


**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale: Biologia Molecolare Applicata (LM-6)**

# REALIZZAZIONE DI UN BIOSENSORE OTTICO PORTATILE A CRISTALLI LIQUIDI PER LA RILEVAZIONE DI PROTEINE

# REALIZATION OF A PORTABLE, LIQUID CRYSTAL-BASED OPTICAL BIOSENSOR, FOR PROTEIN DETECTION

Relatore:

**Prof. ssa Lucchetti Liana**

Tesi di laurea di:

**Aurora Pompili**

Co-Relatore:

**Prof. Mariani Paolo**

Sessione Ottobre 2026

A.A 2025/2026

**SOMMARIO**

In questo lavoro viene analizzato lo sviluppo di un biosensore ottico basato su film di cristallo liquido sospeso su griglie di rame idonee per il tracciamento di biomolecole. La rivelazione viene effettuata semplicemente valutando la variazione di luce trasmessa tra polarizzatori incrociati e richiede l'utilizzo di un microscopio ottico a luce polarizzata.

Il primo passo è stato progettare un supporto su misura che permettesse di porre in maniera semplice il biosensore a contatto con la soluzione contenente le molecole target e che fosse idoneo per la visualizzazione al microscopio ottico. Successivamente, è stata individuata la dimensione ideale delle maglie della griglia, per stabilizzare il film di cristallo liquido sfruttando la capillarità. Modellando l'interfaccia con tensioattivi, è stato possibile guidare l'orientamento molecolare del cristallo liquido e a facilitare l'interazione con la proteina target, evidenziando il ruolo determinante delle forze elettrostatiche nel perturbare l'allineamento del cristallo liquido in presenza di sieroalbumina bovina (BSA).

Infine, un'analisi video automatizzata in Python ha permesso di tradurre i cambiamenti di luce nel tempo in un dato quantitativo della reazione.

**INDICE**

**1.INTRODUZIONE.....4**

*1.1 Caratteristiche di un biosensore e applicazioni*.....4

*1.2 Cosa sono i cristalli liquidi e il loro utilizzo come biosensori*.....7

*1.3 Birifrangenza e anisotropia ottica nei cristalli liquidi* .....13

*1.4 Principio ottico di rilevamento* .....17

**2.MATERIALI E METODI.....21**

*2.1 5CB (4-ciano-4'-pentilbifenile) e miscela E7*.....21

*2.2 Griglie TEM*.....23

*2.3 Albumina sierica bovina (BSA)* .....24

*2.4 Surfattanti per allineamento omeotropico)* .....25

*2.5 Prototipo costruito con stampante 3D* .....27

*2.6 Procedura sperimentale*.....30

*2.7 Microscopia ottica a luce polarizzata*.....31

**3.RISULTATI.....33**

*3.1 Scelta della griglia TEM* .....33

*3.2 Test con surfattanti e solventi* .....35

*3.3 Test con albumina sierica bovina (BSA)* .....41

**4.DISCUSSIONE.....48**

**5.PROSPETTIVE FUTURE.....50**

**6.BIBLIOGRAFIA.....51**

**RINGRAZIAMENTI.....53**

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1 Caratteristiche di un biosensore e applicazioni*

Lo sviluppo di dispositivi di diagnostica point-of-care rapidi, sensibili ed economici risponde a un'esigenza sempre più urgente in ambito clinico e biochimico, ovvero quella di identificare tempestivamente i biomarcatori proteici prima che le patologie degenerino. In questo contesto, la biosensoristica svolge un ruolo centrale.

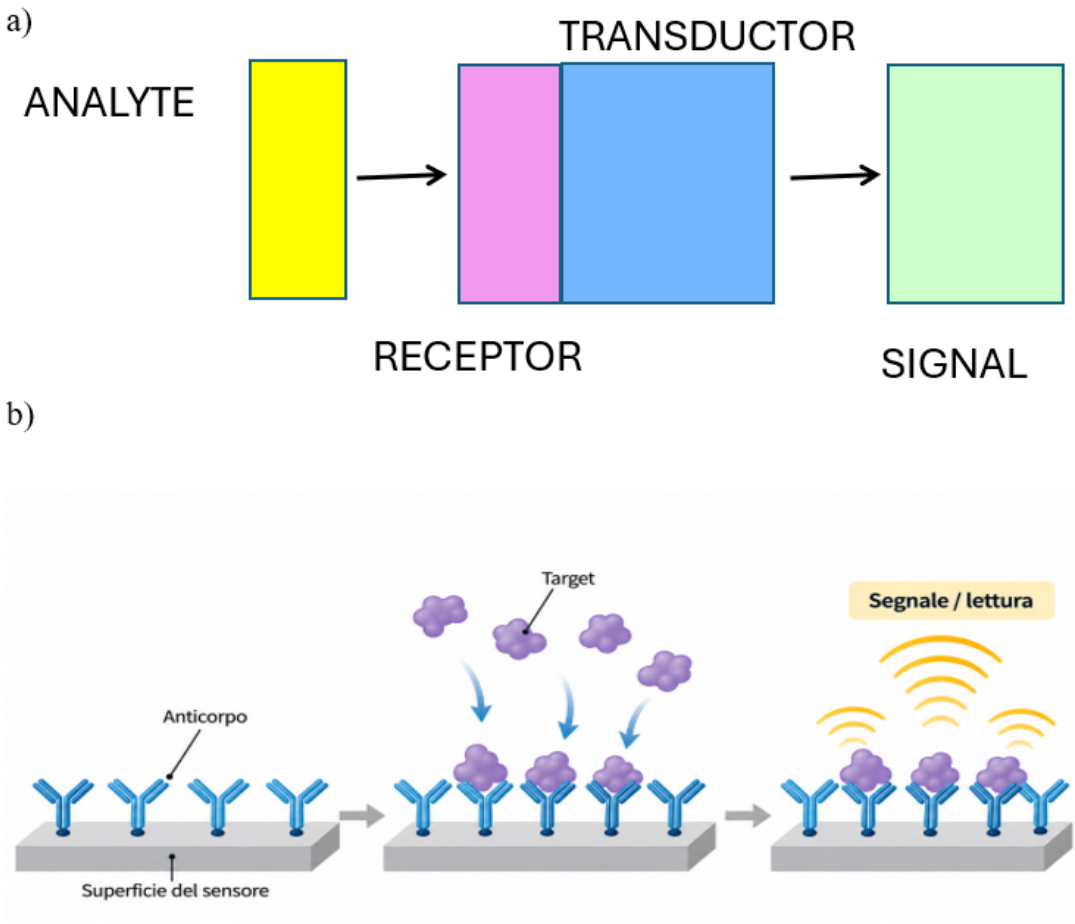



*Figura 1: Rappresentazione schematica di un biosensore (a) e del suo funzionamento (b)*

Secondo la definizione della Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), i biosensori sono dispositivi analitici costituiti da un elemento biologico (tessuto, microrganismo, organello, recettore cellulare, enzima, anticorpo) e da un trasduttore fisico-chimico. L'interazione specifica tra l'analita e il materiale biologico produce un cambiamento fisico-chimico rilevato dal trasduttore. Il trasduttore genera quindi un segnale elettronico od ottico, proporzionale alla quantità (concentrazione) di uno specifico analita o di un gruppo di analiti.

La figura 1 rappresenta schematicamente la struttura ed il principio di funzionamento di un biosensore. Naturalmente, i meccanismi di rivelazione e di trasduzione variano a seconda dell'analita da rivelare.

Un biosensore ideale deve soddisfare requisiti stringenti [1]:

- elevata specificità per le molecole bersaglio

- drastica riduzione di falsi positivi e negativi

- una lettura dei dati semplice e possibilmente quantitativa, che non richieda strumentazioni complesse o personale altamente specializzato.

- bassi costi di produzione

- portabilità

Quando l’interazione tra l’analita e il recettore biologico produce una variazione nelle proprietà ottiche del recettore, si parla di biosensori ottici. Il principio di funzionamento dei biosensori ottici si fonda sulla rilevazione delle variazioni di grandezze quali assorbanza, fluorescenza, transmittività o indice di rifrazione, innescate da uno specifico evento di riconoscimento biomolecolare. Questi biosensori combinano elevata sensibilità e risposta in tempo reale. Inoltre, tipicamente non richiedono marcatori aggiuntivi per la rivelazione degli analiti, sono cioè “label free”. Per queste ragioni il loro sviluppo negli ultimi anni è stato florido, tanto che costituiscono una delle categorie di biosensori maggiormente utilizzate.

L’utilizzo di cristalli liquidi come biosensori ottici fu proposto per la prima volta da Abbott e collaboratori nel 1998 [2]. Questi ricercatori furono i primi a intuire che i cristalli liquidi, in particolare quelli cosiddetti nematici, possedessero naturalmente molte delle caratteristiche di un biosensore ideale. Nell’articolo del 1998 si dimostrò infatti per la prima volta che i cristalli liquidi possono agire come amplificatori ottici e trasduttori per convertire eventi di legame molecolare (come l'interazione ligando-recettore tra avidina e biotina) all'interfaccia solido-cristallo liquido in un segnale ottico visibile al microscopio ottico a luce polarizzata [2].

### *1.2 Cosa sono i cristalli liquidi e il loro utilizzo come biosensori*

I cristalli liquidi sono fluidi anisotropi e, come tali, birifrangenti. Essi presentano, cioè, indici di rifrazione differenti a seconda della polarizzazione e della direzione della luce incidente. Questa proprietà deriva dall'ordine orientazionale a lungo range delle molecole anisotrope che li compongono, che sono prevalentemente di forma allungata. I cristalli liquidi costituiscono infatti uno stato della materia intermedio: uniscono la fluidità dei liquidi all'ordine molecolare dei solidi cristallini, mostrando proprietà ottiche uniche, tra cui spicca, appunto, la birifrangenza [3].

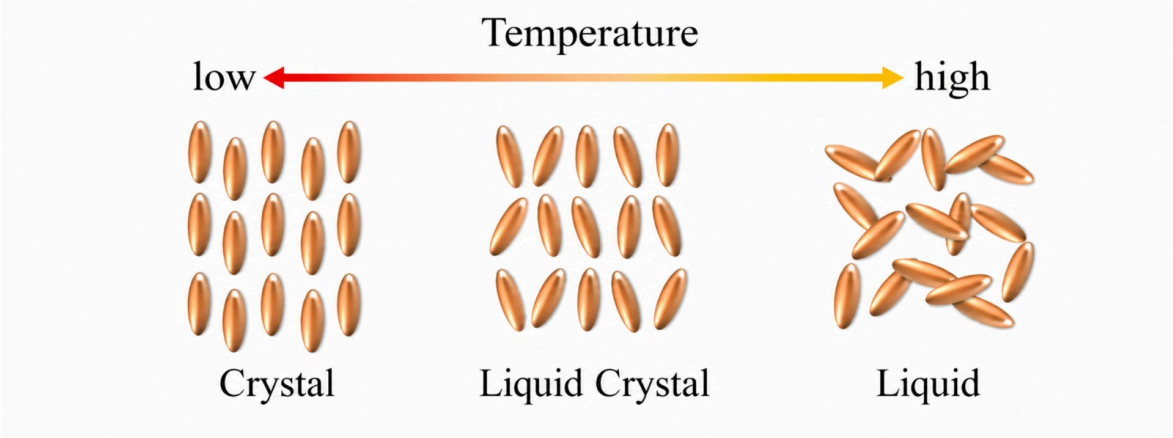



*Figura 2: Tipico diagramma di fase di un cristallo liquido nematico di tipo termotropico. La fase liquido cristallina è intermedia tra una fase cristallina a bassa temperatura e la fase isotropa liquida ad alta temperatura. Il disegno evidenzia l'ordine nematico molecolare a metà tra la disposizione ordinata delle molecole in fase cristallina e la disposizione casuale in fase isotropa.*

Il principio di funzionamento di un biosensore ottico a cristalli liquidi si basa sulla variazione di birifrangenza indotta dall'interazione con le molecole target.

La direzione dell'orientazione molecolare media in un cristallo liquido nematico è espressa dal direttore, un versore indicato con **n**. Quando una goccia di materiale viene posta tra due substrati di vetro opportunamente trattati, è possibile indurre un allineamento preferenziale di **n** in corrispondenza delle superfici. Grazie alla correlazione a lungo raggio dell'ordine molecolare del cristallo liquido, l'orientazione superficiale viene trasmessa all'intero volume. In tal modo, si può ottenere facilmente una sorta di monocristallo "soffice", ovvero un campione di cristallo liquido in cui l'orientazione molecolare è uniforme su distanze molto superiori alla scala molecolare [3]. Le tre configurazioni più comuni ottenute con questo metodo sono classificate come allineamenti omeotropo, planare e ibrido, e sono schematizzate nella figura 3.

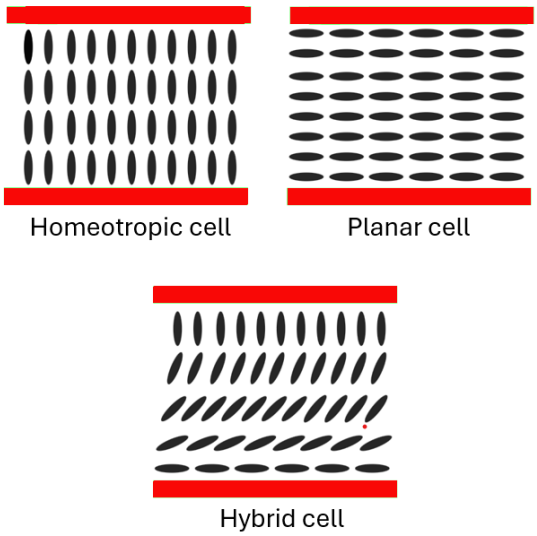


*Figura 3: Rappresentazione schematica dell'orientamento omeotropico, planare e ibrido in una cella a cristallo liquido nematico. . In rosso i substrati della cella, in nero le molecole di cristallo liquido.*

Nei campioni omeotropici, il direttore **n** del cristallo liquido è perpendicolare alle superfici di confinamento; l'allineamento planare omogeneo caratterizza invece i campioni in cui l'orientazione molecolare media è parallela alle superfici lungo una direzione ben definita; infine, l'allineamento ibrido è una configurazione distorta generata da orientazione omeotropica su una superficie e orientazione planare sull'altra.

