1997).

[117] Cranmer, S. L., Magowan, C., Liang, J., Coppel, R. L. & Cooke, B. M. An alternative to serum for cultivation of Plasmodium falciparum in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91,** 363–365 (1997).

[118] Lambros, C. & Vanderberg, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **65,** 418–420 (1979).

[119] R. Suriano, M. Levi, E. Emilitri, C. Momo, and S. Turri. Fabrication of sealed _-channels through a fast and reliable photopolymerization process. *Macromolecular Materials and Engineering*, (2011).

[120] Gedde, U. in *Polymer Physics SE - 3* 39–53 (Springer Netherlands, 1999). doi:10.1007/978-94-011-0543-9_3

[121] Extrand, C. W. Contact Angles and Hysteresis on Surfaces with Chemically Heterogeneous Islands. *Langmuir* **19,** 3793–3796 (2003).

[122] Rupp, F., Scheideler, L. & Geis-Gerstorfer, J. Effect of Heterogenic Surfaces on Contact Angle Hysteresis: Dynamic Contact Angle Analysis in Material Sciences. *Chem. Eng. Technol.* **25,** 877–882 (2002).

[123] Chan, C.-M. Polymer surface modification and characterization (1993).

[124] Hu, Z. *et al.* Photochemically Cross-Linked Perfluoropolyether-Based Elastomers: Synthesis, Physical Characterization, and Biofouling Evaluation. *Macromolecules* **42,** 6999–7007 (2009).