



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

Appunti universitari

Tesi di laurea

Cartoleria e cancelleria

Stampa file e fotocopie

Print on demand

Rilegature

NUMERO: 1696A -

ANNO: 2015

A P P U N T I

STUDENTE: Tortorici

MATERIA: Bionanotecnologie. Prof.Ciardelli

Il presente lavoro nasce dall'impegno dell'autore ed è distribuito in accordo con il Centro Appunti.

Tutti i diritti sono riservati. È vietata qualsiasi riproduzione, copia totale o parziale, dei contenuti inseriti nel presente volume, ivi inclusa la memorizzazione, rielaborazione, diffusione o distribuzione dei contenuti stessi mediante qualunque supporto magnetico o cartaceo, piattaforma tecnologica o rete telematica, senza previa autorizzazione scritta dell'autore.

**ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.**

BIONANOTECNOLOGIE

Lezioni: Gianluca Ciardelli

INDICE

Polimeri: generalità.....	2
Introduzione alle nanotecnologie.....	7
BioMEMs.....	8
Metodi di Rilevazione.....	14
Reazioni di polimerizzazione.....	29
Electrospinning.....	41
BioMEMs: casi applicativi.....	44
Ottimizzazione delle interazioni cellula – matrice.....	49
Funzionalizzazione superfici.....	54
Spettroscopia.....	61
Seminario: smart bio interfaces.....	74
Fabbricazione di micro e nanostrutture.....	75
Micro e nanoparticelle per applicazioni biomediche.....	86
Proprietà meccaniche dei polimeri.....	100
nanoparticelle in diagnostica.....	105

Nel rappresentare la formula di un polimero si scrivono solo le sue unità strutturali, trascurando i gruppi terminali (la cui costituzione è irrilevante o non nota). Per esempio:





n è il grado di polimerizzazione (numero di unità ripetitive).

La nomenclatura dei polimeri può essere:

- **nomenclatura comune:** sono nomi commerciali (per es nylon) o che derivano dallo scopritore (per es bakelite);
- **nomenclatura corrente:** si definisce il polimero in base al monomero di origine (etilene → polietilene);
- **nomenclatura IUPAC:** si definisce il polimero in base all'unità che si ripete n volte (il polietilene è polimetilene).

Esempi:

MONOMERO	UNITA' RIPETITIVA	CORRENTE	IUPAC
$\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ etilene	$(-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 -)_n$ dimetilene	polietilene	poli(dimetilene)
$\text{CH}_2 = \text{CH}$  stirene	$(-\text{CH}_2 - \text{CH}-)_n$  1-fenil-etilene	polistirene	poli(1-fenil-etilene)

Nome basato sul monomero (nome corrente)	Nome basato sulla struttura (nome IUPAC)
polistirene	Poli(1-feniletilene)
poliacrilonitrile	Poli(1-cianoetilene)
Poli(etilene ossido)	Poli(ossietilene)
Poliisobutilene	Poli(1,1-dimetiletilene)
Poli(metil metacrilato)	Poli[(1-metossicarbonil)-1-metiletilene]
Polipropilene	Poli(1-metiletilene)
Poli(tetrafluoroetilene)	Poli(difluorometilene)
Poli(vinil acetato)	Poli(1-acetossietilene)
Poli(vinil alcool)	Poli(1-idrossietilene)
Poli(vinil cloruro)	Poli(1-cloroetilene)

La nomenclatura più usata è quella corrente.

Per i copolimeri bisogna indicare sia i diversi monomeri che il tipo di copolimero:

- alt → alternati: poli[stirene-alt-(metil metacrilato)]
- block → a blocchi: polistirene-block-poli(metil metacrilato)
- graft → a innesto: polistirene-graft-poli(metil metacrilato)
- co → copolimero statistico: poli(stirene-co-metil metacrilato)

Oppure si usa il nome commerciale.

	w _i	PM _i
1	30 g	10 000
2	50 g	50 000
3	20 g	500 000

Si calcola:

$$\bar{M}_n = \frac{n_1 PM_1 + n_2 PM_2 + n_3 PM_3}{n_1 + n_2 + n_3} = \frac{\frac{w_1}{PM_1} PM_1 + \frac{w_2}{PM_2} PM_2 + \frac{w_3}{PM_3} PM_3}{\frac{w_1}{PM_1} + \frac{w_2}{PM_2} + \frac{w_3}{PM_3}} = 24700 \text{ g/mol}$$

$$\bar{M}_w = \frac{w_1 PM_1 + w_2 PM_2 + w_3 PM_3}{w_1 + w_2 + w_3} = 128000 \text{ g/mol}$$

Altri parametri in relazione ai pesi molecolari sono il *grado di polidispersità* $\alpha = M_w / M_n$, che per i polimeri commerciali è compreso tra 1,5 e 2,5, e il *grado di polimerizzazione* (numero di unità che si ripetono in catena), che può essere definito come:

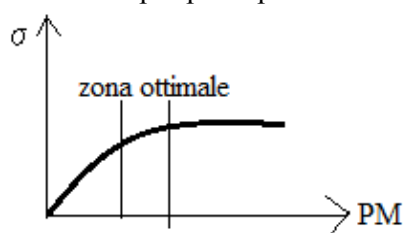
- grado di polimerizzazione medio numerale: $X_n = M_n/M_0$
- grado di polimerizzazione medio ponderale: $X_w = M_w/M_0$

dove M_0 è il peso molecolare dell'unità ripetente.

Il PM medio del polimero influenza:

- proprietà meccaniche: a parità di chimica, maggiore è il PM medio, maggiore è la forza del polimero;
- lavorabilità del materiale: al crescere di PM medio, cresce la difficoltà di lavorazione (aumenta la viscosità del fuso polimerico o delle soluzioni polimeriche; influenza la solubilità);
- cinetica di cristallizzazione: al crescere di PM medio, la cristallizzazione diventa più difficile (è più difficile ottenere impacchettamento).

Per esempio per il polietilene:



nella zona ottimale si hanno buone proprietà meccaniche, ma senza avere un PM troppo elevato, che altrimenti potrebbe essere fastidioso durante la lavorazione.

La struttura dei polimeri è definita da:

- **costituzione:** chimica del polimero (successione degli atomi);
- **conformazione:** disposizione delle catene per rotazioni lungo gli assi del legame singolo covalente. Può essere definita per tutti i polimeri e può essere a elica, a catena ripiegata, a gomito statistico o completamente estesa;
- **configurazione:** disposizione dei sostituenti nei C chirali. Può essere definita solo per i polimeri che contengono C chirali e può essere isotattica, sindiotattica o atattica.

reticolazione.

Il comportamento del polimero è diverso a seconda della densità delle reticolazioni e della flessibilità delle catene comprese tra i ponti di reticolazione. Sono amorfi, con T_g che può arrivare a essere superiore alla T di decomposizione nel caso di polimeri altamente reticolati e con gruppi ingombranti. Hanno stabilità di forma fino a T elevate e non sono solubili in solvente.

I polimeri reticolati si possono ottenere a partire da monomeri fatti polimerizzare in uno stampo (polimeri **termoindurenti**, come le resine), oppure a partire da catene ad alto PM (sono già polimeri!) con gruppi laterali reattivi che possono legare le catene.

I polimeri **elastomerici** sono polimeri termoplastici o debolmente reticolati che sono in grado di deformarsi fino al 700-800% di allungamento percentuale e alla rimozione del carico recuperano totalmente la deformazione in poco tempo. Hanno T_g << T ambiente.

Gli elastomeri debolmente reticolati (per es la gomma naturale) presentano 2-3 reticolazioni per ogni catena, che non limitano la flessibilità del materiale, ma impediscono gli scorrimenti plastici.

Gli elastomeri termoplastici sono copolimeri a blocchi con regioni soft e regioni hard. Le regioni hard hanno T_g >> T di utilizzo: sono allo stato vetroso e fungono da punti di reticolazione fisici. Le regioni soft hanno T_g << T di utilizzo e sono deformabili.

INTRODUZIONE ALLE NANO TECNOLOGIE

Non esiste una definizione univoca di nanotecnologia.

“Le nanotecnologie sono la comprensione e il controllo della materia a dimensioni di **1-100 nm**, dove fenomeni unici permettono nuove applicazioni” (National Nanotechnology Initiative, USA 2000).

In sintesi, con nanotecnologie si intende la capacità di osservare, misurare e manipolare la materia su scala atomica e molecolare.

In biologia la nanoscala fa riferimento a DNA (2 nm) e proteine (100 nm): le cellule sono già troppo grosse (microscala).

Le *nanoscienze* sono un insieme di discipline usate per comprendere i fenomeni alla nanoscala.

Le *nanotecnologie* consistono nell'applicazione delle nanoscienze per lo sviluppo di tecnologie. Possono avere due approcci diversi: top down e bottom up.

L'approccio **top down** consiste nella riduzione delle dimensioni delle strutture con metodi fisici verso livelli nano. In pratica uno “scalpello” nanometrico lavora un materiale, dandogli una risoluzione alla nanoscala. Come strumento di lavoro si può usare una radiazione elettromagnetica con lunghezza d'onda confrontabile alla nanoscala (e quindi ad alta energia). Infatti:

$$E = h \nu$$

dove h è la costante di Plank e ν è la frequenza, data da: $\nu = c/\lambda$, con c velocità della luce e λ lunghezza d'onda. Il raggio va mosso mediante un sistema CAD.

Una tecnica usata in diversi settori è quella del FIB (focused ion beam), che funziona con un fascio di ioni gallio localizzati. Il processo che si verifica quando 30 keV di ioni Ga⁺ colpiscono il campione è lo *sputtering* (polverizzazione). Gli atomi del campione vengono rimossi dalla superficie (in varie forme: ioni, neutri, metastabili) come conseguenza di un processo di collisione a cascata provocato dal fascio ricevuto. È usato per l'incisione di codici a barre anti contraffazione. FIB lavora anche con approccio bottom up.

Con l'approccio **bottom up** si parte da piccoli componenti (normalmente molecole) e si cerca di controllare/indirizzare l'assemblaggio, utilizzandoli come building blocks per realizzare nanostrutture, sia di tipo inorganico che organico/biologico.