Il direttore **n** definisce anche l'asse ottico del campione di cristallo liquido. Ciò significa che l'aspetto di un cristallo liquido nematico osservato tra polarizzatori incrociati dipende dall'allineamento molecolare medio. Nello specifico, i campioni omeotropici sono otticamente isotropi e appaiono scuri, mentre le celle planari e ibride modificano la polarizzazione della luce incidente, permettendo a una certa quantità di essa di attraversare l'analizzatore del microscopio [3]. Quando l'accoppiamento tra le molecole di cristallo liquido e la superficie di allineamento viene in qualche modo perturbato, la distribuzione del campo del direttore **n** varia, provocando una modifica della birifrangenza della cella, facilmente rilevabile mediante microscopia ottica a

luce polarizzata. Questa amplificazione ottica costituisce il principio alla base della maggior parte dei biosensori ottici a cristalli liquidi [2,4-7].

Riassumendo: In un sistema a polarizzatori incrociati (Fig.4):

●In assenza di ordine (Fase Isotropa) oppure in caso di allineamento omeotropico: La luce non subisce alcuna variazione nel proprio stato di polarizzazione e viene totalmente bloccata dal secondo polarizzatore (nessuna trasmissione).

●In presenza di ordine molecolare (Fase Nematica) con allineamento planare, ibrido oppure con orientamento casuale delle molecole: Lo sfasamento indotto ruota la polarizzazione della luce, consentendone il passaggio attraverso il secondo polarizzatore.

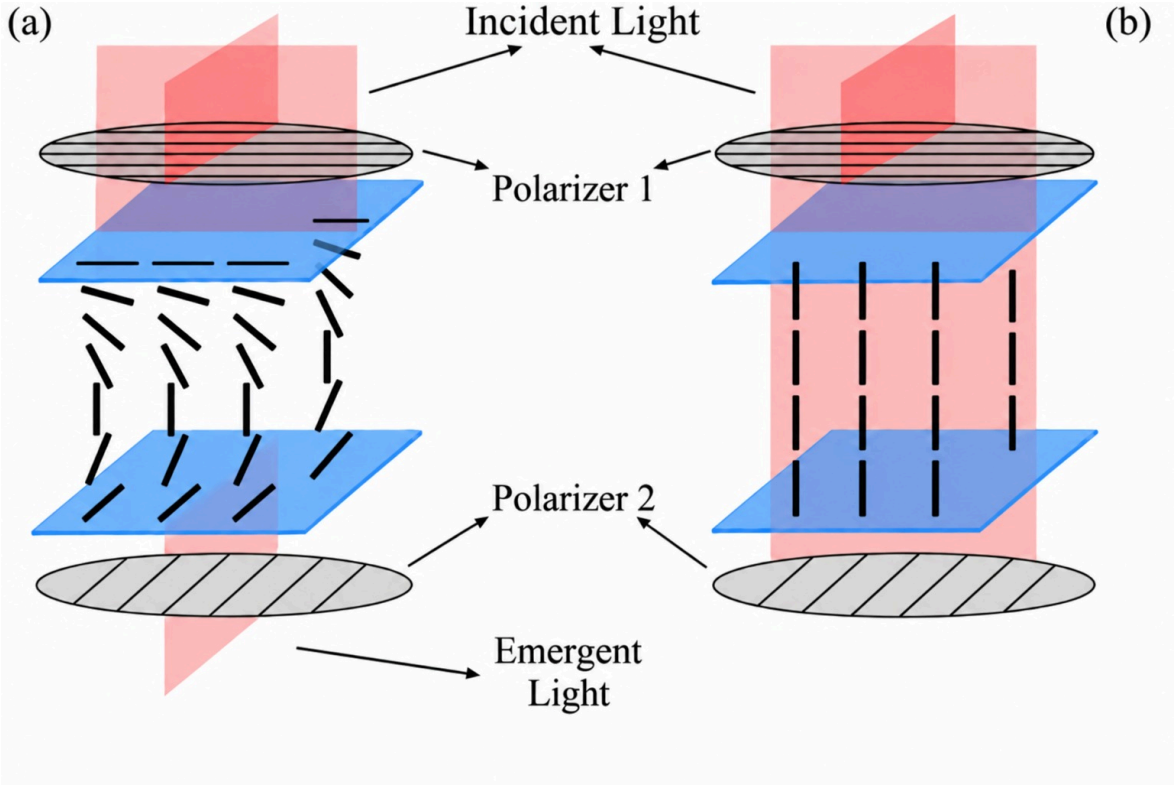



*Figura 4: La parte a) mostra cosa accade se il campione non è omeotropico (una certa quantità di luce passa attraverso il secondo polarizzatore), la b) mostra invece il caso omeotropico (non passa luce).*

Nei sistemi a cristallo liquido termotropico, l'interazione avviene all'interfaccia tra la fase nematica e la zona in cui è presente l'analita da rivelare. Per garantire la selettività necessaria, l'interfaccia viene funzionalizzata con monostrati lipidici o recettori biologici, come anticorpi o aptameri [1,2]. Qualsiasi alterazione nell'orientamento delle molecole (innescata dall'interazione tra le molecole target e la superficie funzionalizzata) varia la distribuzione del direttore e si traduce dunque direttamente in un segnale ottico misurabile senza

la necessità di marcatori esterni. I biosensori a cristallo liquido sono pertanto label-free. La figura 5 mostra molto chiaramente la situazione.

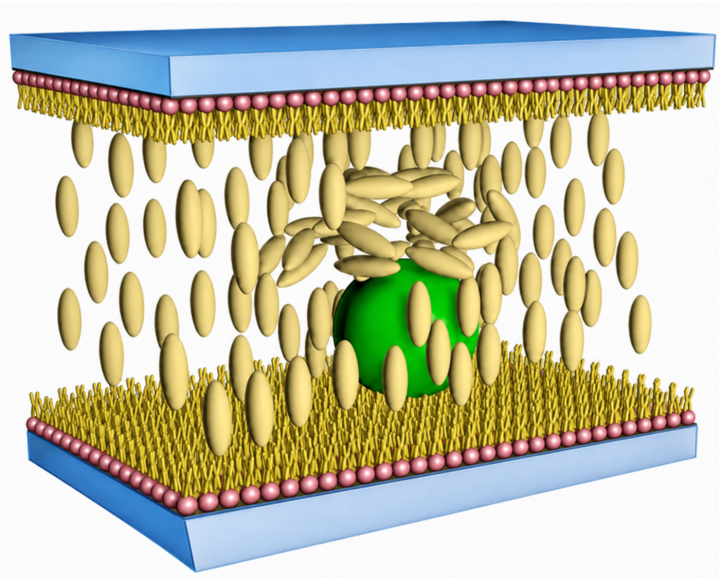


*Figura 5: la figura mostra schematicamente il funzionamento di un biosensore label-free, dove l'analita (rappresentato in verde) perturba l'iniziale allineamento omeotropico del cristallo liquido.*

Sulla base di questi principi fisici e chimico-fisici, questo lavoro di tesi si focalizza sulla realizzazione di un biosensore ottico portatile basato su cristalli liquidi nematici, per la rivelazione di proteine. L'obiettivo è analizzare l'architettura di fabbricazione, i meccanismi di trasduzione all'interfaccia e l'efficacia operativa nella rilevazione quantitativa di target proteici, utilizzando la BSA come modello sperimentale [8].

### *1.3 Birifrangenza e anisotropia ottica nei cristalli liquidi*

Quando la luce attraversa un materiale, rallenta rispetto alla velocità che ha nel vuoto. Questo rallentamento si misura con l'indice di rifrazione n, definito come:

$$n = c / v$$

dove c'è la velocità della luce nel vuoto e *v* è la velocità della luce nel mezzo. Di conseguenza, anche la lunghezza d'onda della luce si riduce all'interno del materiale, secondo la relazione:

$$\lambda = \lambda_0 / n$$

dove $\lambda_0$ indica la lunghezza d'onda della luce nel vuoto [9].

Nei materiali isotropi questo indice è uguale in tutte le direzioni: indipendentemente da come la luce è polarizzata, la sua velocità non cambia.

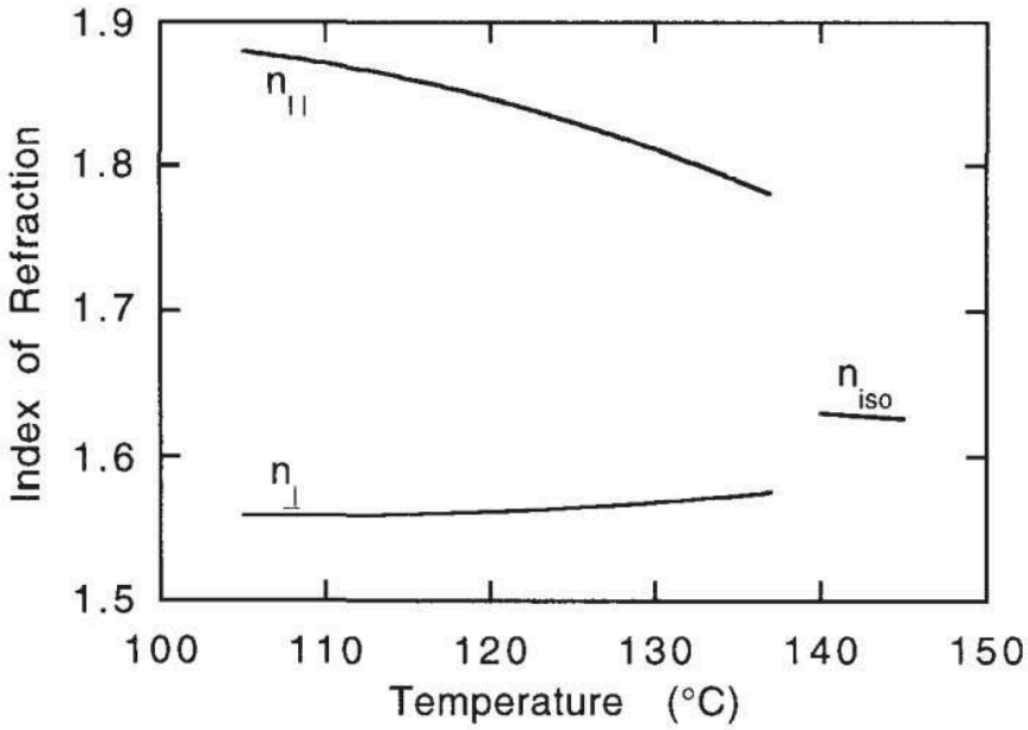



*Figura 6: Indici di rifrazione per un tipico cristallo liquido nematico in funzione della temperatura*

I cristalli liquidi nematici, invece, sono materiali anisotropi. Questo fa sì che la luce "veda" un indice di rifrazione diverso a seconda di come è polarizzata rispetto alla direzione dell'asse ottico [3]:

● indice ordinario ($n_o$ o $n_\perp$) quando la polarizzazione è ortogonale all'asse ottico;

● indice straordinario ($n_e$ o $n_{//}$) quando la polarizzazione è lungo l'asse ottico

Poiché il materiale possiede due indici di rifrazione invece di uno solo, si parla di birifrangenza. Un materiale si dice uniassico positivo quando $n_e > n_o$, e uniassico negativo quando $n_e < n_o$; questa distinzione è importante per determinare la risposta ottica del materiale sotto luce polarizzata, in particolare in applicazioni legate al ritardo di fase o alla modulazione ottica.

La differenza tra i due indici di rifrazione,

$$\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$$

definisce appunto la birifrangenza (o anisotropia ottica) del materiale e quantifica quanto le molecole sono effettivamente allineate tra loro: è cioè legata al cosiddetto parametro d'ordine della fase liquido cristallina. Le figure 6 e 7 mostrano gli andamenti tipici dei due indici di rifrazione e della birifrangenza al variare della temperatura, per un cristallo liquido nematico.

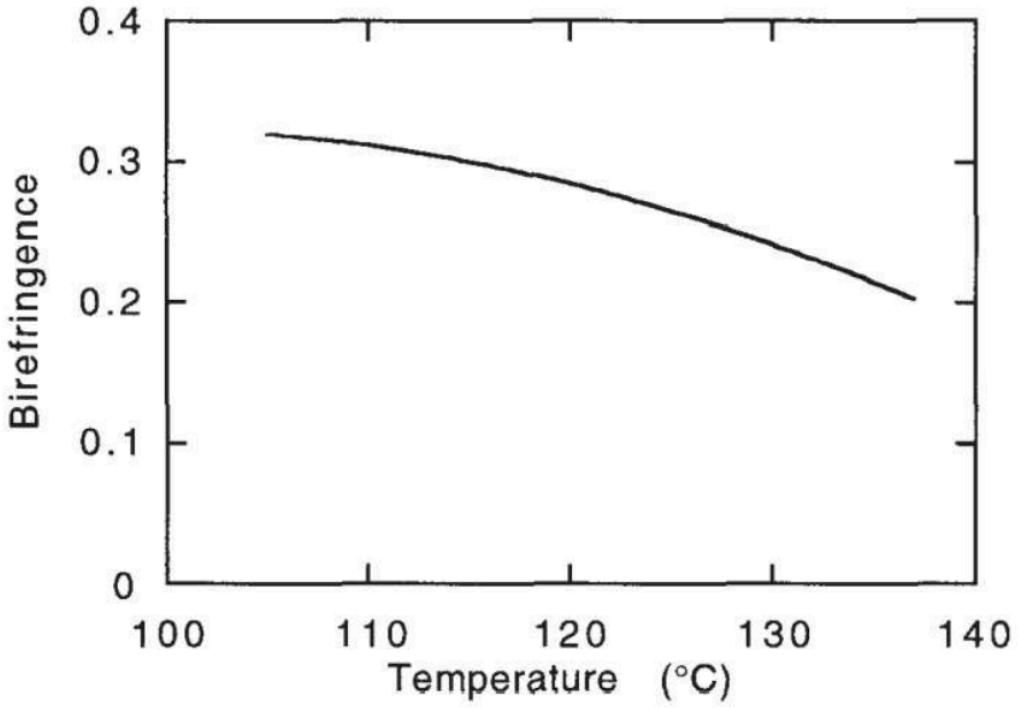



*Figura 7: Birifrangenza di un tipico cristallo liquido nematico, in funzione della temperatura.*

Come si vede la differenza tra i due indici decresce spostandosi verso la fase isotropa, caratterizzata da un unico indice di rifrazione di valore intermedio (Fig.6). Allo stesso modo la birifrangenza diminuisce al crescere della temperatura (Fig.7). Questi andamenti sono coerenti con il fatto che all'aumentare della temperatura, l'agitazione termica delle molecole cresce e questo disturba l'allineamento molecolare, rendendo le orientazioni più caotiche. Di conseguenza $\Delta n$ diminuisce progressivamente.

Questo comportamento è tipico delle transizioni di fase nematico-isotropo ed è uno degli strumenti principali per studiare quantitativamente l'ordine molecolare nei cristalli liquidi.

La tecnica sperimentale standard per lo studio di questi fenomeni è la microscopia ottica a luce polarizzata (Polarized Optical Microscopy, POM). Questa tecnica sfrutta proprio l'anisotropia ottica dei cristalli liquidi per identificare le diverse mesofasi attraverso l'osservazione delle loro texture ottiche caratteristiche.

### *1.4 Principio ottico di rilevamento*

Quando un film di cristallo liquido viene osservato tra polarizzatori incrociati, l'allineamento omeotropico produce un'immagine scura, mentre l'allineamento planare produce un'immagine luminosa e, se il film di cristallo liquido è sufficientemente sottile, colorata [3]. Questo contrasto ottico, facilmente osservabile al microscopio a luce polarizzata, è ciò che permette di "leggere" la risposta del sensore senza bisogno di marcatori fluorescenti o reagenti aggiuntivi.

Nel design tipico del sensore che troviamo in letteratura, il cristallo liquido viene confinato in una griglia (ad esempio una griglia da microscopia elettronica a trasmissione, TEM) di spessore micrometrico. Un lato della griglia

è a contatto con una superficie solida che impone allineamento omeotropico, mentre l'altro lato è esposto alla soluzione acquosa da analizzare. Dato che la maggior parte dei cristalli liquidi nematici tendono ad assumere un allineamento planare a contatto con soluzioni acquose, è necessario aggiungere un opportuno surfattante per ripristinare l'ordine omeotropico (Fig. 8). Questo passaggio iniziale è molto importante poiché garantisce una situazione di partenza in cui non passa luce tra polarizzatori incrociati. Se a questo punto si aggiunge in soluzione l'analita da rivelare, la sua presenza verrà evidenziata dalle eventuali variazioni di luce trasmessa tra polarizzatori incrociati, che saranno generate dai cambiamenti di birifrangenza nel cristallo liquido (Fig. 9). Grazie al fatto che la configurazione iniziale corrisponde ad intensità trasmessa nulla, sarà possibile rilevare variazioni di trasmittività anche molto piccole.

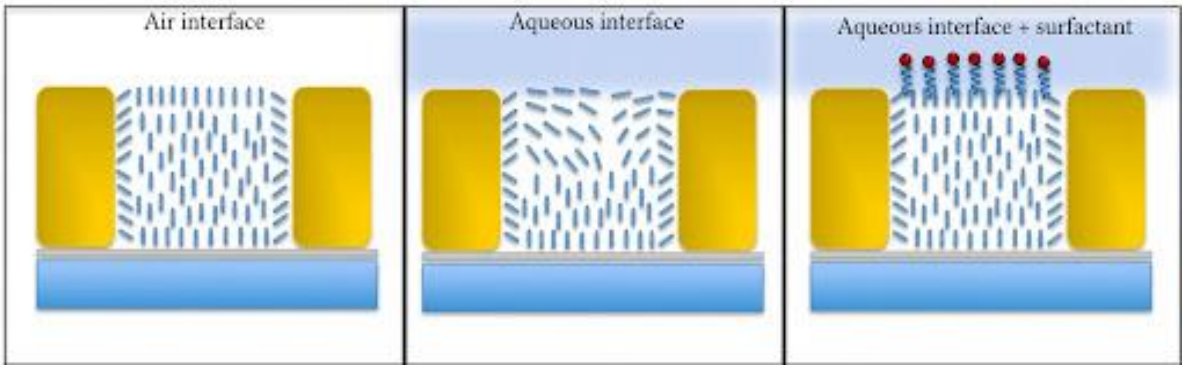



*Figura 8: Illustrazione dell'orientamento del cristallo liquido e delle corrispondenti immagini POM nelle singole celle della griglia, in presenza di diversi mezzi a contatto con la parte superiore del film. A sinistra: aria sulla superficie superiore, ciò favorisce un orientamento omeotropico uniforme. Al centro: l'acqua sulla superficie superiore orienta il*

*direttore parallelamente alla superficie del film. In combinazione con l'orientamento omeotropico alla base, si ottiene un orientamento ibrido birifrangente. A destra: l'aggiunta di un tensioattivo all'acqua sovrastante la griglia provoca l'adsorbimento delle molecole di tensioattivo all'interfaccia cristallo liquido-acqua, con le code idrofobiche a contatto con la superficie oleosa del cristallo liquido e le teste idrofile rivolte verso l'acqua. Un tale film ripristina l'ancoraggio omeotropico sulla superficie superiore, con un aspetto identico a quello dell'orientamento iniziale.*



*Figura 9: La cella a sinistra (allineamento omeotropico, direttore perpendicolare) appare completamente nera tra polarizzatori incrociati, mentre quella a destra (allineamento planare/ibrido) mostra la tipica texture colorata e luminosa dovuta alla birifrangenza. È proprio questo passaggio da scuro a luminoso il segnale ottico che il sensore usa per rivelare la presenza dell'analita.*

# 2. MATERIALI E METODI

In questa sezione vengono descritti i materiali impiegati nella realizzazione del biosensore ed i metodi sperimentali. Per ciascun componente vengono richiamate le principali proprietà chimico-fisiche rilevanti ai fini dell'applicazione sensoristica.

## *2.1 5CB (4-ciano-4'-pentilbifenile) e miscela E7*

Sono stati utilizzati due tipologie di cristallo liquido nematico termotropico: il 5CB (4-ciano-4'-pentilbifenile) e la miscela commerciale E7.

Il 5CB ($C_{18}H_{19}N$) è costituito da un nucleo rigido formato da due anelli aromatici, un gruppo terminale ciano (–CN) e una catena alchilica pentilica flessibile [10]. La marcata anisotropia della sua struttura molecolare consente alle molecole di orientarsi collettivamente lungo una direzione preferenziale, definita dal direttore, e di rispondere in maniera sensibile alle variazioni delle condizioni di ancoraggio superficiale e alla presenza di campi esterni. A temperatura ambiente, il 5CB si trova nella fase nematica e presenta proprietà di birifrangenza ottica, caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto allo sviluppo di sistemi di rilevazione label-free basati sulla microscopia ottica a luce polarizzata.

La miscela nematica commerciale E7 è costituita da differenti composti cianobifenilici e cianoterfenilici [11]. In particolare, la formulazione comunemente riportata comprende 5CB, 7CB, 8OCB e 5CT, presenti in differenti proporzioni. La combinazione di questi componenti permette di ottenere un materiale caratterizzato da un ampio intervallo di stabilità della fase nematica (anche in questo caso la fase si presenta a temperatura ambiente) e da elevata birifrangenza. Tali caratteristiche rendono E7 particolarmente adatto allo studio delle variazioni dell'orientamento molecolare indotte da fenomeni interfacciali, quali l'adsorbimento o il riconoscimento di specie biologiche sulla superficie funzionalizzata del biosensore.

Le strutture molecolari del 5CB e dei principali componenti della miscela E7 sono riportate in Figura 10.

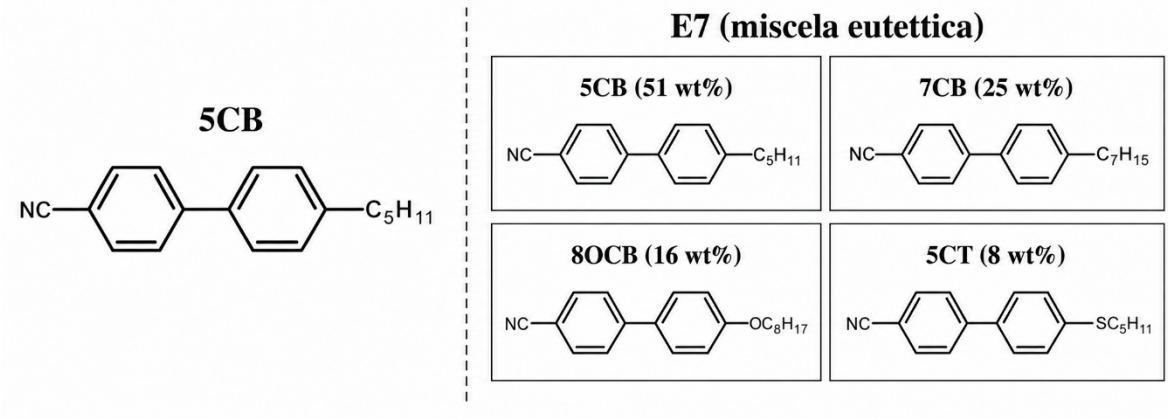



*Figura 10: Struttura molecolare del cristallo liquido 5CB e della miscela E7*

## *2.2 Griglie TEM*

Le griglie TEM (Transmission Electron Microscopy grids) sono supporti metallici di piccole dimensioni, generalmente realizzati in rame, oro o nichel, caratterizzati da una struttura reticolare costituita da un elevato numero di maglie regolari (Fig. 11). Nella loro applicazione convenzionale, vengono utilizzate come supporto per la deposizione e l'osservazione di campioni mediante microscopia elettronica a trasmissione, consentendo di mantenere il campione in posizione durante l'analisi. Nel presente lavoro, tali griglie sono state adattate a una configurazione biosensoristica basata su cristalli liquidi, sfruttando le singole maglie come micro-cavità in grado di contenere e stabilizzare il cristallo liquido. La struttura reticolare della griglia ha quindi fornito un supporto semplice, riproducibile e facilmente maneggiabile per l'ottenimento di numerose micro-aree sensibili all'interno dello stesso dispositivo.

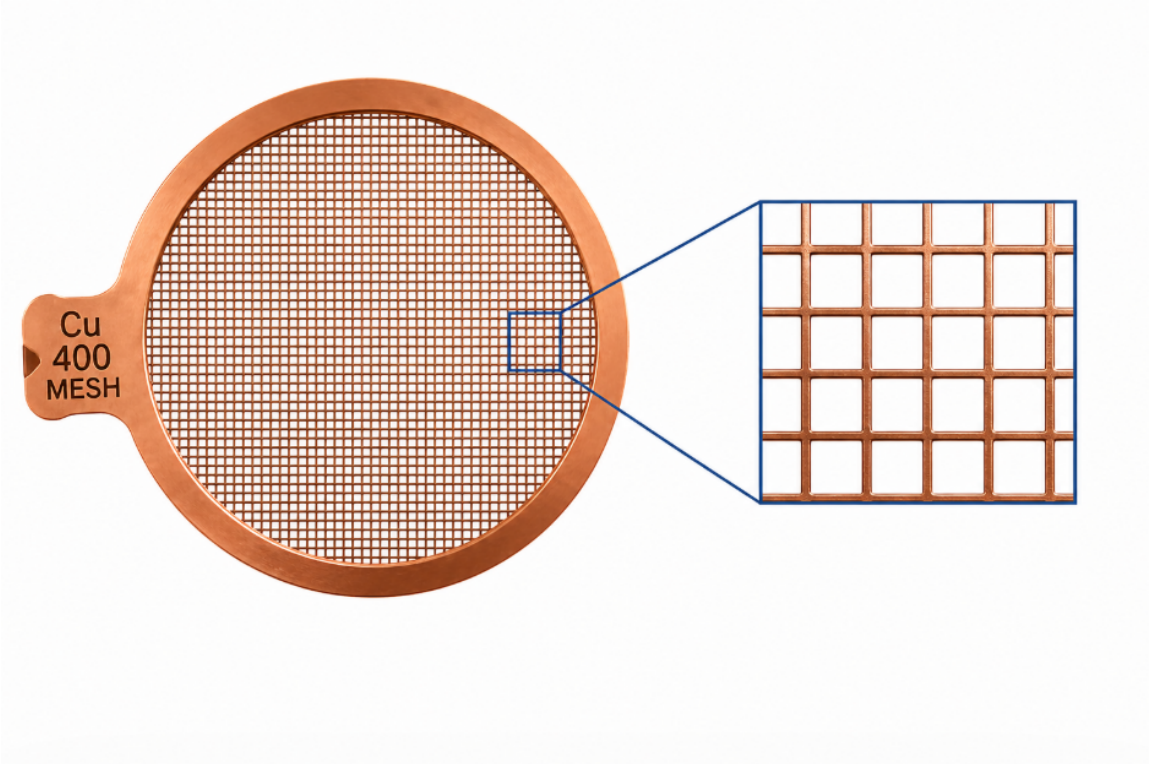



*Figura 11: Rappresentazione schematica di una griglia TEM in rame (Cu 400 mesh) e dettaglio della trama. La dicitura Cu 400 mesh visibile sulla sinistra, si riferisce alla dimensione delle maglie, che in questo caso è pari a 38 µm*

### *2.3 Albumina sierica bovina BSA*

L'albumina sierica bovina (BSA) è una proteina globulare derivata dal siero del sangue bovino, ampiamente utilizzata nella ricerca biochimica e biofisica per la sua stabilità, disponibilità e struttura ben caratterizzata [8]. La BSA ha un peso molecolare di circa 66,5 kDa ed è composta da 583 amminoacidi disposti in un'unica catena polipeptidica. A pH fisiologico, la BSA possiede una carica netta negativa, con un punto isoelettrico intorno a 4,7 (Fig. 12).