Si può usare un composto metallo organico (cioè un metallo circondato da leganti organici, che servono a rendere il metallo più leggero): FIB rompe i leganti, facendo depositare il metallo.

L'approccio bottom up consente un controllo più raffinato rispetto al top down, ma la disponibilità

Materiali: silicio (materiali microelettronici in generale), polimeri (silicone), materiali biologici (usati come sensori).

I bioMEMs possono avere applicazioni diagnostiche: in tal caso vengono detti BioChips e sono usati per rilevare cellule, microorganismi, virus, proteine, DNA e acidi nucleici correlati, oltre a piccole molecole di interesse biochimico.

Vantaggi della nanoscala:

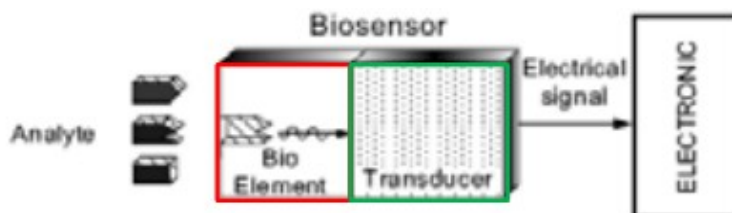
- maggior sensibilità del probe (sensore);
- riduzione volume dei reagenti e dei costi associati;
- riduzione dei tempi di analisi;
- portabilità e miniaturizzazione dell'intero sistema di analisi.

Ogni BioMEM ha 3 elementi fondamentali:

- elemento sensibile (riconosce l'analita);
- trasduttore;
- elettronica di supporto.

Il sistema deve essere selettivo e miniaturizzabile. Esistono già molti sistemi alla microscala.

I **biosensori** sono dispositivi analitici che combinano un elemento biologicamente sensibile con un trasduttore fisico o chimico allo scopo di determinare selettivamente e quantitativamente la presenza di composto specifici in un dato ambiente esterno.



Un biosensore può essere considerato come la combinazione di un biorecettore, un componente biologico e un trasduttore

Il mediatore biologico (primo blocco), detto anche elemento di riconoscimento molecolare, è responsabile della selettività; può essere nel caso più semplice un enzima o un sistema più complesso con un certo numero di enzimi che lavorano in cascata (organelli sub cellulari, cellule o batteri, tessuti animali contenenti una o più molecole proteiche specifiche)

Il trasduttore (secondo blocco), invece, è l'elemento che traduce il segnale di riconoscimento biologico in un segnale elettrico. La scelta del trasduttore dipende dal tipo di modifica biochimica; i due componenti devono essere compatibili per dar luogo ad un segnale elettrico: è impossibile, ad esempio, usare un trasduttore termico se la reazione di trasformazione del substrato non crea una variazione di entalpia.

I sensori possono essere suddivisi secondo la classe della molecola che costituisce la parte sensibile del sistema:

- bioriconoscimento enzimatico;
- bioriconoscimento immunologico (immunosensori);
- metodi utilizzanti DNA per il riconoscimento dei geni;
- metodi di riconoscimento cellulare (modifica crescita cellulare o alterazioni metabolismo);
- metodi tessutali.

Riconoscimento del DNA: PCR

La PCR (reazione a catena della polimerasi) è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Consiste in una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi (l'amplificazione del DNA è semplice grazie alla sua capacità di autoreplicazione).

La PCR si basa sull'esecuzione ciclica delle fasi di:

associano. Solitamente si usa: $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$.

Si possono seguire due tipi di criteri riguardo a T_a :

- T_a costante durante i cicli;
- approccio touch-down: T_a diminuisce ciclo dopo ciclo. Questo è possibile perché all'inizio serve un'alta selettività, ma con l'aumentare del numero di catene questa necessità diminuisce (alta $T \rightarrow$ il primer si accoppia solo a zone di DNA a cui è altamente affine).

Il tempo di annealing non deve essere troppo lungo per non consentire appaiamenti tra stampi a bassa complementarità (riduce selettività). Di solito è sui 30 secondi o meno.

Infine avviene la sintesi del DNA ad opera della DNA polimerasi. Si usa l'enzima del *thermophilus aquaticus*, che è in grado di lavorare a 75°C . Il ciclo può essere ripetuto anche 60 volte. La replicazione non è perfetta: in teoria alla fine del processo dovrebbero ottenersi 2^n copie, invece se ne ottengono $(1+e)^n$, dove e è l'efficienza dell'amplificazione e vale circa 0,7-0,8; n è il numero di cicli di amplificazione.

Ricapitolando: i primer sono in genere rappresentati da oligonucleotidi sintetizzati chimicamente contenenti da 15 a 20 nucleotidi. Vengono usati due primer per iniziare la sintesi di DNA in direzioni opposte usando filamenti complementari di DNA. La reazione inizia con la separazione dei due filamenti di DNA che viene ottenuta scaldando lo stampo di DNA (circa 95°C). La temperatura viene quindi abbassata per permettere l'attacco dei primer alle sequenze complementari su due opposti filamenti di DNA. La DNA polimerasi usa quindi i primer per sintetizzare ciascun filamento complementare a ciascuno stampo. Perciò, ad ogni ciclo di amplificazione, due nuove molecole di DNA vengono sintetizzate a partire da uno stampo. Il processo può essere ripetuto molte volte portando ad un raddoppiamento delle molecole di DNA ad ogni ciclo di amplificazione. Con la PCR si amplifica un pezzo di DNA genomico; non interessa quale sia la funzione dei singoli geni.

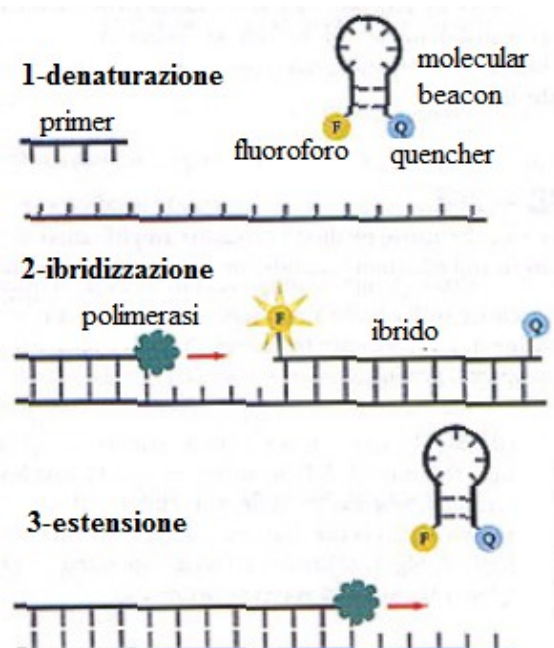
La PCR può essere effettuata su DNA genomico per:

- identificare un individuo (medicina legale);
- identificare la presenza di un determinato microorganismo;
- individuare eventuali mutazioni;
- clonare regioni genomiche.

Una variante della PCR permette di amplificare solo i geni che vengono trascritti (esoni \rightarrow porzioni di DNA che codificano proteine). Si parte dall'mRNA di una cellula, che viene ritrascritto in DNA, ottenendo il cDNA (complementare) che è l'unione degli esoni. Il cDNA viene amplificato mediante la PCR. Questa tecnica viene detta **RT-PCR**.

Un'altra variante è la **PCR Real Time**, che consente di monitorare il processo di amplificazione in tempo reale. Può essere applicata in due modi diversi.

Il primo metodo consiste nell'uso di un molecular beacon (falò molecolare) costituito da una singola catena di DNA con alle estremità molte basi complementari (soprattutto C-G). In condizioni particolari la molecola assume una conformazione a forcina, con un loop e un gambo (stem). Alle due estremità si mettono una molecola fluorescente e un quencher, che assorbe la radiazione emessa. Quando la molecola è in conformazione a forcina, il quencher è vicino al fluoroforo e non si vede fluorescenza; viceversa, se la molecola è estesa si vede fluorescenza. All'inizio della reazione, il molecular beacon si

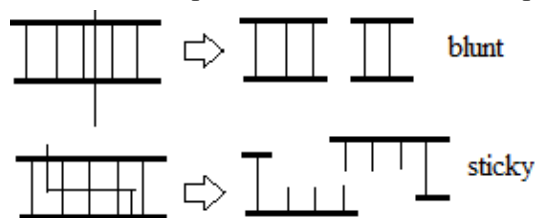


si trasferisce il gel elettroforetico su un foglio di cellulosa, poi si incuba con una sonda specifica per il DNA da rilevare. La radioattività serve a colorare specificatamente una sequenza per localizzarla: dopo l'incubazione, si rileva la presenza delle bande di interesse. Al posto della radioattività si può sfruttare la fluorescenza.



La tecnica può essere usata anche sull'RNA; in tal caso si parla di **northern blotting**. Il **western blotting**, invece, è usato sulle proteine: in questo caso l'elemento di riconoscimento è un anticorpo (anche l'elettroforesi può essere eseguita sulle proteine, ma esse vanno prima caricate).

Dopo l'elettroforesi, si può ricostruire il peso molecolare delle specie in base alla distanza percorsa grazie alla retta di taratura.



Taglio del DNA mediante enzimi:

- blunt;
- sticky.

Lipase Chain Reaction (LCR)

Si tratta di una alternativa alla PCR. Nel processo non si usa una polimerasi, ma una ligasi, enzima che lega due frammenti di DNA (in natura la replicazione del DNA è discontinua in una direzione; alla fine la ligasi unisce i pezzi, detti frammenti di Okazaki). Anche in questo caso si parte da DNA a doppia elica, che viene denaturato; poi si esegue l'annealing dei probe. I probe, però, sono lunghi e stanno vicini tra loro (sono due semiporzioni del pezzo di DNA che si vuole amplificare). La polimerasi sfrutta i probe oligonucleotidici come innesco e inizia a sintetizzare un nuovo filamento di DNA usando quello di partenza come stampo. L'azione della polimerasi fa sì che i due oligonucleotidi vengano collegati tra loro tramite il filamento neosintetizzato. Questi tre filamenti, però, non sono ancora uniti; a questo provvede la ligasi attraverso la formazione di legami covalenti tra di loro. In tale modo viene a crearsi un filamento unico che verrà utilizzato come stampo nei cicli successivi.