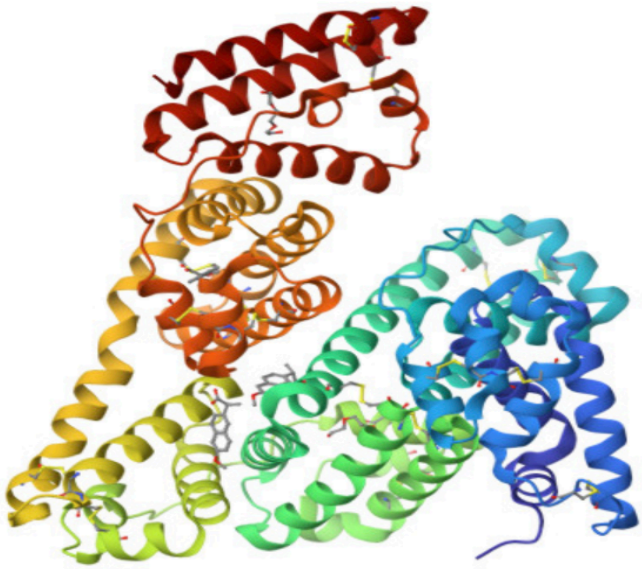


*Figura 12: Struttura molecolare tridimensionale della BSA*

### *2.4 Surfattanti per allineamento omeotropico*

Sono stati impiegati tre composti per la funzionalizzazione e l'induzione dell'allineamento omeotropico del cristallo liquido nematico: il bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB, $C_{19}H_{42}BrN$), il bromuro di dodeciltrimetilammonio (DTAB, $C_{15}H_{34}BrN$) e il cloruro di dimetilottadecil[3-(trimetossisilil)propil] ammonio (DMOAP).

Il CTAB e il DTAB sono tensioattivi cationici quaternari costituiti da una testa polare trimetilammonio caricata positivamente e da una coda alchilica idrofobica lineare, rispettivamente a 16 atomi di carbonio nel CTAB e a 12

atomi di carbonio nel DTAB. Il DMOAP, invece, è un silano cationico contenente una lunga catena alchilica idrofobica e un gruppo trimetossisililico, che gli consente di legarsi alla superficie vetrosa formando uno strato molecolare stabile e ben organizzato.

Nel presente studio, tali composti sono stati utilizzati per modificare l'orientazione dei cristalli liquidi, favorendo la formazione di uno strato adsorbito, ordinato e dotato di carica netta positiva. Questa modifica superficiale è fondamentale per promuovere l'allineamento omeotropico delle molecole del cristallo liquido nematico, ossia un orientamento perpendicolare al piano del substrato. Tale configurazione è particolarmente importante nei biosensori a cristalli liquidi, poiché consente di ottenere uno stato iniziale ben definito e di rilevare con elevata sensibilità eventuali perturbazioni interfacciali indotte dall'adsorbimento o dal riconoscimento di specie biologiche.

Le strutture chimiche del CTAB, del DTAB e del DMOAP sono riportate in figura 13.

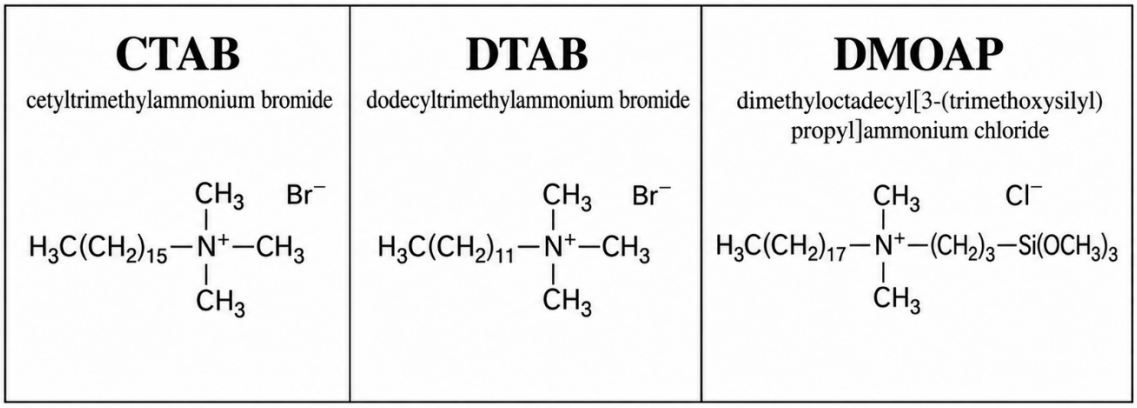



*Figura 13: Struttura chimica del CTAB, del DTAB e del DMOAP*

## *2.5 Prototipo costruito con stampante 3D*

Per il corretto alloggiamento della griglia TEM e per consentirne l'utilizzo durante le analisi al microscopio è stato progettato e realizzato un apposito portacampioni mediante stampa 3D. La struttura presenta una geometria compatta, costituita da una parte centrale circolare destinata ad accogliere la griglia TEM e da quattro braccia ortogonali che si estendono verso l'esterno fino a interfacciarsi con il bordo della piastra Petri su cui il biosensore verrà posizionato, garantendo stabilità, corretto posizionamento e facilità di manipolazione durante le prove sperimentali (Fig. 14).

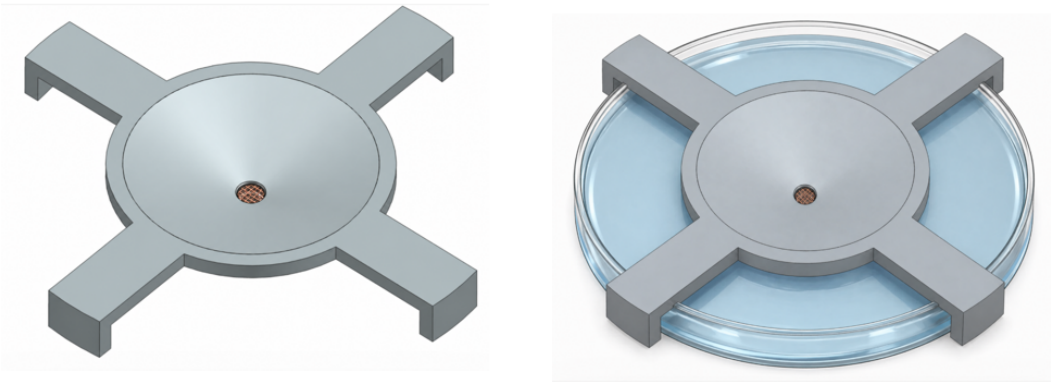


*Figura 14: Rappresentazione tridimensionale del portacampioni: struttura singola (a sinistra) e alloggiata all'interno della piastra Petri (a destra).*

Il portacampioni è stato realizzato in ABS (Acrilonitrile-Butadiene-Stirene), un polimero termoplastico ampiamente utilizzato nella prototipazione rapida e nella stampa 3D grazie alle sue buone proprietà meccaniche, alla facilità di lavorazione e soprattutto alla sua compatibilità con i diversi materiali da noi utilizzati in questo lavoro di tesi, verificata mediante test preliminari. L'acrilonitrile contribuisce alla stabilità termica e alla resistenza chimica, il butadiene conferisce tenacità ed elevata resistenza agli urti, mentre lo stirene garantisce rigidità e buona lavorabilità del materiale. La scelta dell'ABS è stata quindi motivata dalla necessità di ottenere una struttura sufficientemente rigida e resistente, dimensionalmente stabile e compatibile con l'impiego in ambiente di laboratorio e con soluzioni acquose. Il modello CAD è stato progettato

considerando sia le esigenze di alloggiamento della griglia sia la compatibilità con i microscopi presenti in laboratorio. La struttura presenta un diametro esterno complessivo di 90 mm e un'altezza totale di 14,5 mm. La zona centrale è caratterizzata da una cavità circolare con diametro di base pari a 35 mm e da una svasatura conica fino a 60 mm, realizzata per agevolare il corretto posizionamento dell'obiettivo del microscopio e consentire un'adeguata osservazione del campione. Le quattro alette ortogonali, aventi larghezza di 20 mm e spessore di 2 mm, svolgono la funzione di fermi meccanici e permettono di mantenere stabile il sistema all'interno della piastra Petri. Durante la progettazione sono state inoltre considerate le tolleranze dimensionali associate al ritiro del materiale durante la stampa 3D, in modo da garantire il corretto assemblaggio tra Petri, prototipo e griglia TEM (Fig. 15).

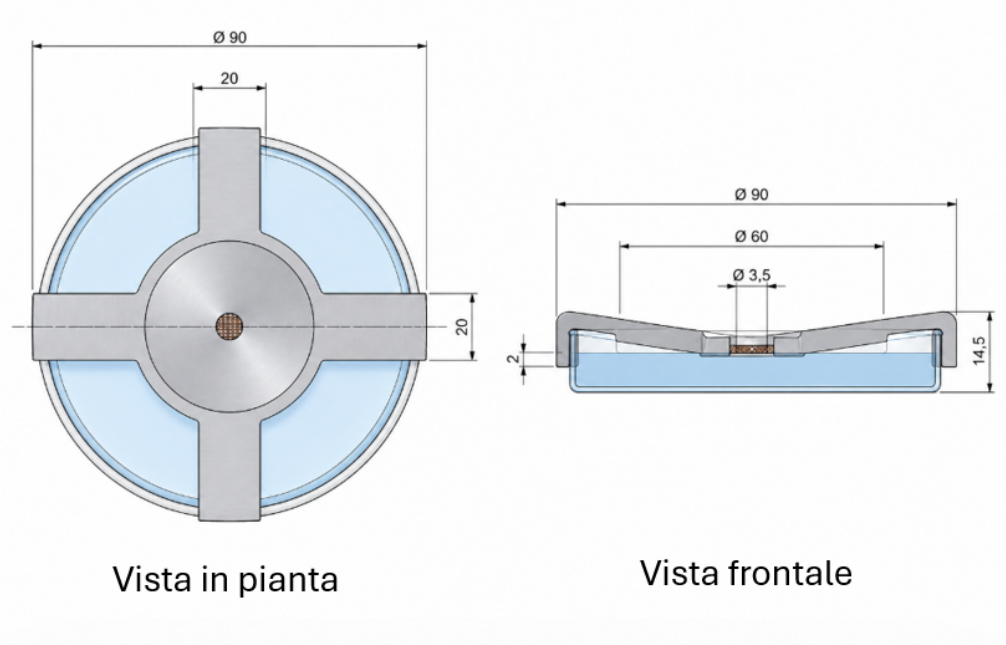


*Figura 15: Modello CAD del portacampioni con vista in pianta (a sinistra) e vista frontale in sezione (a destra), contenente le quote principali per l'alloggiamento della griglia TEM e il posizionamento sul microscopio.*

## *2.6 Procedura sperimentale*

La procedura sperimentale prevede inizialmente l'impregnazione della griglia TEM con il cristallo liquido, che viene distribuito all'interno delle singole maglie formando un film sottile prima di essere applicata sul portacampioni. La griglia viene quindi osservata al microscopio per verificare che il riempimento delle cellette sia sufficientemente uniforme e che non siano presenti eccessi di materiale. Successivamente, la griglia impregnata viene posizionata sull'apposito supporto e posta a contatto con una soluzione acquosa contenente il surfattante, mantenendo il sistema nelle condizioni sperimentali previste per il tempo stabilito. Terminata questa fase, la griglia viene trasferita sopra una nuova piastra Petri contenente una soluzione di BSA a concentrazione nota (Fig. 16). La stessa procedura viene ripetuta utilizzando differenti concentrazioni di BSA, mantenendo costanti le altre condizioni operative. Per ciascun test, la griglia viene mantenuta a contatto con la soluzione proteica per il tempo prefissato e successivamente analizzata mediante microscopia ottica a polarizzatori incrociati, così da acquisire le

immagini necessarie per la successiva valutazione della risposta del cristallo liquido.