Nella PCR si amplifica il target, nella LCR si amplifica il probe. Messi i probe giusti, la reazione procede. Se i probe messi non sono complementari, le sequenze non si ibridizzano o si ibridizzano troppo lontane tra loro e la ligasi non le unisce.

I passi della tecnica sono i seguenti:

0. Il Probe è una sonda costituita da DNA complementare ad una sequenza di cui voglio identificare la presenza
1. Il Probe si ibridizza specificatamente al bersaglio
2. Le probe sono legate tra loro per realizzare una copia del DNA target
3. La miscela di reazione è riscaldata per separare le catene di DNA
4. ssDNA forma nuovi stampi per un successivo legame con i probe
5. I simboli alle estremità servono per la rilevazione
6. Nella LCR anziché amplificare il DNA bersaglio (Target) amplifico il Probe.

In fondo al probe ci sono due molecole organiche (non sono DNA) che fungono da antigene per un

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

$$\Delta m = \frac{k}{4\pi^2} \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right)$$

- **Reazione biochimica (stress sensing):** Viene fatta avvenire una reazione biochimica selettivamente su un lato del cantilever. Un cambiamento nell'energia libera di superficie risulta in un cambiamento dello stress superficiale, che comporta un piegamento (*bending*) misurabile del cantilever. Il bending è misurabile otticamente con un laser (come nella microscopia a forza atomica, AFM) oppure elettricamente con un piezo-resistore posizionato all'estremità fissa del cantilever.

$$\Delta z = 4 \left(\frac{l}{t} \right)^2 \frac{(l-v)}{E} (\Delta \sigma_1 - \Delta \sigma_2)$$

Il principale vantaggio nell'uso di sistemi meccanici è che non bisogna sfruttare marcatori particolari (**label free**).

Per rendere il cantilever sensibile alla presenza di DNA, si possono immobilizzare su di esso delle molecole di DNA a singolo filamento. A questi monofilamenti si attaccheranno solo i complementari, la massa aumenterà e ci sarà una deflessione del cantilever. Lo stress sensing può essere attuato per rilevare DNA o proteine, ma non entità più grosse come cellule o virus. Con questo metodo si possono creare array di mensole, ciascuna con una sequenza diversa di DNA immobilizzato. Per la rilevazione di proteine, si immobilizzano degli anticorpi: questo metodo viene sfruttato per la rilevazione di marker tumorali.

Rilevazione ottica: è il metodo più usato. In questo caso è necessario marcare ciò che si vuole misurare.

Le tecniche a rilevazione della fluorescenza sono basate su marker fluorescenti che emettono luce ad una specifica lunghezza d'onda. L'entità da rilevare deve aderire alla superficie del chip, cosa che viene ottenuta sfruttando dei **capture probe**, che possono essere molecole di DNA a singolo filamento o anticorpi. Il DNA o le proteine marcati si ibridizzano al probe, dando un segnale luminoso. Con questo metodo si può rilevare anche la presenza di cellule, che vengono catturate mediante anticorpi selettivi per proteine extramembranali e vengono individuate sfruttando il legame di anticorpi marcati con altre proteine di membrana.

La fluorescenza può essere definita come l'assorbimento molecolare dell'energia luminosa (fotone) ad una certa lunghezza d'onda e la sua riemissione ad un'altra lunghezza d'onda. È dovuta a proprietà elettroniche: in ogni molecola ci sono orbitali di legame contenenti elettroni e orbitali di antilegame vuoti. Certe molecole, se eccitate, promuovono elettroni in orbitali di antilegame con una differenza di energia corrispondente a una lunghezza d'onda del visibile. L'energia emessa è minore dell'energia ricevuta perché una parte viene persa in transizioni non radioattive, quindi l'emissione è a una lunghezza d'onda maggiore. Variando la struttura della molecola si può variare il colore dell'emissione (come si fa con le cianine).

Le molecole fluorescenti possono essere legate al DNA, per esempio con la RT-PCR se si usano primer marcati, che comportano la sintesi di cDNA marcato (**direct labeling**).

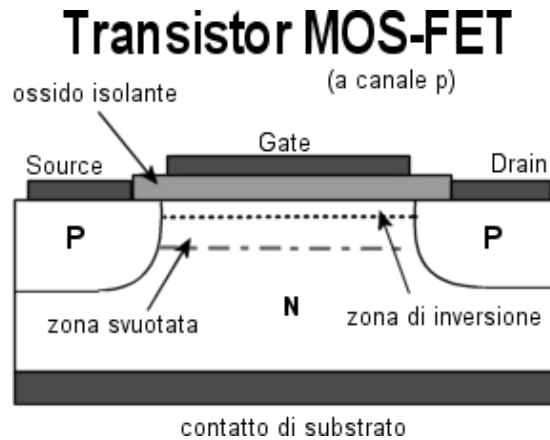
Oppure il DNA può essere marcato dopo la sintesi (**post labeling**), sfruttando gruppi amminici o allilici modificati a cui si possono legare covalentemente i coloranti (in questo caso si deve fare una reazione in più).

Rilevazione elettrica: è spesso usata nei BioMEMS perché consente di usare sensori di piccole dimensioni se confrontati con i componenti a rilevazione ottica. Ve ne sono 3 categorie:

- sensori amperometrici: valutano la corrente elettrica associata agli elettroni coinvolti nei processi redox;

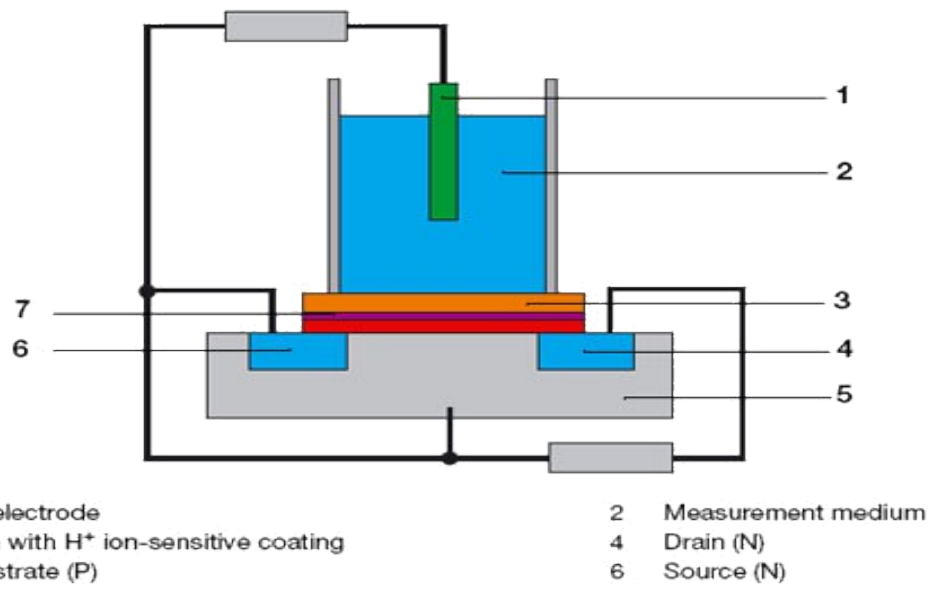
La diversificazione dei metodi e dei materiali usati nella realizzazione del dispositivo ha portato alla distinzione di tre principali famiglie di FET: JFET, MESFET, MOSFET.

Il **MOSFET** (transistor a effetto di campo metallo ossido conduttore) differisce dal FET perché ha uno strato di silice (isolante) tra gate e substrato. Oltre a formarsi la zona svuotata, si forma anche una zona di inversione che mette in collegamento source e drain.



Transistor **JFET**: vedi slides biomems2.

Il transistor **ISFET** (a effetto di campo sensibili agli ioni) è un dispositivo che misura la concentrazione di ioni H^+ in soluzione. La sua struttura è come quella di un MOSFET in cui la metallizzazione del gate è stata eliminata allo scopo di esporre l'isolante alla soluzione elettrolitica da analizzare.

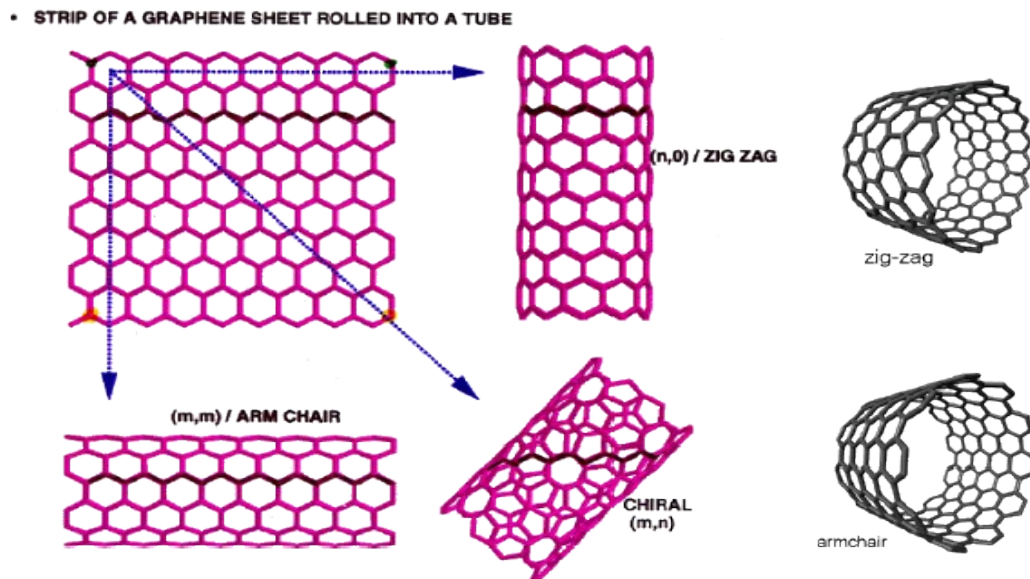


Il transistor **ChemFET** (a effetto di campo chimico) ha un principio di funzionamento che consiste nel depositare sopra l'isolante di gate (ossido o nitrato) una sostanza capace di adsorbire selettivamente e reversibilmente degli ioni: in conseguenza dell'adsorbimento cambia lo stato di carica del gate, quindi la conduttanza del canale tra source e drain. Si ha così la trasduzione elettrica di un fenomeno chimico con elevata sensibilità.

Un SWNT ideale può essere descritto come un tubo in carbonio formato da uno strato di grafite arrotolato su se stesso a formare un cilindro, chiuso alle due estremità da due calotte emisferiche. Il corpo del nanotubo è formato da soli esagoni, mentre le strutture di chiusura (le due semisfere) sono formate da esagoni e pentagoni, come i normali fullereni. Il diametro di un SWNT è compreso tra un minimo di 0.7 nm (corrispondente al doppio della distanza interplanare della grafite) e un massimo di 10 nm, ma nella stragrande maggioranza dei casi il diametro è inferiore ai 2 nm.

Ogni SWNT è caratterizzato da:

- diametro;
- vettore chirale (o elicità), cioè la direzione di arrotolamento della grafite in rapporto all'asse del tubo.



I MWNT sono nanotubi formati da più SWNT concentrici. Possono essere presenti dei legami tra le varie pareti (*lip-lip interactions*), che sembrano stabilizzare la crescita di questi nanotubi. Il diametro dei MWNT è di norma maggiore di quello dei SWNT e cresce con il numero di pareti, potendo arrivare fino a qualche decina di nanometri. I MWNT hanno spesso un grande numero di imperfezioni nella loro struttura, e mostrano un'estrema varietà di forme nella loro zona terminale.

Per portare a rottura un nanotubo privo di difetti occorre spezzare tutti i legami covalenti carbonio-carbonio che lo compongono. Dato che questi legami sono i più forti conosciuti in natura, ne consegue che i nanotubi dovrebbero avere una resistenza meccanica elevatissima. È stato calcolato che il modulo di Young di un nanotubo può raggiungere i 4 TPa e la sua resistenza a trazione (*tensile strength*) è di circa 220 GPa. I nanotubi non sono solo estremamente resistenti alla rottura per trazione, ma anche molto flessibili, e possono essere piegati ripetutamente fino a circa 90°, senza rompersi o danneggiarsi. Se ci sono difetti nel reticolo, però, si possono formare delle cricche. I nanotubi hanno delle sorprendenti proprietà conduttive che cambiano secondo la loro geometria: alcuni hanno conduttività pari a quella del rame. I nanotubi con struttura a zig zag (vettore chirale con $n=m$) hanno proprietà da semiconduttori, mentre quelli armchair (vettore chirale con $n=3m$) hanno proprietà metalliche. È stato anche notato che, in determinate condizioni, gli elettroni possono passare all'interno di un nanotubo senza scaldarlo, fenomeno chiamato "conduzione balistica". Le proprietà di conduzione dei nanotubi possono essere variate "drogandoli", cioè inserendo nella loro struttura degli atomi di azoto e di boro.

favorevoli, la sorgente di C si decompone, rilasciando il C che viene adsorbito dalle particelle di catalizzatore e trasformato in nanotubi. Il catalizzatore può essere preparato prima della reazione e fissato su un supporto inerte oppure essere formato direttamente all'interno del reattore, dalla decomposizione di un precursore organo-metallico.

Vantaggi:

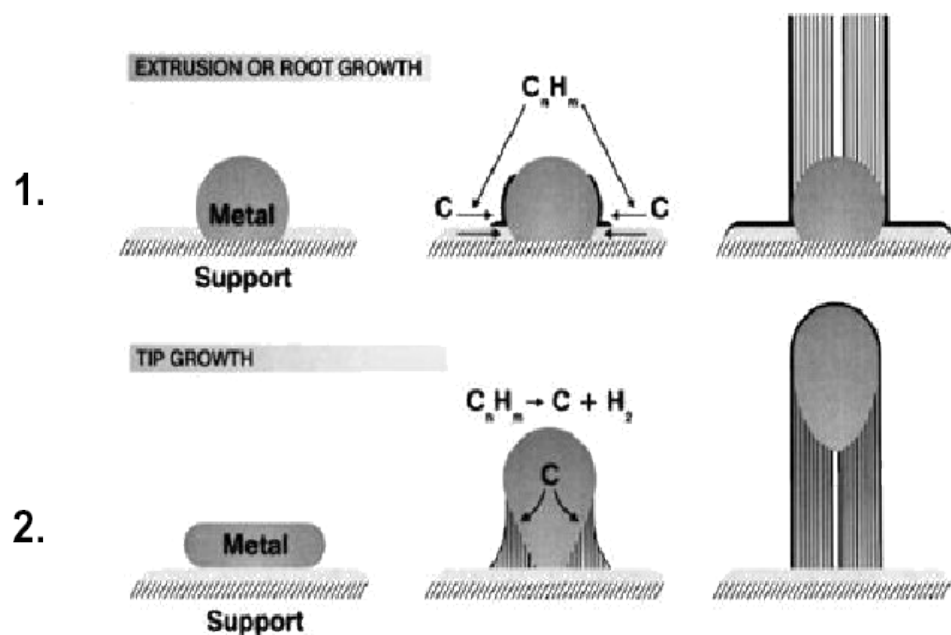
- ottime quantità di nanotubi (resa dal 20 al 100%);
- è possibile ottenere SWNT o MWNT di taglia e morfologia desiderate;
- nanotubi più lunghi;

Svantaggi:

- si ottengono principalmente MWNT;
- alta percentuale di difetti;
- il diametro del tubo è legato a quello della particella metallica di catalizzatore;
- la lunghezza dei tubi è proporzionale al tempo di reazione, ma la velocità di crescita diminuisce col tempo. Se il tempo di reazione è troppo lungo, si forma una quantità consistente di C amorfo e si sporca il catalizzatore.

Il C è adsorbito sulla superficie libera del catalizzatore e diffonde all'interno della particella per alimentare la crescita del tubo:

- *base-growth*: la particella resta al suo posto e fa da base per la crescita del nanotubo, che sarà chiuso da una calotta di C;
- *tip-growth*: la particella si allontana dal supporto, al quale resta collegata mediante il nanotubo. Il tubo è chiuso dalla particella di catalizzatore.



La formazione di SWNT piuttosto che di MWNT dipende da:

- diffusione del C nella particella di catalizzatore → crescita preferenziale di MWNT;
- alimentazione di C alla particella di catalizzatore → crescita preferenziale di SWNT.

I nanotubi prodotti sono sempre contaminati da numerosi elementi indesiderati, tra i quali altre forme di carbonio (filamenti, fullereni, carbonio amorfo), particelle metalliche provenienti dal catalizzatore o, nel caso dei nanotubi prodotti col metodo CVD supportato, granuli di supporto.

I sistemi di purificazione dei nanotubi sono numerosi, ma presentano tutti il problema di non essere in grado di purificare i tubi senza danneggiarli. Purificazioni molto spinte possono portare ad una

streptavidina sul nanotubo; ad essa è possibile legare proteine.

Bisogna caratterizzare la tossicità dei nanotubi: per farlo, si fa una coltura di cellule in loro presenza e se ne valuta la vitalità nel tempo. Se le cellule stanno bene, si riproducono e quindi aumentano nel tempo. Si è visto che i nanotubi possono essere tossici per alcuni tipi di cellule: la tossicità dipende sia dalla dose che dal tempo.

Confrontando i nanotubi con altri tipi di C (nanofibre e carbon black) si vede che sono meno tossici delle altre forme di C.

la funzionalizzazione superficiale dei nanotubi ne aumenta la tossicità.

Nonostante questi risultati, i nanotubi vengono usati in ingegneria tessutale perché non tutti i tipi di cellule sono danneggiati da essi.

Esempi:

- rigenerazione tessuto osseo. L'osso ha capacità autorigenerative, che però possono non essere sufficienti in caso di difetti molto grossi. Si è fatto uno scaffold con MWNT e chitosano (riproduce struttura dell'osso trabecolare) e si è visto che le cellule si attaccano allo scaffold, ma non lo colonizzano. Per renderlo utilizzabile, si arricchisce lo scaffold con proteine BMP (fattori di crescita che stimolano la formazione di osso). Coltivando cellule muscolari (mioblasti) sullo scaffold, si è visto che differenziano in osteoblasti. Il differenziamento viene misurato monitorando la produzione di fosfatasi alcalina (enzima tipico del fenotipo osseo). In questo caso i nanotubi non sono tossici. Il differenziamento dei mioblasti in osteoblasti è stato osservato sia in vitro che in vivo. I nanotubi rilasciati dalla crescita di nuovo tessuto vengono smaltiti per via renale;
- rigenerazione cardiaca. Si fanno patch biodegradabili da mettere su zone infartuate. In questo caso il fatto che i nanotubi siano conduttori ha un effetto benefico sulla rigenerazione cardiaca, anche se la conducibilità è minore di quella del tessuto nativo;
- interazione con cellule neuronali. Si sono coltivate cellule staminali embrionali di topo su una superficie di nanotubi rivestita da film cationici. Si è visto che i neuroni crescono, ma i nanotubi non ne influenzano la direzione. L'aggiunta di 4-HNE (sostanza che riduce la presenza di proteine nell'ambiente) ha un effetto benefico sul metabolismo neuronale e si ottiene una crescita degli assoni più elaborata (4-6 neuriti);
- interazione con cellule renali. La vitalità delle cellule renali diminuisce già a basse dosi di nanotubi. Questo è un problema perché i nanotubi vengono escreti per via renale.

MIOBLASTI C2C12

I nanotubi di carbonio sono biocompatibili sia con test in vivo che in vitro e favoriscono la proliferazione cellulare. L'assorbimento di rhBMP-2 da parte dei MWCNTs promuove la formazione di tessuto osseo ectopico.

CELLULE NEURONALI

I nanotubi non modificati favoriscono la crescita neuronale, ma in quantità minore rispetto a quelli modificati con 4-HNE, la quale ha la capacità di modulare il livello di Ca essenziale per il controllo e lo sviluppo del cono di crescita.