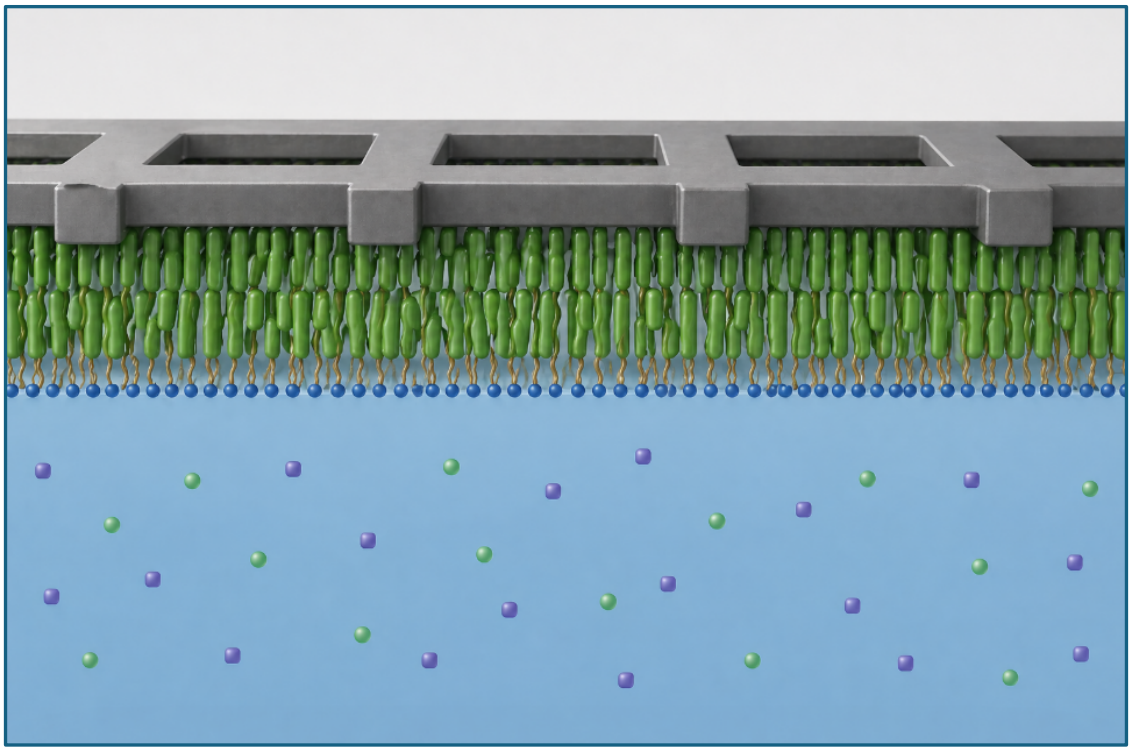


*Figura 16: Schema di funzionamento del biosensore, dove in verde vengono rappresentate le molecole di cristallo liquido, in grigio la struttura della griglia TEM mentre a contatto con l'acqua ci sono molecole di surfattante. In acqua è presente un analita rappresentato come sferette verdi e blu.*

### *2.7 Microscopia ottica a luce polarizzata*

La caratterizzazione dell'organizzazione strutturale e delle dinamiche di riorientamento del direttore molecolare del cristallo liquido, in presenza e in risposta alle interazioni con la BSA, è stata effettuata utilizzando il microscopio

ottico a luce polarizzata. Questa modalità ha consentito di valutare l'omogeneità macroscopica del campione e verificare fenomeni di adsorbimento delle molecole target correlati al grado di allineamento del cristallo liquido, identificati tramite variazione di birifrangenza.

Le analisi condotte al microscopio ottico hanno permesso di studiare il riorientamento molecolare indotto dall’interazione con le molecole di BSA, monitorando in tempo reale le variazioni di intensità della luce trasmessa, indotti dalle variazioni di orientamento delle molecole di cristallo liquido.

# 3.RISULTATI

## *3.1 Scelta della griglia TEM*

Al fine di individuare la dimensione di griglia più adatta alle successive analisi sensoristiche, sono state testate griglie TEM caratterizzate da differenti valori di mesh (50, 100, 200 e 400 mesh), corrispondenti a differenti dimensioni delle cellette (rispettivamente 425 μm, 204 μm, 90 μm, 38 μm). Su ciascuna griglia è stato depositato 1 μL di cristallo liquido 5CB (4-cyano-4′-pentylbiphenyl) e la distribuzione del materiale all'interno delle singole cellette è stata valutata mediante microscopia ottica a polarizzatori incrociati. È stato osservato che la capacità del cristallo liquido di occupare e rimanere confinato nelle aperture della griglia aumenta al diminuire delle dimensioni delle cellette (Fig. 17), in accordo con il maggiore contributo delle forze capillari nelle aperture di dimensioni ridotte. Le griglie con mesh più elevato favoriscono quindi una distribuzione più uniforme del 5CB e un maggiore numero di cellette completamente riempite, mentre nelle griglie caratterizzate da aperture più grandi il cristallo liquido tende a non essere trattenuto efficacemente. Questo aspetto risulta particolarmente importante ai fini dell'applicazione sensoristica, poiché è desiderabile ottenere una griglia in cui tutte, o la maggior parte, delle cellette siano occupate dal cristallo liquido, così da disporre di un'area di analisi

ampia, uniforme e riproducibile per il successivo monitoraggio delle variazioni di orientamento e birifrangenza del 5CB.

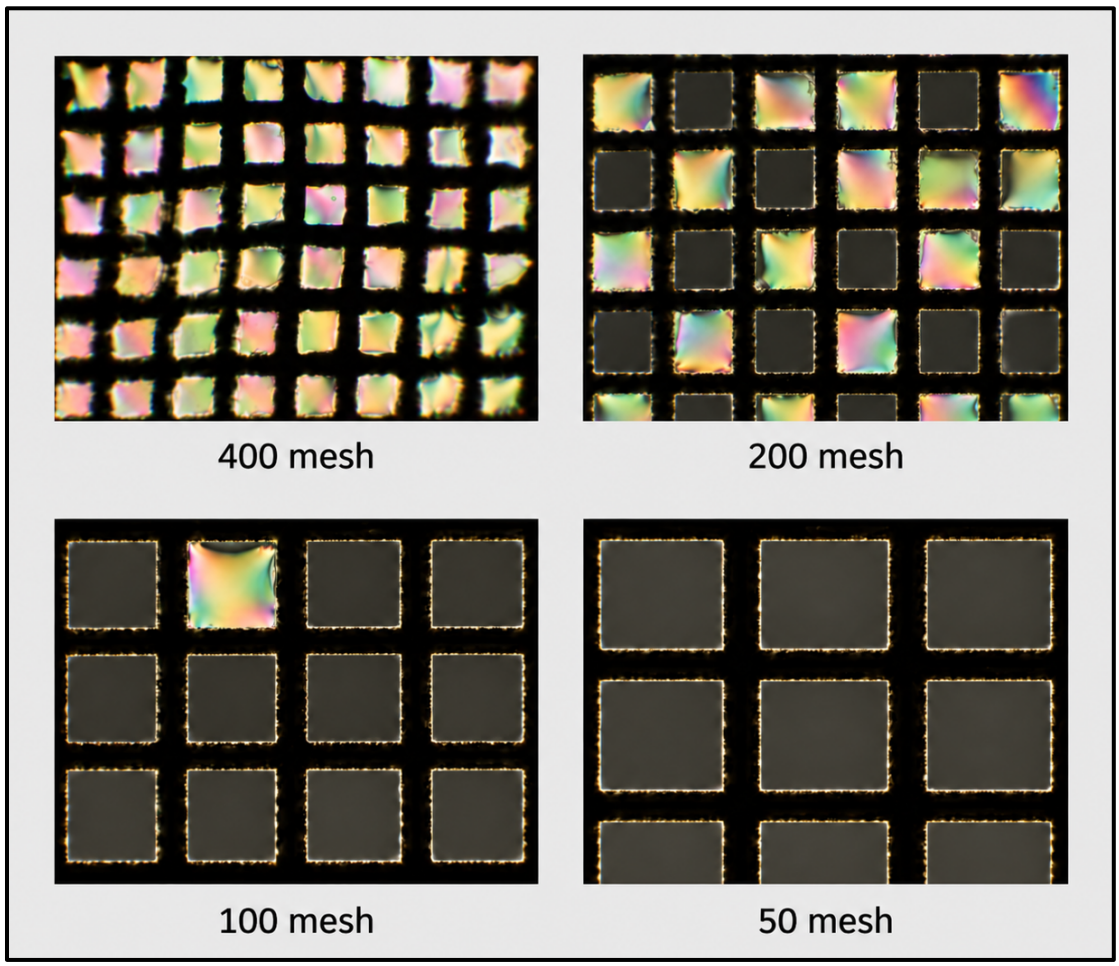



*Figura 17: Immagini ottenute mediante microscopia ottica a polarizzatori incrociati di griglie TEM con differenti dimensioni delle aperture (425 µm, 204 µm, 90 µm, 38 µm) dopo deposizione di 1 µL di cristallo liquido 5CB. La riduzione delle dimensioni delle cellette favorisce il confinamento del cristallo liquido per effetto capillare, determinando un progressivo aumento del numero di aperture completamente occupate dal 5CB.*

### *3.2 Test con surfattanti e solventi*

Per valutare la compatibilità dei surfattanti con il sistema a cristalli liquidi, la griglia TEM è stata inizialmente imbibita con cristallo liquido 5CB e successivamente posizionata sull'apposito supporto, al di sopra di una piastra Petri. All'interno della Petri è stata quindi introdotta una soluzione contenente CTAB oppure DMOAP allo 0,1% in isopropanolo. Al momento del contatto tra la soluzione e la griglia precedentemente impregnata di 5CB, è stata osservata una rapida e completa rimozione del cristallo liquido dalle cellette della griglia, già nell'arco di pochi secondi. Questo comportamento indica che l'isopropanolo interagisce direttamente con il 5CB, determinandone la solubilizzazione e/o il trascinamento dalla struttura della griglia (Fig. 18). Oltre all'isopropanolo, sono stati testati anche metanolo ed etanolo come solventi per la preparazione delle soluzioni contenenti i surfattanti. In entrambi i casi è stato osservato il medesimo comportamento, con una rapida e completa rimozione del 5CB dalle cellette della griglia in seguito al contatto con la soluzione. Questi risultati indicano che isopropanolo, metanolo ed etanolo non sono compatibili con la nostra configurazione sperimentale, poiché compromettono la permanenza del cristallo liquido all'interno della griglia e non risultano quindi adatti per veicolare i surfattanti nel sistema.

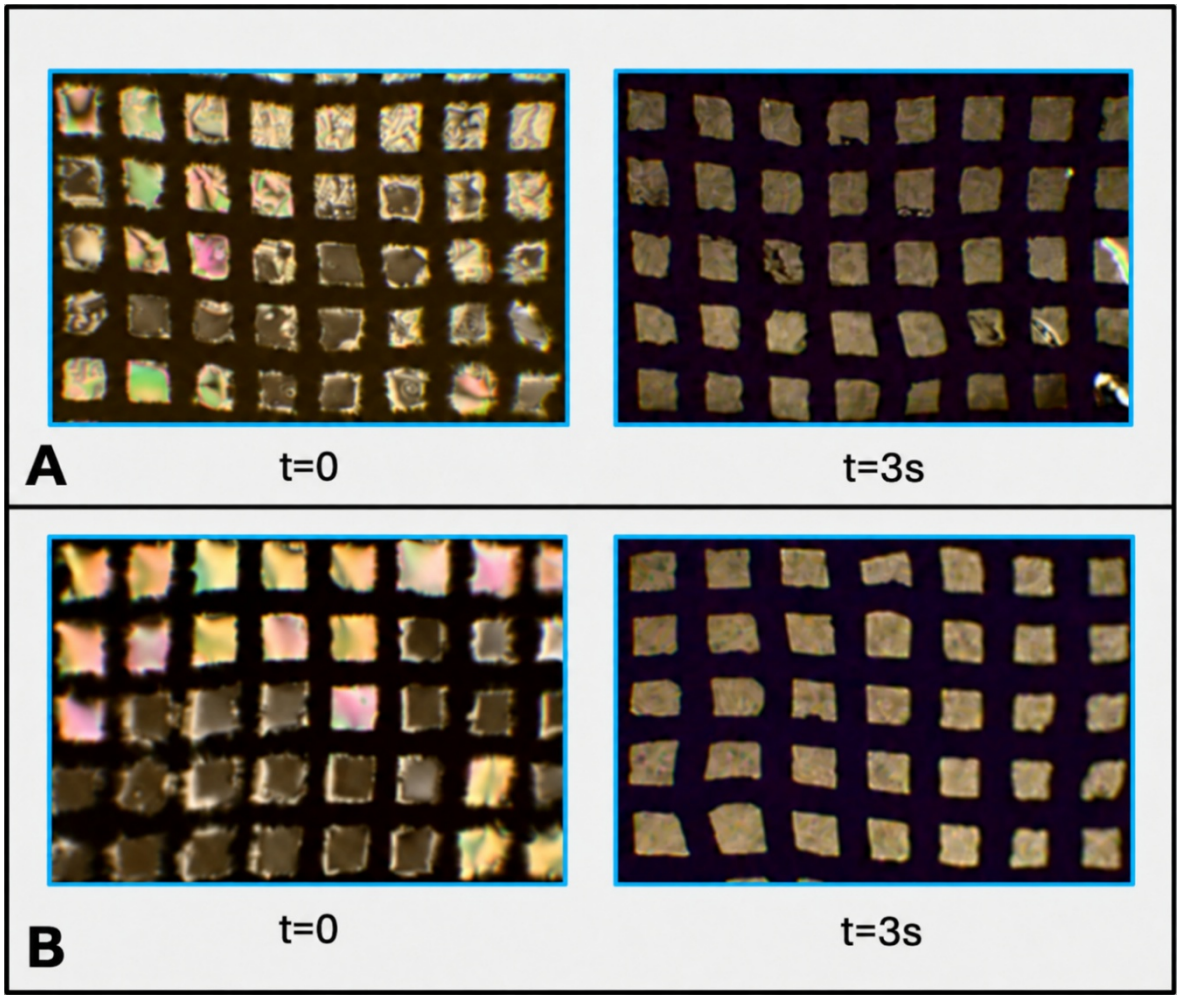



*Figura 18: Immagini dei test condotti in isopropanolo. Nell'immagine A è riportato il test con CTAB in isopropanolo, mentre nell'immagine B è riportato il test con DMOAP in isopropanolo. Per ciascun test sono mostrati i campioni all'istante iniziale (t = 0) e dopo 3 s (t = 3 s). Come si vede, nelle immagino a t =3 s, la birifrangenza non è più visibile. Ciò indica che il cristallo liquido è entrato in soluzione e non è più stabilmente presente all'interno della griglia.*

Oltre al 5CB, è stata testata anche la miscela di cristalli liquidi E7, utilizzando le stesse condizioni sperimentali e i medesimi solventi, ovvero isopropanolo,

metanolo ed etanolo. Anche in questo caso, al contatto tra la soluzione contenente il surfattante e la griglia impregnata di E7, è stata osservata una rapida e completa rimozione del cristallo liquido dalle cellette della griglia.