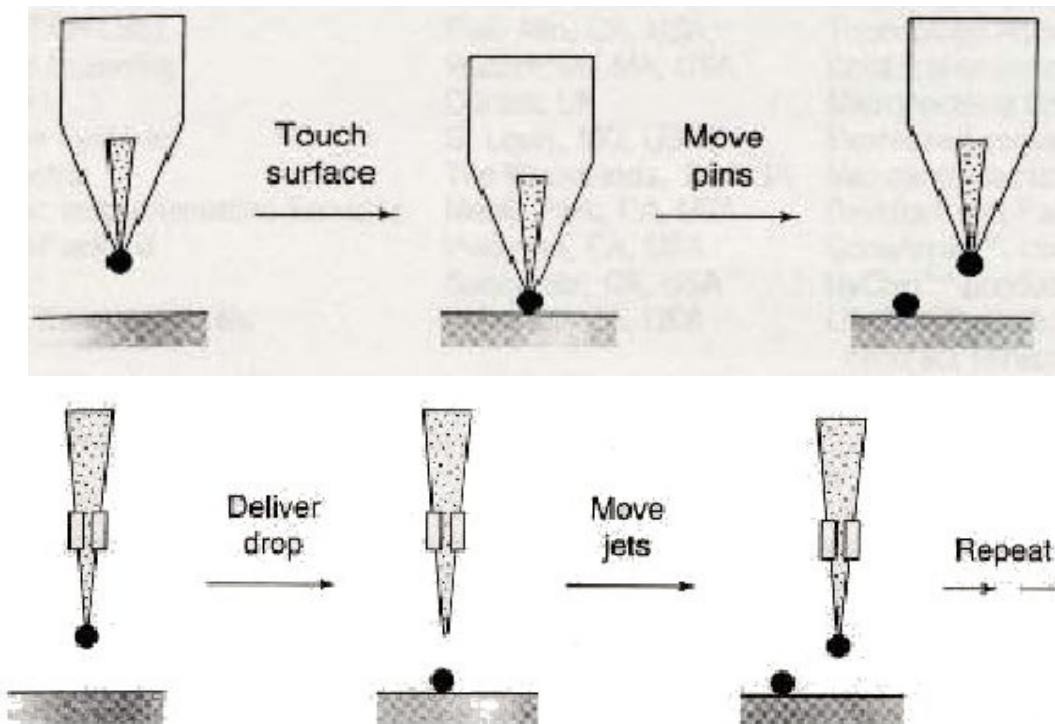
CELLULE RENALI

I nanotubi non mostrano biocompatibilità per le cellule renali, anzi, provocano fenomeni di apoptosi cellulare.

CARDIOMIOCITI e NEURONI

I compositi conduttivi a base di PLGA e nanotubi di carbonio si sono mostrati capaci di promuovere l'adesione e la proliferazione di due tipi cellulari (cardiomiociti e neuroni) fondamentali nelle applicazioni dell'ingegneria del tessuto cardiaco.

elettrostatiche è adatto per legare frammenti di DNA lunghi più di 60-70 nucleotidi. Per legare oligonucleotidi a vetro ammino-modificato, devono essere utilizzati metodi di coupling chimico. Le tecniche descritte in precedenza possono essere effettuate con sistemi automatizzati, ovvero sistemi movimentati con tante pipette, ognuna delle quali contiene DNA da fissare secondo le



Entrambi gli approcci mostrati sono oggi commercializzati per l'individuazione di *single nucleotide polymorphisms (SNPs)*, *short tandem repeats (STRs)*, inserzioni, delezioni ed altri tipi di mutazioni genetiche. In entrambi i casi, la rilevazione dell'ibridazione è tipicamente fatta con mezzi ottici (fluorescenza), ma può essere fatta anche elettricamente.

Il rilevamento elettrico dell'ibridazione del DNA è un argomento molto ricercato, dal momento che l'individuazione *label free* del legame di DNA o di proteine comporterebbe facilità d'uso, riduzione dei reagenti e dei costi di trasformazione, nonché possibilità di portabilità e miniaturizzazione.

Array di proteine e di anticorpi possono svolgere un ruolo chiave nella ricerca di proteine malattia-specifiche aventi un potenziale medico, diagnostico, prognostico e commerciale come marcatori di malattia, come bersagli farmacologici e nella determinazione della predisposizione a malattie specifiche tramite screening genotipici.

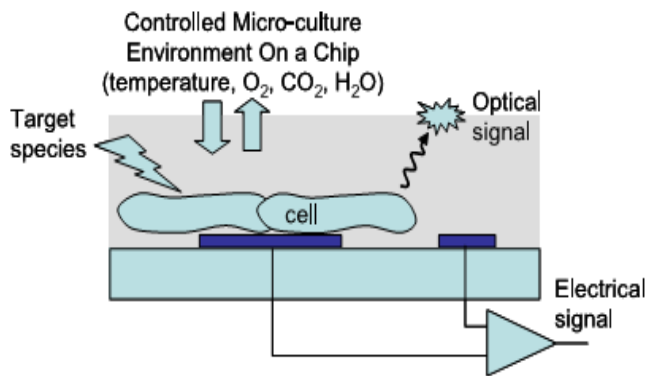
La soft-litografia e la stampa a micro-contatto rappresentano potenzialmente tecniche *high-throughput* ed a basso costo che possono essere utilizzate per la stampa ad alta risoluzione spaziale di questi array, con molta facilità. Il legame, tradizionalmente, viene rilevato con metodi a fluorescenza, ma può anche essere rilevato su superfici di chip per l'analisi *high-throughput* attraverso cambiamenti nell'indice di rifrazione superficiale, risonanza plasmonica superficiale oppure immunologicamente.

Per l'analisi del microarray, la sequenza da riconoscere (**target probe**) viene individuata da **capture probe** fluorescenti. Le mattonelle del microarray vengono caricate positivamente, attirando il DNA. Se si cambia la polarità, le molecole non complementari si staccano, mentre i capture probe restano legati chimicamente.

fluorescenza viene eseguita con fotodiodi on-chip.

Si possono usare le cellule come sensori (**cell on chip**). Il vantaggio principale delle cellule come biosensori è che queste possiedono un'intrinseca selettività naturale verso i prodotti chimici biologicamente attivi e reagiscono agli analiti in modo fisiologicamente rilevante, così da poter prevedere quale sarà la risposta fisiologica ad un dato analita da parte di un organismo.

La trasduzione dei segnali del sensore cell-based si può ottenere mediante la misurazione di potenziali trans membrana o potenziali cellulari, variazioni di impedenza, attività metabolica, ..., oppure con mezzi ottici di fluorescenza o luminescenza.



Le cellule necessitano di essere mantenute in vita sane per lungo tempo, pur operando in condizioni dure e molto variabili, affinché tali biosensori cell-based possano essere utilizzati come dei biosensori portatili affidabili.

La trasduzione del segnale del sensore cellulare può essere ottenuta attraverso la determinazione dei potenziali transmembrana e cellulare, delle variazioni di impedenza, dell'attività metabolica, dell'emissione indotta dagli analiti dei segnali spia ingegnerizzati geneticamente, e otticamente

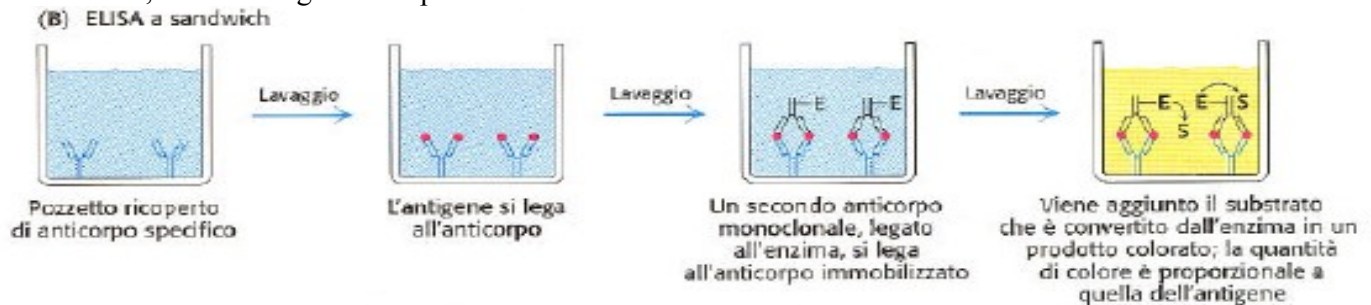
attraverso la fluorescenza o la luminescenza. Esempi:

- Cellule B geneticamente ingegnerizzate sono state utilizzate come sensori, capaci di emettere luce una volta infettati da una tossina o da un virus.
- Epatociti sono stati usati anche come biosensori attraverso la loro coltivazione in un ambiente di cultura 3-D per oltre 14 giorni e la tossicità del composto target è stata determinata otticamente
- Microorganismi sono stati inoltre utilizzati come biosensori per individuare e monitorare gli inquinanti ambientali.

Un **anticorpo** (più propriamente **immunoglobulina**) è una proteina prodotta dai linfociti B (piccole cellule, rotonde, appartenenti alla categoria dei globuli bianchi con il compito di difendere l'organismo da agenti esterni tramite la risposta umorale) con una peculiare struttura quaternaria che le conferisce una forma a "Y". Gli anticorpi hanno la funzione, nell'ambito del sistema immunitario di neutralizzare corpi estranei come virus e batteri, riconoscendo ogni determinante antigenico o epitopo legato al corpo come un bersaglio. In maniera schematica e semplificata si può dire che ciò avviene perché al termine dei bracci della "Y" vi è una struttura in grado di "chiudere" i segmenti del corpo da riconoscere. Ogni chiusura ha una chiave diversa, costituita dal proprio determinante antigenico; quando la "chiave" (l'antigene) è inserita, l'anticorpo si attiva. La produzione di anticorpi è la funzione principale del sistema immunitario umorale. Gli anticorpi hanno una struttura fondamentale composta da quattro catene polipeptidiche: due catene leggere identiche (a basso peso molecolare) e due pesanti ad alto peso molecolare. Agli estremi delle catene c'è un gruppo carbossil-terminale COO⁻ o un gruppo ammino-terminale NH₃⁺ che ha il compito di legarsi all'antigene specifico. Esistono cinque classi di anticorpi.

Gli **anticorpi monoclonali** costituiscono un insieme di anticorpi identici fra loro in quanto sono prodotti da linee cellulari provenienti da un solo tipo di cellula immunitaria (quindi un clone cellulare). Dato un qualsiasi antigene, è possibile creare uno o più anticorpi monoclonali in grado di legare specificamente un suo determinante antigenico; questo implica la possibilità di individuare, neutralizzare o purificare la sostanza in oggetto. Questa importante caratteristica degli anticorpi monoclonali li rende uno strumento estremamente efficace in biochimica, biologia molecolare, diagnostica e medicina.

Il metodo diretto sandwich prevede la copertura del fondo del pozzetto con un anticorpo specifico per l'antigene che vogliamo misurare. Si esegue un lavaggio. In seguito si introduce l'antigene, che si legherà all'anticorpo. Si lava ulteriormente per togliere antigeni in eccesso. Si introduce un anticorpo specifico che legherà il complesso anticorpo + antigene, formando un triplo strato da cui prende il nome il test. All'ultimo anticorpo che abbiamo aggiunto, era legato un enzima specifico, e aggiungendo il suo substrato si formerà un prodotto colorato, che evidenzierà il pozzetto. Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si voleva saggiare e l'intensità della colorazione, misurabile grazie al spettrofotometro.



REAZIONI DI POLIMERIZZAZIONE

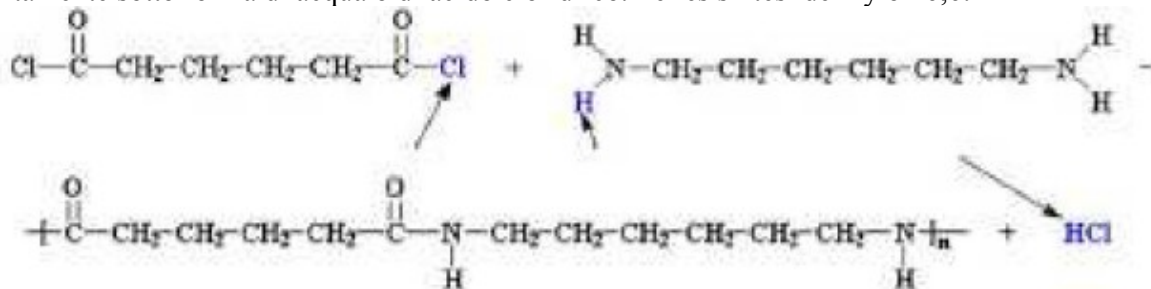
A partire da dei monomeri si ottiene un polimero mediante le reazioni di polimerizzazione. Esistono due diverse classificazioni di tali reazioni:

- in base a stechiometria: poliaddizioni vs policondensazioni;
- in base a meccanismo di reazione: a stadi vs a catena.

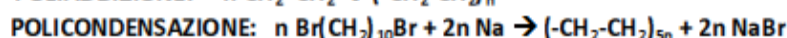
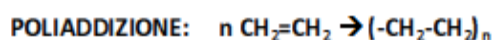
Nella **poliaddizione** il polimero finale è la somma dei monomeri iniziali. Per es sintesi del polietilene.



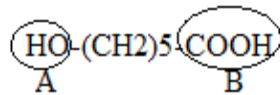
Nella **policondensazione** una parte del monomero viene eliminata durante la polimerizzazione, solitamente sotto forma di acqua o di acido cloridrico. Per es sintesi del nylon 6,6.



Alcuni polimeri, come il polietilene, possono essere ottenuti sia per policondensazione che per poliaddizione, ma i polimeri ottenuti dai due processi non sono identici. Il PM del polimero ottenuto per poliaddizione è molto maggiore del PM di quello ottenuto per policondensazione. Dato che il PM è legato al meccanismo di reazione, prevale la classificazione in base al meccanismo di reazione.



Nella **polimerizzazione a stadi** i monomeri, i dimeri o gli oligomeri reagiscono tra loro con



A e B sono gruppi funzionali complementari in grado di reagire tra loro mediante reazioni di condensazione o reazioni di addizione al doppio legame.

FUNZIONALITA'		POLIMERO	
A	B		
Derivati acidi carbossilici	+	Alcoli	⇒ Poliesteri
		Amine	⇒ Poliammidi
Acido carbonico	+	Fenoli	⇒ Policarbonati
		Alcoli	⇒ Poliacetali
Aldeidi	+	Fenolo	⇒ Resine fenoliche
		Urea	⇒ Resine ureiche
		Melamina	⇒ Resine melaminiche
Epossidi	+	Amine	⇒ Resine epossidiche
		Anidridi	
Isocianati	+	Alcoli	⇒ Poliuretani

Il grado di polimerizzazione (equazione di Carothers) si esprime come il rapporto tra le moli totali iniziali delle specie reattive e le moli totali finali (incluse le rimanenti specie reattive e il prodotto della reazione). Dipende dalla conversione p dei gruppi funzionali e dal rapporto tra i gruppi funzionali A e B.

- caso AA/BB: $\bar{x}_n = \frac{1+r}{1+r-2p}$ dove:

$$r = \frac{[BB]_0}{[AA]_0} \geq 1 \text{ sempre} \rightarrow \text{eccesso di B rispetto ad A;}$$

$$p = \frac{[AA]_0 - [AA]}{[AA]_0} \rightarrow \text{conversione della reazione chimica (frazione di A che ha reagito).}$$

Se p = 1 tutto A ha reagito, se p = 0 A non ha reagito; $0 \leq p \leq 1$

In t = 0 si ha:

$$[AA]_0 = N_0;$$

$$[BB]_0 = r N_0 = N_0 + (r-1)N_0 \text{ (per evidenziare che B è più di A);}$$

$$A]_0 = 2N_0;$$

$$B]_0 = 2rN_0 = 2N_0 + 2(r-1)N_0;$$

In un tempo generico il numero totale di molecole è N.

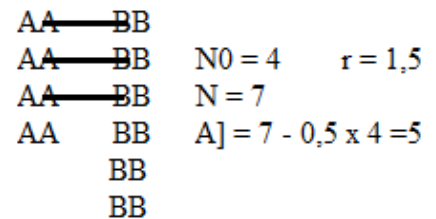
$$A]_t = N - (r-1)N_0$$

dove (r-1)N₀ è l'eccesso di B.

Si ha:

$$p = \frac{\{A\}_0 - \{A\}_t}{\{A\}_0} = \frac{\{2N_0 - N + (r-1)N_0\}}{2N_0} \rightarrow N = N_0(1+r-2p)$$

$$\text{Da cui: } \bar{x}_n = \frac{\text{molecole at } t=0}{\text{molecole at } t} = \frac{N_0 + rN_0}{N} = \frac{N_0(1+r)}{N_0(1+r-2p)} \text{ c.v.d.}$$



- Caso AB: $\bar{x}_n = \frac{r}{r-p}$

In t = 0 si ha:

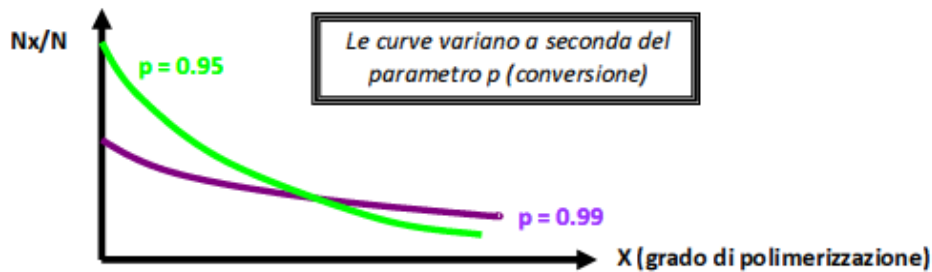
$$[AB]_0 = N_0;$$

- p = frazione dei gruppi funzionali che hanno reagito. p è la probabilità che un gruppo funzionale abbia reagito
- $1-p$ = probabilità che un gruppo funzionale non abbia reagito
- X_{mero} = polimero con X unità ripetitive (possiede $X-1$ gruppi funzionali che hanno reagito ed 1 gruppo funzionale che non ha reagito) (X = grado di polimerizzazione)
- La probabilità di trovare 1 gruppo che ha reagito è: p
- La probabilità di trovare $X-1$ gruppi che hanno reagito è: $p^{(X-1)}$
- La probabilità di trovare 1 gruppo che non ha reagito è: $1-p$
- La probabilità di trovare tutta la molecola di X_{mero} : $p^{(X-1)} \cdot (1-p)$
- N_x = numero di Xmeri
- N_0 = numero iniziale di gruppi funzionali
- N = numero di gruppi funzionali finale = $N_0 \cdot (1-p)$

Funzione di distribuzione numerale:

$$N_x = N \cdot p^{X-1} \cdot (1-p) = N_0 \cdot (1-p)^2 \cdot p^{X-1}$$

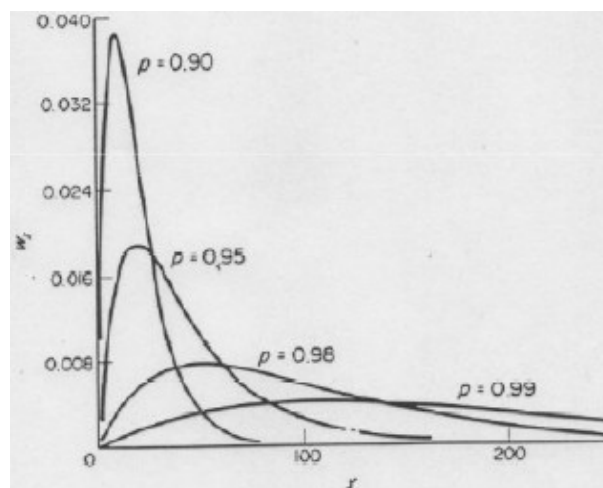
Crescendo p , la curva di distribuzione numerale si allarga.



Per la distribuzione ponderale:

$$W_x = X \cdot \frac{N_x}{N_0} = X \cdot p^{X-1} \cdot (1-p)^2$$

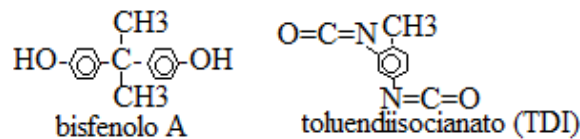
Crescendo p , la curva di distribuzione ponderale si allarga, quindi la distribuzione dei PM diventa più ampia.