Successivamente, al fine di evitare l'interazione osservata tra i cristalli liquidi e i solventi organici, CTAB e DMOAP sono stati preparati in soluzione acquosa allo 0,1%. Le soluzioni sono state mantenute a circa 30 °C, sotto agitazione, per favorirne l'omogeneizzazione. I test sono stati quindi condotti seguendo il medesimo protocollo sperimentale precedentemente descritto, utilizzando sia il cristallo liquido 5CB sia la miscela nematica E7. Nel caso del DMOAP, l'impiego dell'acqua come mezzo di dispersione non ha determinato un miglioramento apprezzabile dell'allineamento del cristallo liquido. Al contrario, nei test effettuati con CTAB, dopo circa 30 minuti di contatto è stato osservato, sia per il 5CB sia per la miscela E7, un evidente cambiamento dell'organizzazione del cristallo liquido: nella maggior parte delle cellette della griglia è comparso un allineamento prevalentemente omeotropico, indicando che il CTAB in soluzione acquosa risulta significativamente più efficace nell'indurre l'orientamento perpendicolare delle molecole di cristallo liquido rispetto alle condizioni precedentemente testate (Fig. 19).

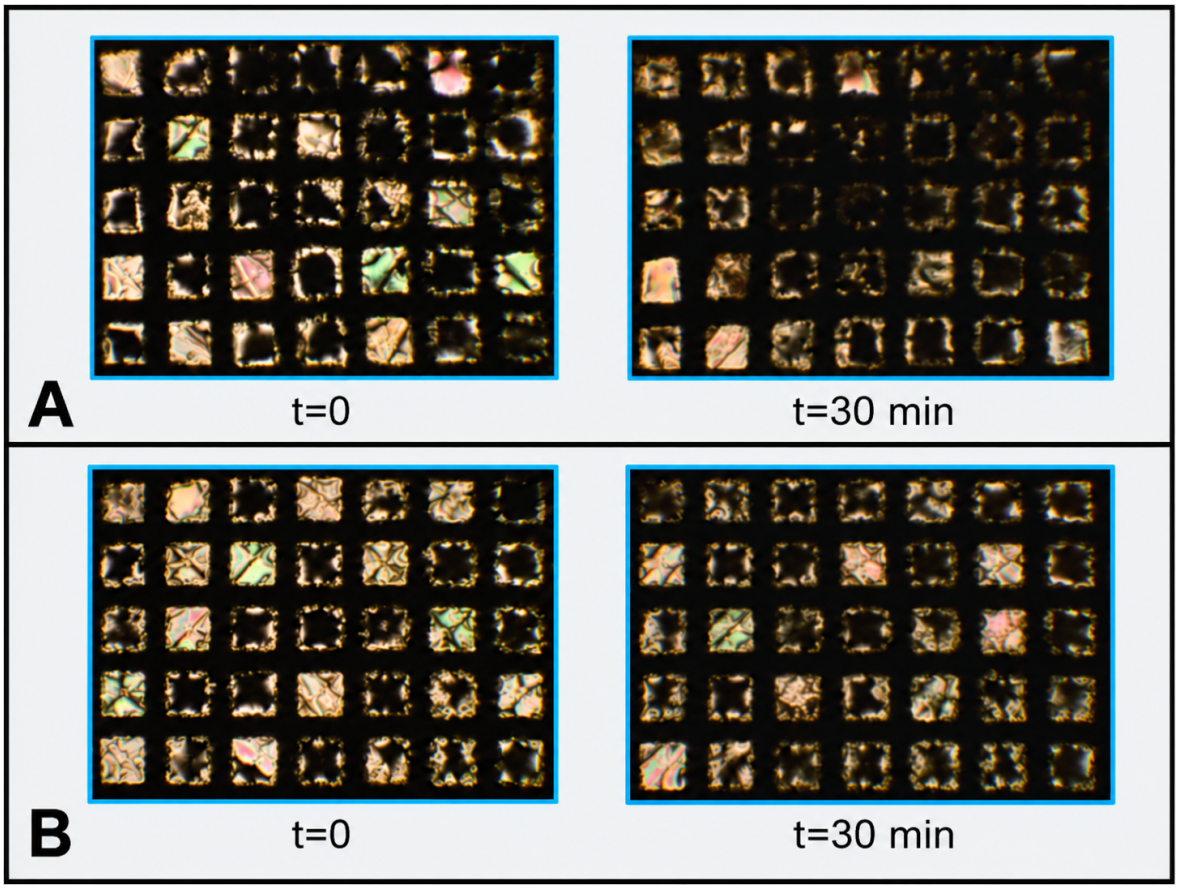



*Figura 19: Immagini delle prove condotte con CTAB riscaldato. Il pannello A è relativo alla prova effettuata con 5CB e CTAB riscaldato, mentre il pannello B è relativo alla prova effettuata con E7 e CTAB riscaldato. Per ciascuna prova sono riportate le immagini acquisite al tempo iniziale (t = 0) e dopo 30 minuti di contatto (t = 30 min). Si osserva un, seppur leggero, aumento del numero di cellette con allineamento omeotropico.*

Per l'estrazione quantitativa dei dati dalle registrazioni video è stato sviluppato un apposito codice in Python. Il video è stato suddiviso nei singoli frame e ciascuna immagine è stata convertita dallo spazio colore originale allo spazio CIELAB (LAB). Per l'analisi è stato considerato esclusivamente il canale L*,

associato alla luminosità dell'immagine e quindi al livello di intensità luminosa dei pixel. Per ogni frame è stato quindi calcolato il valore medio del canale L* considerando tutti i pixel dell'immagine, ottenendo un singolo valore rappresentativo della luminanza media del campione a ciascun istante temporale. La successione di questi valori nel tempo ha permesso di costruire le curve di luminanza in funzione del tempo e di seguire quantitativamente l'evoluzione dell'allineamento del cristallo liquido durante il test (Fig. 20).

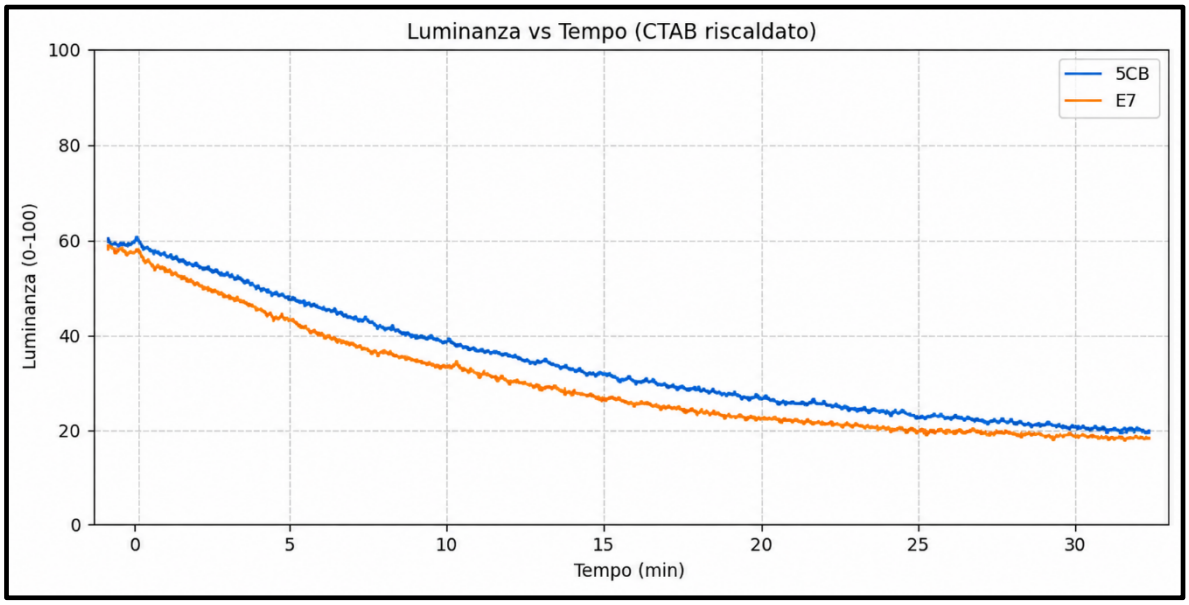



*Figura 20: Andamento della luminanza media nel tempo per i campioni di 5CB ed E7 trattati con CTAB riscaldato. La diminuzione progressiva della luminanza è associata alla variazione dell'organizzazione molecolare del cristallo liquido durante il test.*

Infine, è stato valutato un terzo surfattante, il DTAB (dodeciltrimetilammonio bromuro), impiegato in soluzione acquosa alla concentrazione dello 0,1%.

Grazie alla sua maggiore solubilità in acqua rispetto al CTAB, il DTAB può essere preparato più agevolmente in soluzione senza richiedere un riscaldamento significativo. Le prove sono state condotte seguendo il medesimo protocollo sperimentale, sia con 5CB sia con la miscela E7. Nel caso del 5CB, il DTAB ha mostrato un effetto complessivamente simile a quello osservato con il CTAB riscaldato, inducendo progressivamente un orientamento più omeotropico del cristallo liquido. Un risultato più marcato è stato invece osservato con la miscela E7, per la quale dopo circa 15 minuti di contatto è stato ottenuto un allineamento omeotropico completo in tutte le cellette della griglia, evidenziando una risposta più rapida ed efficace rispetto alle condizioni precedentemente testate (Fig. 21, 22).

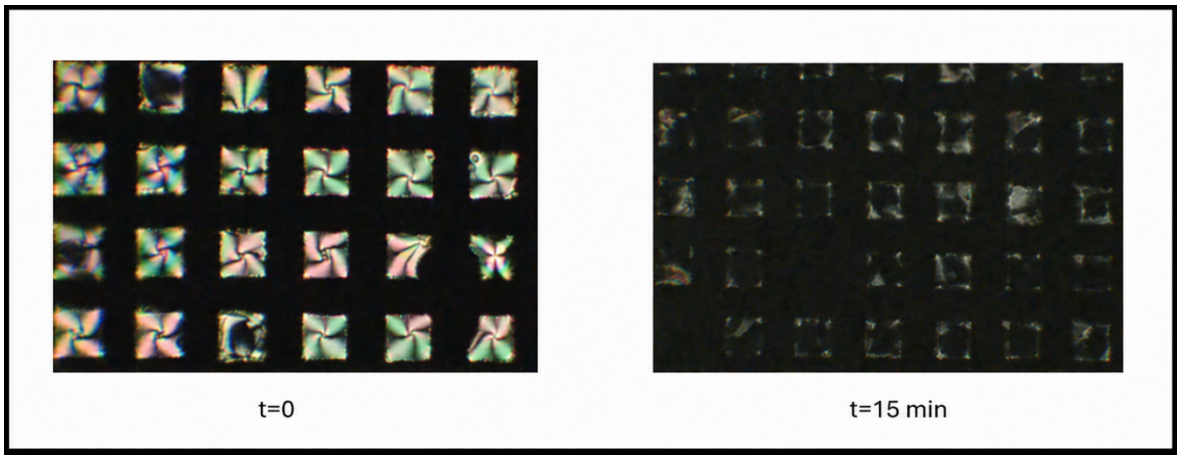


*Figura 21: Evoluzione dell'allineamento della miscela E7 in presenza di DTAB allo 0,1% in acqua. Dopo 15 minuti, si osserva la comparsa di un allineamento omeotropico pressoché completo nelle cellette della griglia.*