Indice di polidispersità se $r=1$: $\alpha = \frac{M_w}{M_n} = \frac{x_w}{x_n} = 1 + p$ aumenta all'aumentare di p ; poiché per avere

$$M_0 = 6C + 10H + 2O$$

- 2) calcolare X_n del polimero risultante dai monomeri in figura, sapendo che $p = 1$ e che c'è un eccesso del 2% di bisfenolo A.



$$\text{bisfenolo} = x + 0,02x = 1,02x$$

$$\text{TDI} = x$$

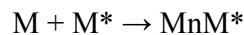
$$r = 1,02 \frac{x}{x} = 1,02$$

$$\bar{x}_n = \frac{1+r}{1+r-2p} = 1,01$$

Nella **polimerizzazione a catena** non ci sono reazioni casuali: un monomero attivato (radicale o ione) lega un altro monomero. In questo modo la specie attivata si allunga. È una reazione molto più veloce: anche in pochi secondi si ottiene un altissimo PM, ma a fine processo molto del monomero non ha reagito.

Meccanismo della polimerizzazione:

1. inizio: generazione del sito attivo sul monomero.
 $M^* \rightarrow \text{monomero attivato};$
2. propagazione: addizione di monomeri sul sito attivo e suo trasferimento al terminale di catena.



3. terminazione: distruzione del sito attivo;
4. (trasferimento: trasferimento del sito attivo ad un'altra molecola.)

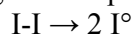
I monomeri tipici di questo meccanismo sono quelli insaturi, specialmente i vinilici: $CH_2=CH-R$. Lo step iniziale può essere uno stimolo di temperatura o un reagente chimico (iniziatore); a seconda della natura di R, bisogna scegliere iniziatori radicalici o ionici.

R può essere un gruppo attrattore di elettroni: in tal caso acquisisce una frazione di carica δ^- e lascia sul C una frazione di carica δ^+ . Si comportano così i gruppi estereo, ammidico o nitrile. La polimerizzazione sarà **anionica**.

R può essere un gruppo elettron donatore, come i gruppi alcossilico (-OR), alchenilico o fenilico. C'è polarizzazione opposta rispetto al caso precedente e la polimerizzazione sarà **cationica**.

Il meccanismo **radicalico** è favorito se R stabilizza un radicale mediante la risonanza.

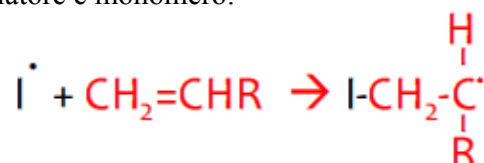
Meccanismo radicalico della polimerizzazione a catena: il primo step consiste nella formazione di radicali tramite un iniziatore che presenti legami che possano rompersi in maniera omolitica.



Deve essere una molecola con legami labili, per esempio i perossidi (-O-O-) o i legami -N=N-; tali legami si rompono se si aumenta la temperatura (decomposizione termica) o se si irradia (fotolisi). Questi radicali devono essere sufficientemente stabili per reagire con il monomero e formare dei centri attivi.

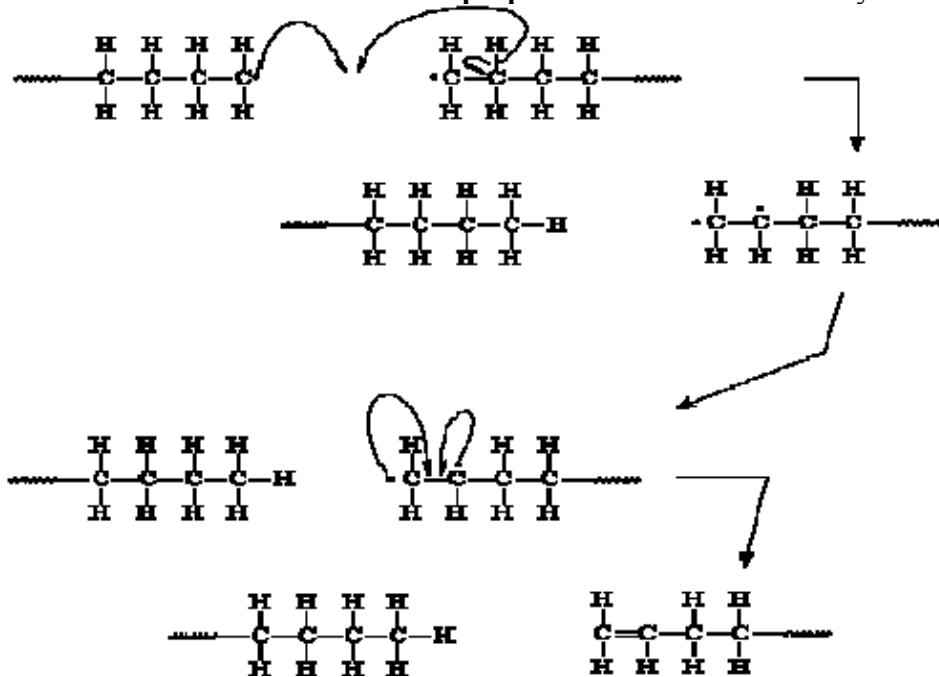
Un radicale libero è una specie atomica o molecolare il cui normale sistema di legame è stato modificato, per cui contiene un elettrone spaiato. Il radicale può reagire con monomeri olefinici per generare un centro attivo radicalico che mantiene la sua attività abbastanza a lungo da propagare la catena macromolecolare sotto appropriate condizioni.

Reazione di associazione tra iniziatore e monomero:



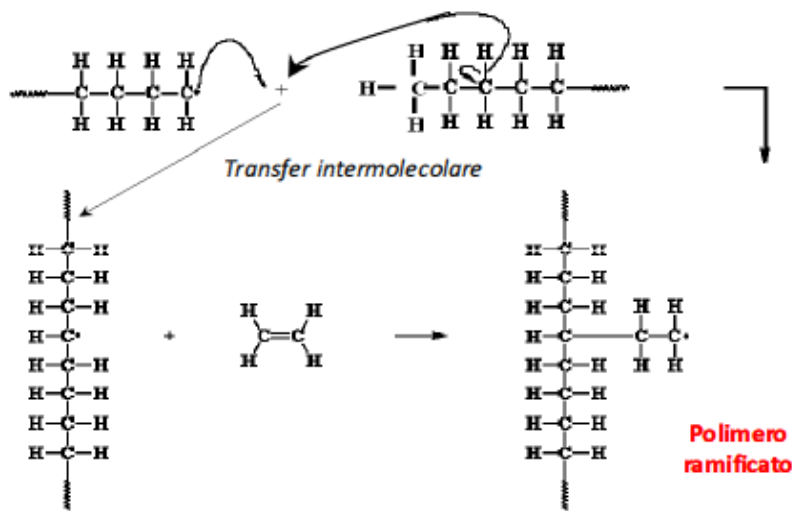
In questo caso $PM = PM_x + PM_y$ e la molecola di I rimane all'interno del polimero come gruppo terminale: I partecipa alla reazione e si consuma, quindi non è un catalizzatore.

- Interazione di due terminali di catena: **disproporzionamento**: $IM_x^\bullet + {}^\bullet MyI \rightarrow IM_x + IM_y=$



Si formano due polimeri. Il PM finale è minore rispetto a quello del caso precedente e I è presente solo da una parte della catena.

- Terminazione mediante **trasferimento** di un centro attivo a solvente, iniziatore, monomero, altra catena (con formazione di ramificazioni): $^{*} + HS \rightarrow ^{*}H + S^\bullet$



Meccanismo con cui si formano le ramificazioni lunghe tipiche del polietilene a bassa densità (LDPE)

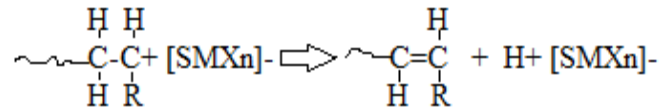
Se S^\bullet forma radicali stabili può iniziare una polimerizzazione, se no la inibisce.

Transfer intermolecolare: $^{*} + ^{*}H \rightarrow ^{*}H + ^{*}$

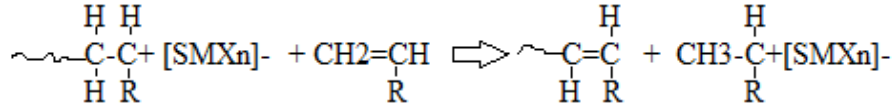
Transfer intramolecolare: $^{*}H \rightarrow ^{*}$

Per ottenere un PM elevato si deve aumentare la velocità dello stadio di propagazione rispetto alla velocità dello stadio di terminazione. $\bar{x}_n = \frac{\text{velocità propagazione}}{\text{velocità terminazione}}$

Generalmente se si aumenta la temperatura, aumenta anche il grado di polimerizzazione, ma non si



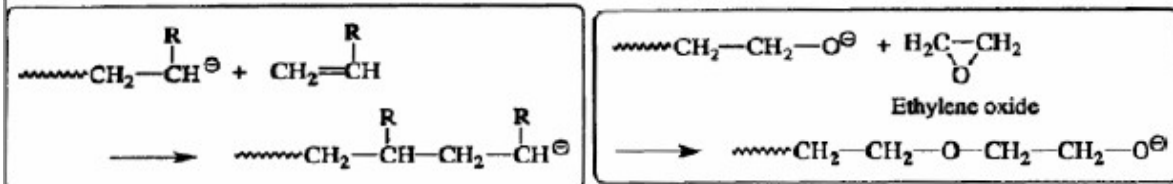
- **trasferimento bimolecolare:** la seconda molecola può iniziare una nuova catena.



Polimerizzazioni cationiche in breve

- Utilizzo di veri e propri catalizzatori (a differenza che per la polimerizzazione radicalica e anionica)
- Il catalizzatore è rigenerato alla fine della polimerizzazione e non rimane incorporato nella catena polimerica (per definizione di catalizzatore)
- Esempio di catalizzatore: qualsiasi acido di Lewis (accettore di elettroni) forte come ad es il BF_3
- E' necessaria la presenza di un cocatalizzatore (come H_2O , HCl , HF , etc) cioè di un fornitore di protoni. Es: $\text{BF}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- A differenza delle reazioni radicaliche, la terminazione per ricombinazione non avviene; ci possono essere polimerizzazioni viventi tuttavia sono più difficili dato che i processi di trasferimento di catena con il monomero, il polimero, il controione, il solvente, etc avvengono molto facilmente
- Temperature tipiche di polimerizzazione (da -80°C fino a -120°C)
- Importante la scelta del solvente che influisce sull'associazione tra ione e controione (tendenza a usare solventi polari che interagiscono con lo ione e allentano il legame ione-controione, aumentando la velocità di propagazione ed il peso molecolare)

Il meccanismo anionico può interessare carboanioni o ossoanioni (derivati da epossido).