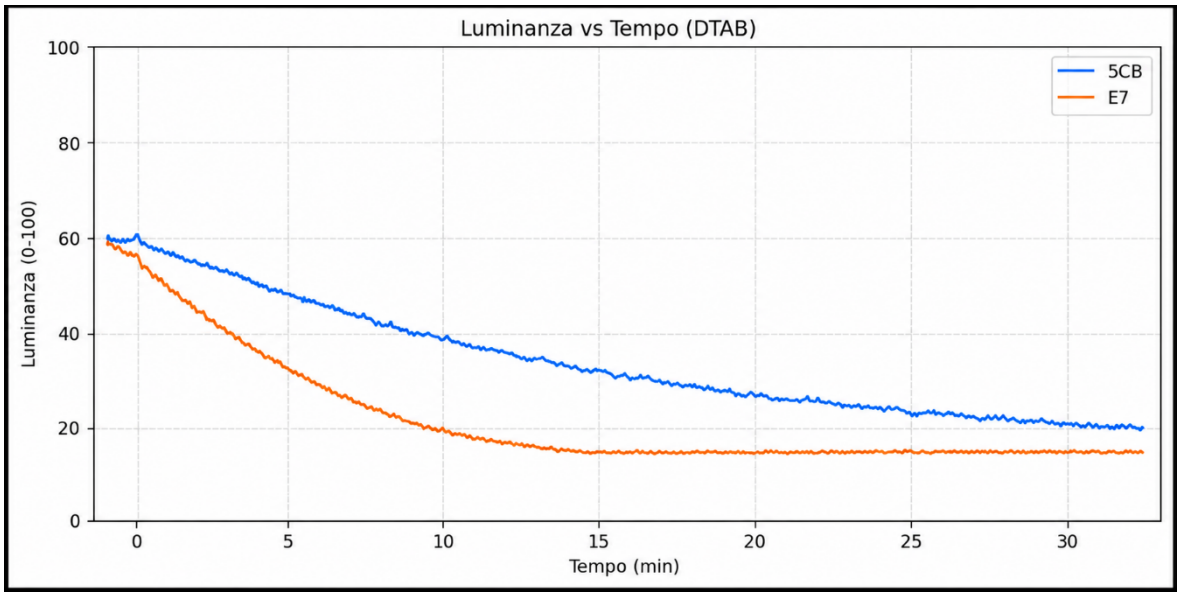



*Figura 22: Andamento della luminanza media nel tempo per i campioni di 5CB ed E7 trattati con DTAB allo 0,1%. La curva relativa a E7 raggiunge valori prossimi a 15 già dopo circa 15 minuti, indicando una più rapida evoluzione dell'allineamento rispetto al 5CB.*

### *3.3. Test con albumina sierica bovina (BSA)*

Sulla base dei risultati ottenuti nelle prove preliminari, sono state selezionate le due condizioni sperimentali più promettenti, corrispondenti al sistema 5CB + CTAB riscaldato e al sistema E7 + DTAB. Sono stati inoltre effettuati anche test con il sistema E7 + CTAB riscaldato; tuttavia, in questo caso è stato osservato un comportamento sostanzialmente analogo a quello già rilevato per

il sistema 5CB + CTAB riscaldato, senza evidenziare vantaggi aggiuntivi tali da giustificarne la scelta come configurazione preferenziale. Su queste basi, i test di risposta alla BSA sono stati quindi approfonditi nelle due configurazioni selezionate. Dopo aver raggiunto la condizione di allineamento indotta dal surfattante il portacampioni con la griglia imbibita di cristallo liquido è stato spostato su una seconda Petri, contenente una soluzione di BSA. In questo modo, la soluzione proteica è stata posta a contatto con la griglia contenente il cristallo liquido precedentemente condizionato dal surfattante e l'esperimento è stato ripetuto a diverse concentrazioni di BSA, con l'obiettivo di valutare eventuali variazioni dell'allineamento molecolare indotte dall'interazione con la BSA. Per ciascuna concentrazione, la soluzione di BSA è stata mantenuta a contatto con la griglia per 30 minuti. Al termine del tempo di esposizione è stata acquisita l'immagine al microscopio ottico a polarizzatori incrociati e ne è stata estratta la luminanza media, utilizzata come parametro quantitativo per monitorare le variazioni della risposta ottica del cristallo liquido in funzione della concentrazione di BSA. Nel sistema 5CB–CTAB riscaldato, l'esposizione a concentrazioni crescenti di BSA ha determinato una progressiva variazione della risposta ottica del cristallo liquido, evidenziata dall'aumento della luminanza media delle immagini acquisite a polarizzatori incrociati. Alle concentrazioni più basse, in particolare a 0,01 mg/mL, la risposta è risultata

pressoché sovrapponibile a quella del campione in assenza di BSA, indicando una sensibilità limitata del sistema in questo intervallo. A concentrazioni superiori, invece, si osserva un incremento graduale della luminanza, coerente con una progressiva perturbazione dell'allineamento omeotropico inizialmente indotto dal CTAB. Nel complesso, il sistema 5CB–CTAB riscaldato mostra quindi una risposta dipendente dalla concentrazione di BSA, ma garantisce un basso limite di rivelazione, pari a circa 0.1 mg/ml (Fig. 23, 24).

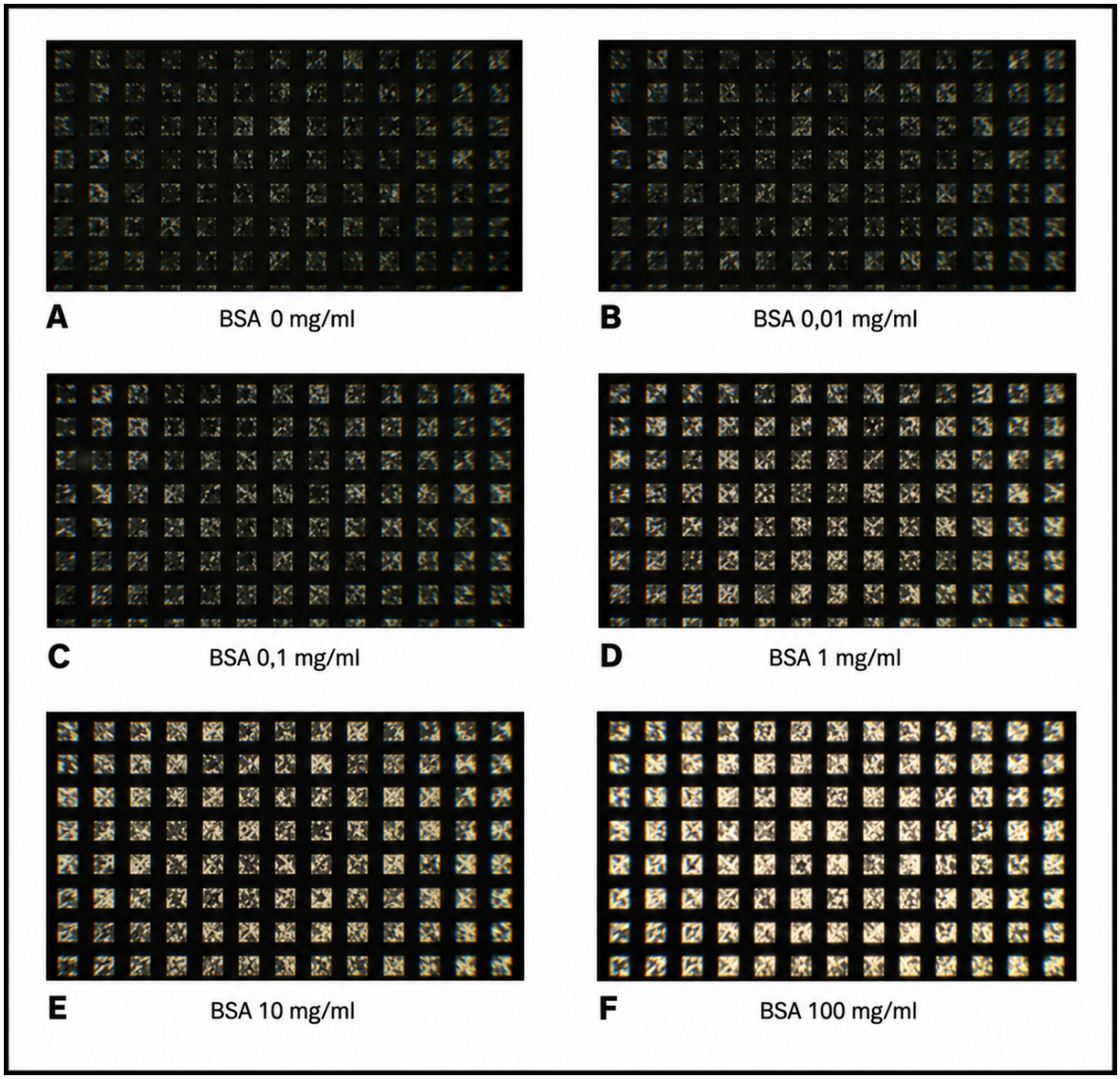



*Figura 23: Immagini al microscopio ottico a polarizzatori incrociati della risposta del sistema 5CB–CTAB 0,1 % riscaldato a concentrazioni crescenti di BSA: A) 0 mg/mL, B) 0,01 mg/mL, C) 0,1 mg/mL, D) 1 mg/mL, E) 10 mg/mL e F) 100 mg/mL.*

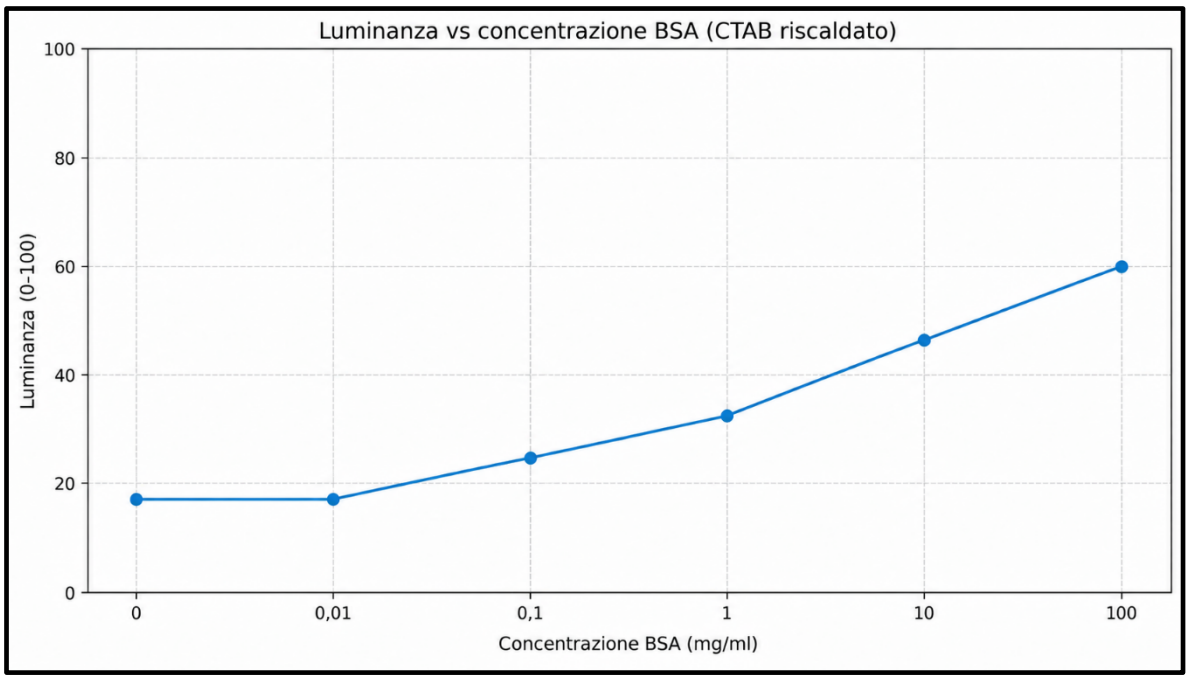



*Figura 24: Andamento della luminanza media del sistema 5CB–CTAB riscaldato in funzione della concentrazione di BSA.*

Nel sistema E7–DTAB, l'esposizione a concentrazioni crescenti di BSA ha determinato una variazione più marcata della risposta ottica rispetto al sistema 5CB–CTAB riscaldato, con un incremento della luminanza già alle concentrazioni più basse analizzate. Questo comportamento può essere ricondotto al fatto che, prima dell'aggiunta della BSA, la combinazione E7–DTAB induce un allineamento omeotropico pressoché completo in tutte le cellette della griglia, generando una condizione iniziale molto scura e uniforme sotto polarizzatori incrociati. La successiva interazione con la BSA perturba tale allineamento, determinando un aumento della luce trasmessa e quindi della

luminanza media. Il maggiore contrasto tra il bianco e i campioni contenenti BSA consente quindi di distinguere più chiaramente anche variazioni ottiche di piccola entità. Di conseguenza, rispetto al sistema 5CB–CTAB riscaldato, il limite di rilevazione migliora di circa un ordine di grandezza, il che corrisponde alla possibilità di rilevare concentrazioni di BSA circa dieci volte inferiori (Fig. 25, 26).

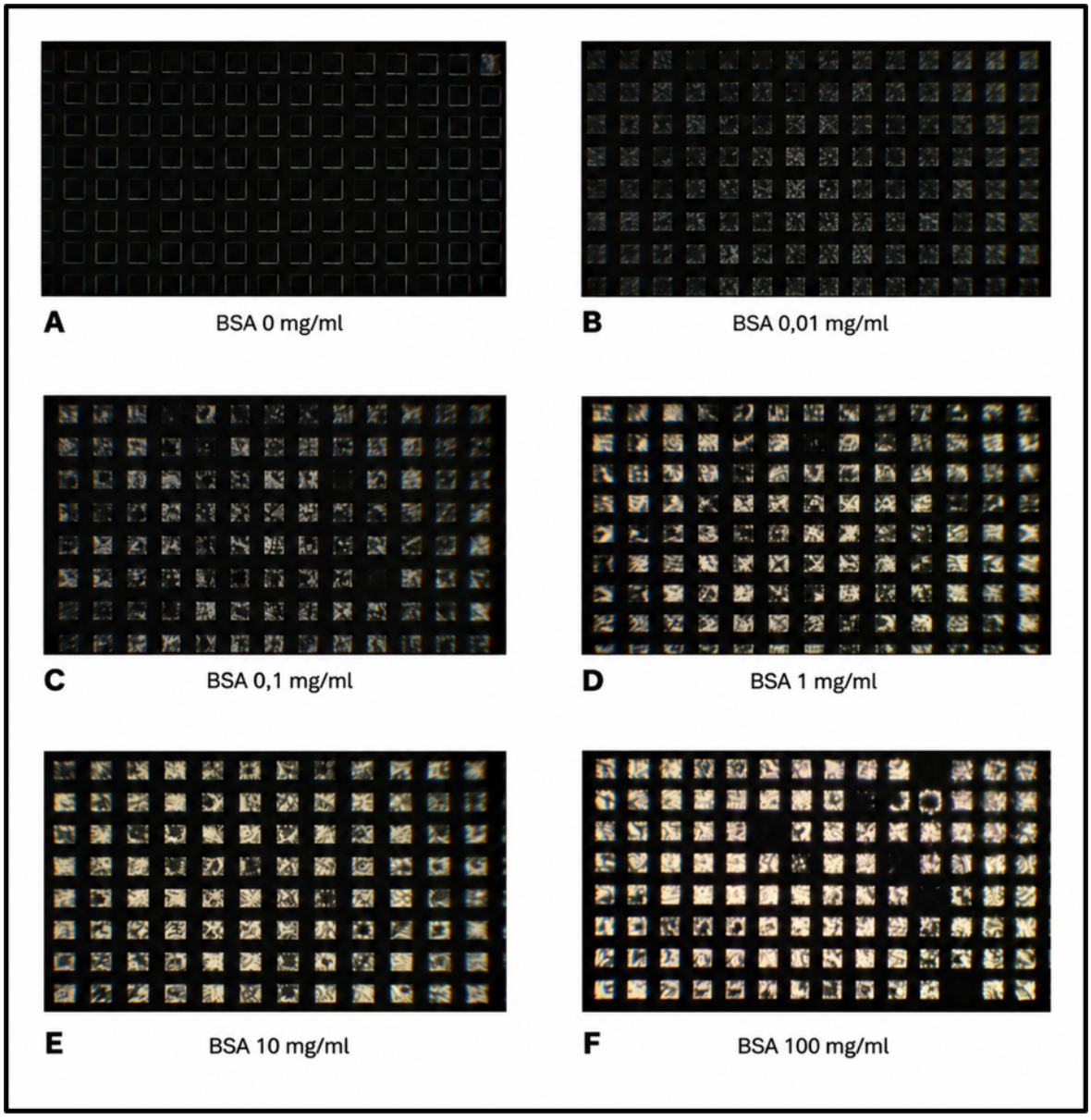


*Figura 25: Immagini al microscopio ottico a polarizzatori incrociati della risposta del sistema E7–DTAB (0,1%) a concentrazioni crescenti di BSA: A) 0 mg/mL, B) 1 µg/mL, C) 10 µg/mL, D) 100 µg/mL, E) 1 mg/mL e F) 10 mg/mL.*

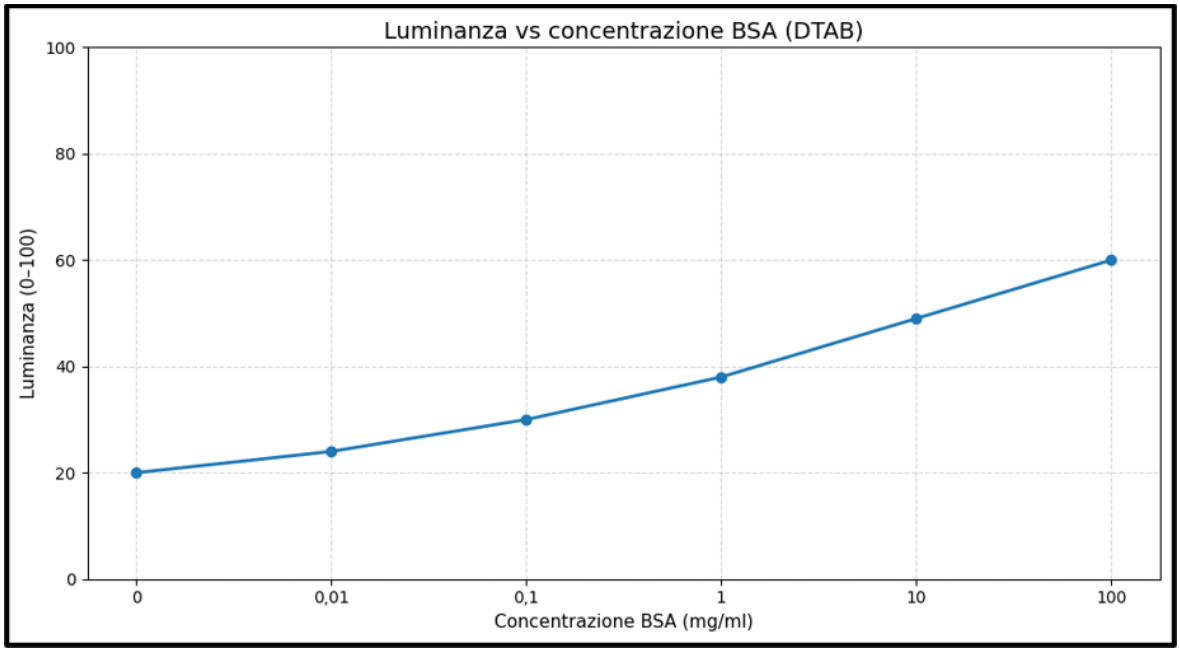



*Figura 26: Andamento della luminanza media del sistema E7–DTAB in funzione della concentrazione di BSA.*

## 4. DISCUSSIONE

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno permesso di definire la configurazione sperimentale più adatta per l'impiego delle griglie TEM come piattaforma di sensing basata su cristalli liquidi. Le prime prove hanno evidenziato l'incompatibilità di isopropanolo, metanolo ed etanolo con i cristalli liquidi 5CB ed E7, poiché il contatto con questi solventi determinava la rapida rimozione del materiale dalle cellette della griglia. Per questo motivo, i surfattanti sono stati successivamente preparati in soluzione acquosa. Il DMOAP non ha prodotto un miglioramento significativo dell'allineamento, mentre il CTAB riscaldato ha favorito, dopo circa 30 minuti, la comparsa di un orientamento prevalentemente omeotropico sia nel 5CB sia nella miscela E7. L'introduzione del DTAB all'0,1%, caratterizzato da una maggiore solubilità in acqua, ha consentito di ottenere risultati ancora più favorevoli, in particolare con la miscela E7, nella quale è stato osservato un allineamento omeotropico pressoché completo in tutte le cellette dopo circa 15 minuti. Sulla base di questi risultati sono state selezionate le configurazioni 5CB–CTAB riscaldato ed E7–DTAB per i successivi test con BSA. In tali sistemi, l'interazione tra la BSA e i surfattanti CTAB e DTAB può essere ricondotta principalmente a interazioni elettrostatiche, poiché entrambi i surfattanti sono cationici, mentre la BSA, a pH neutro, presenta una carica netta negativa. L'attrazione tra la proteina e le

teste polari positivamente cariche dei surfattanti va quindi a perturbare l'organizzazione interfacciale responsabile dell'allineamento del cristallo liquido. L'esposizione a concentrazioni crescenti di proteina ha infatti determinato una progressiva perturbazione dell'allineamento iniziale, accompagnata da un aumento della luminanza misurata nelle immagini acquisite a polarizzatori incrociati. La quantificazione mediante analisi del canale L* dello spazio colore LAB ha consentito di correlare la risposta ottica alla concentrazione di BSA. Il sistema E7–DTAB ha mostrato una risposta più evidente alle basse concentrazioni rispetto al sistema 5CB–CTAB riscaldato, verosimilmente grazie al maggiore contrasto tra la condizione iniziale, caratterizzata da un allineamento omeotropico più uniforme e quindi da una bassa luminanza, e la condizione successiva all'interazione con la proteina. Questo ha permesso di ottenere un limite di rilevazione migliore di circa un ordine di grandezza, arrivando a 0.01 mg/ml, evidenziando la configurazione E7–DTAB come la più promettente tra quelle analizzate. Sebbene la sensibilità debba ancora essere ottimizzata, il biosensore proposto in questa tesi è portatile, economico, facile e veloce da realizzare e permette una lettura dei dati semplice e quantitativa, soddisfando così molti dei requisiti di un biosensore ideale. L'ottimizzazione del limite di rilevazione e del grado di specificità, saranno oggetto di studi futuri.

## 5. PROSPETTIVE FUTURE

Come sviluppo futuro, il sistema sarà ulteriormente ottimizzato mediante la funzionalizzazione con anticorpi specifici, con l'obiettivo di trasformare la risposta attualmente osservata utilizzando la BSA in un meccanismo di riconoscimento altamente selettivo. L'introduzione di anticorpi immobilizzati all'interfaccia del sistema permetterà infatti di sfruttare l'interazione antigene–anticorpo come evento di riconoscimento molecolare, inducendo una variazione dell'allineamento del cristallo liquido solo in presenza dell'analita target. In questo modo sarà possibile ridurre l'influenza di interazioni aspecifiche e migliorare contemporaneamente selettività, sensibilità e affidabilità del biosensore. Le attività future saranno quindi orientate all'ottimizzazione delle condizioni di funzionalizzazione, alla verifica della risposta in presenza di interferenti e alla definizione delle prestazioni analitiche del sistema, con particolare attenzione a limite di rilevazione, selettività e riproducibilità.

## 6.BIBLIOGRAFIA

[1] Popov, P., Mann, E. K., Jákli, A. Thermotropic liquid crystal films for biosensors and beyond. J. Mater. Chem. B, 2017, 5, 5061–5078. DOI: 10.1039/C7TB00809K

[2] V.K. Gupta, J.J. Skaife, T.B. Dubrovsky, N.L. Abbott, *Optical amplification of ligand-receptor binding using liquid crystals*, Science 1998, 279, 2077–2080.

[3] P.J. Collings, *Liquid Crystals: Nature's Delicate Phase of Matter*, Princeton Science Library, 1990

[4] S.R. Kim, R.R. Shah, N.L. Abbott, *Orientations of liquid crystals on mechanically rubbed films of bovine serum albumin: A possible substrate for biomolecular assays based on liquid crystals,* Anal. Chem. 2000, 72, 4646–4653.

[5] M. Khan, A. Rahim Khan, J-H Shin, S-Y Park, *A liquid-crystal-based DNA biosensor for pathogen detection*, Scientific Reports, 2016, 6, 22676

[6] P. Popov, E.K. Mann and A. Jákli, *Thermotropic Liquid Crystal Films for Biosensors and Beyond*, J. Mater. Chem. B, 2017,5, 5061-5078

[7] R. Qu and G. Li, *Overview of Liquid Crystal Biosensors: From Basic Theory to Advanced Applications*, Biosensors 2022, 12, 205.

[8] Jahanban-Esfahlan, A.; Ostadrahimi, A.; Jahanban-Esfahlan, R.; Roufegarinejad, L.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. *Recent developments in the detection of bovine serum albumin*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138, 602–617.

[9] Mazzoldi, P.; Nigro, M.; Voci, C. Fisica. Vol. II – Elettromagnetismo e onde, 3rd ed.; EdiSES, 2021. ISBN 9788836230303.

[10] Horn, R. G. *Refractive indices and order parameters of two liquid crystals*. Journal de Physique, 1978, 39, 105–109.

[11] Bedjaoui, L.; Gogibus, N.; Ewen, B.; Pakula, T.; Coqueret, X.; Benmouna, M.; Maschke, U. *Preferential solvation of the eutectic mixture of liquid crystals E7 in a polysiloxane*. Polymer, 2004, 45, 6555–6560.

## RINGRAZIAMENTI

Van Gogh dipingeva i girasoli sempre rivolti verso la luce. Guardando indietro a questo percorso, mi accorgo che anch'io ho sempre avuto una luce verso cui voltarmi, ovvero le persone che mi hanno accompagnata fin qui. A ciascuna di loro va la mia gratitudine più sincera.

La mia riconoscenza va innanzitutto alla mia relatrice, la professoressa Liana Lucchetti, per la guida attenta, la disponibilità e la fiducia con cui ha seguito il mio lavoro. I suoi preziosi consigli hanno dato forma a questa tesi e mi hanno insegnato molto, ben oltre la dimensione accademica.

Ringrazio Lorenzo, mio tutor, per la pazienza infinita, per il tempo dedicato e per avermi sostenuta ogni volta che un risultato sembrava sfuggirmi. Senza il suo aiuto costante e la sua lucidità, questo lavoro non sarebbe stato lo stesso.

Devo molto alla mia famiglia, che è stata il mio porto sicuro a cui ho sempre potuto fare ritorno. Nei giorni di slancio come in quelli di stanchezza, non mi avete mai fatto sentire sola, custodendo i miei passi con amore incondizionato.

A mia madre dedico le parole più grandi: hai creduto in me sempre, persino quando io non ne ero capace. Quando il dubbio sembrava più forte di me, tu hai continuato a vedere ciò che io non riuscivo. Se sono arrivata fin qui, lo devo prima di tutto a te.

A mio padre, che mi ha insegnato il valore dell'impegno senza bisogno di grandi discorsi: il tuo esempio ha parlato per te. Grazie per ogni sacrificio fatto in silenzio, per esserci sempre stato con discrezione e forza.

A mia sorella, che sa essere una presenza vivace ma che, a modo suo, con piccoli gesti e senza clamore, mi ha sempre aiutata. Anche quando fingevi di non farlo, io sapevo di poter contare su di te.

Al mio fidanzato, che ha ascoltato le mie paure e ha saputo trovare le parole giuste quando io non le trovavo. Grazie per la pazienza, per la tenerezza e per aver reso questo cammino meno faticoso, stando al mio fianco.

A Gianni, grazie per la tua presenza discreta ma costante e per la tua pazienza smisurata.

Ai miei amici, che mi hanno regalato risate nei momenti più bui e leggerezza quando ne avevo più bisogno. Con voi ho imparato che si può essere stanchi e, allo stesso tempo, profondamente felici.

A tutti voi: grazie. Come un girasole cerca il sole, io ho cercato voi, e non ho mai smesso di trovarvi.