I monomeri per la polimerizzazione anionica sono elettron attrattori.

Monomer	Chemical Structure
Butadiene	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$
Styrene	$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$
Acrylonitrile	$\begin{array}{c} \text{CN} \\ \\ \text{CH}_2=\text{CH} \end{array}$
Methyl methacrylate	$\begin{array}{c} \text{COOCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2=\text{C} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

L'iniziatore ha carica negativa.

Confronto tra polimerizzazione a stadi e a catena:

- reazioni a catena più veloci, PM sale rapidamente; nelle reazioni a stadi il PM si mantiene basso fino ad una conversione prossima al 100% e cresce con il tempo di polimerizzazione;
- nelle reazioni a catena si possono avere catene già terminate all'inizio e alla fine può rimanere del monomero che non ha reagito;
- il PM dei polimeri ottenuti con reazione a catena è legato al rapporto tra le varie velocità del processo (inizio, propagazione, termine, trasferimento); nelle reazioni a stadi cresce con il tempo di polimerizzazione;
- nelle reazioni a stadi possono reagire il monomero o gli oligomeri; nelle reazioni a catene c'è una catena polimerica in crescita per attacco di nuova unità monomerica.

ELECTROSPINNING

L'electrospinning (o elettrofilatura) è un processo con il quale nanofibre polimeriche possono essere prodotte usando un sistema di guida elettrostatica che consente una loro deposizione controllata su di un substrato. Le convenzionali tecniche di filatura, invece, consentono di ottenere fibre con diametri dell'ordine dei micrometri.

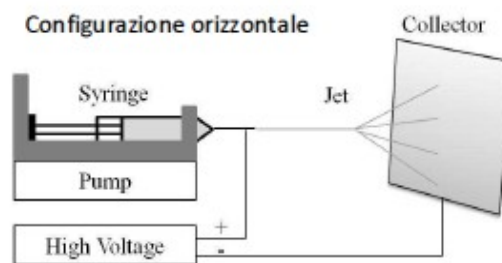
Caratteristiche delle nanofibre ottenute per electrospinning:

- diametri ultrafini (< 100 nm);
- grande area superficiale con valori prossimi a 100 mq/g (importante per rilascio di farmaco o incorporazione biomolecole);
- pori di piccole dimensioni ($1-5$ μ m).

Componenti electrospinning:

- siringa \rightarrow contiene la soluzione polimerica;
- pompa \rightarrow genera il flusso di soluzione polimerica (pompa volumetrica con stantuffo compresso in maniera controllata);
- generatore di tensione \rightarrow genera la ddp tra l'ugello e il collettore (fino a $10\,000$ V);
- collettore metallico \rightarrow raccoglie le fibre.

L'electrospinning si realizza applicando un campo elettrico ad alto voltaggio ad un capillare dotato di un ugello di dimensioni millimetriche, che è riempito con il polimero e un solvente (si possono anche usare polimeri fusi). Le fibre che attraversano il campo elettrico sono poi raccolte su un collettore.



Con la generazione della ddp, l'ago acquista una carica positiva che viene trasmessa alla soluzione. Si genera una forza elettrostatica, contrastata solo dalla tensione superficiale del fluido: se la forza elettrostatica la supera, parte il getto. Durante il percorso dall'ugello al collettore il solvente evapora.

Se non si applicasse una ddp, all'uscita dell'ago il solvente formerebbe una calotta. Con la ddp, invece, si forma il *cono di Taylor*, dovuto alla repulsione tra cariche positive. Se si raggiunge il voltaggio critico, parte un getto che si mantiene unico per un certo tratto; poi si frammenta e si deposita su un'area molto vasta del collettore.

Di solito si usa un ago con sezione circolare, ma se ne può usare uno formato da due semicerchi per ottenere fibre bicomponenti (si devono usare soluzioni con conducibilità elettrica simile) oppure

- *tensione superficiale*: se si riduce la tensione superficiale si riduce la formazione di fibre con beads, mentre se si aumenta il getto è instabile e si possono formare difetti (dipende dal solvente);
- *conduttività*: dipende da polimero, solvente, presenza di sali in soluzione. Se cresce la conduttività, il diametro delle fibre decresce. Se è troppo bassa, si formano fibre con difetti; se è troppo alta, la regione di instabilità è molto marcata portando alla formazione di fibre con diametri disomogenei;
- parametri di processo:
 - *potenziale elettrico*: esiste un voltaggio minimo al di sopra del quale le fibre possono formarsi. Aumentando il voltaggio al di sopra della soglia minima, le fibre mostrano inizialmente diametri progressivamente minori, ma poi aumentano a causa della maggior quantità di getto eiettata;
 - *distanza tra capillare e collettore*: esiste una distanza minima al di sotto della quale le fibre non possono formarsi perché il solvente non ha tempo di evaporare;
 - *flusso della soluzione polimerica*: influenza la velocità del processo. A bassi flussi il processo è più lento e ciò consente l'evaporazione del solvente prima che le fibre raggiungano il collettore. Se il flusso è eccessivo si ottengono fibre con difetti. Il diametro delle fibre cresce al crescere del flusso;
 - *parametri ambientali* (T, umidità, velocità dell'aria nella camera);
 - *la movimentazione dello schermo di raccolta*.

Parameters	Effect on fibre morphology
Applied voltage ↑	Fibre diameter ↓ initially, then ↑ (not monotonic)
Flow rate ↑	Fibre diameter ↑ (beaded morphologies occur if the flow rate is too high)
Distance between capillary and collector ↑	Fibre diameter ↓ (beaded morphologies occur if the distance between the capillary and collector is too short)
Polymer concentration (viscosity) ↑	Fibre diameter ↑ (within optimal range)
Solution conductivity ↑	Fibre diameter ↓ (broad diameter distribution)
Solvent volatility ↑	Fibres exhibit microtexture (pores on their surfaces, which increase surface area)

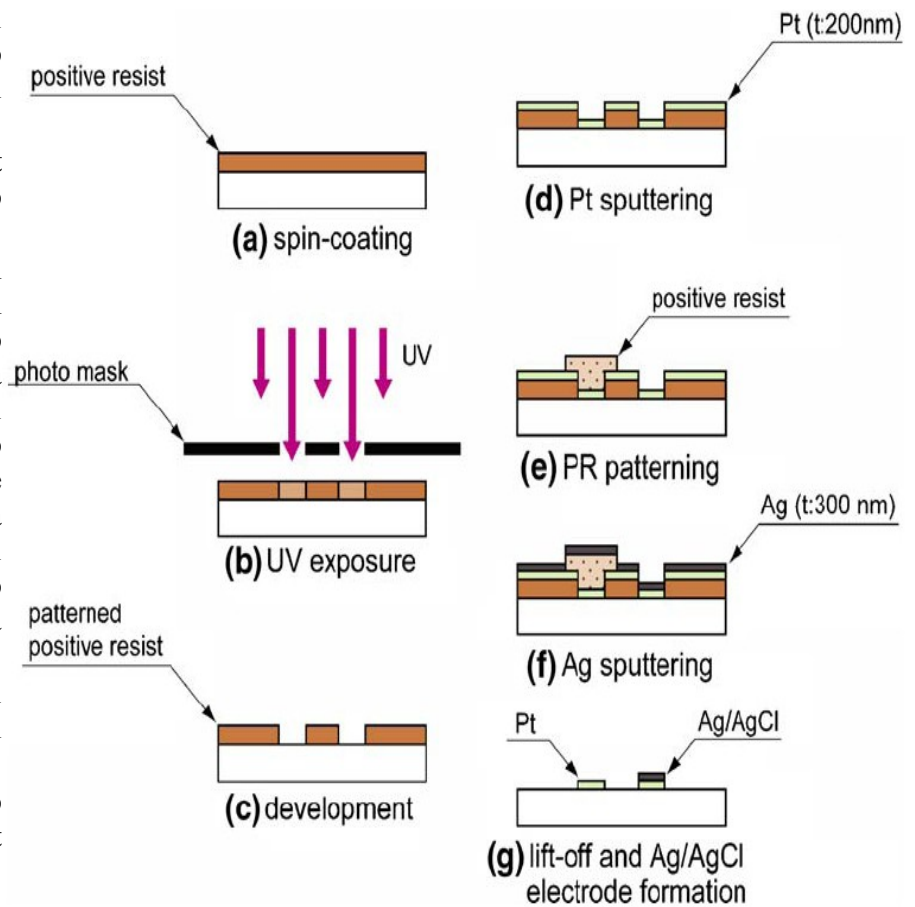
L'electrospinning può essere usato su ogni tipo di polimero. Ha diverse applicazioni: produzione di fibre resistenti come rinforzo di materiali compositi; produzione di membrane per il filtraggio; applicazioni come abbigliamento protettivo; applicazioni ottiche ed elettriche. In campo biomedico l'electrospinning viene usato per produrre scaffold per TE, per il rivestimento di ferite (membrane che impediscono il passaggio ai batteri), rilascio di farmaci, funzionalizzazione con biomolecole, per la produzione di guide per la rigenerazione dei nervi periferici.

Le caratteristiche delle nanofibre degli scaffold possono influenzare il differenziamento delle cellule staminali. Per esempio, si sono poste delle cellule staminali neurali a contatto con con nanofibre di diametro diverso (283 e 749 nm). Le cellule a contatto con fibre di 283 nm hanno iniziato ad esprimere proteine tipiche degli oligodendrociti; quelle a contatto con fibre di 749 nm hanno iniziato a esprimere proteine tipiche dei neuroni. Il differenziamento in neuroni, inoltre, è migliorato

può misurare una corrente proporzionale alla concentrazione di glucosio presente. L'anodo è in platino, mentre il catodo è in Ag/AgCl.

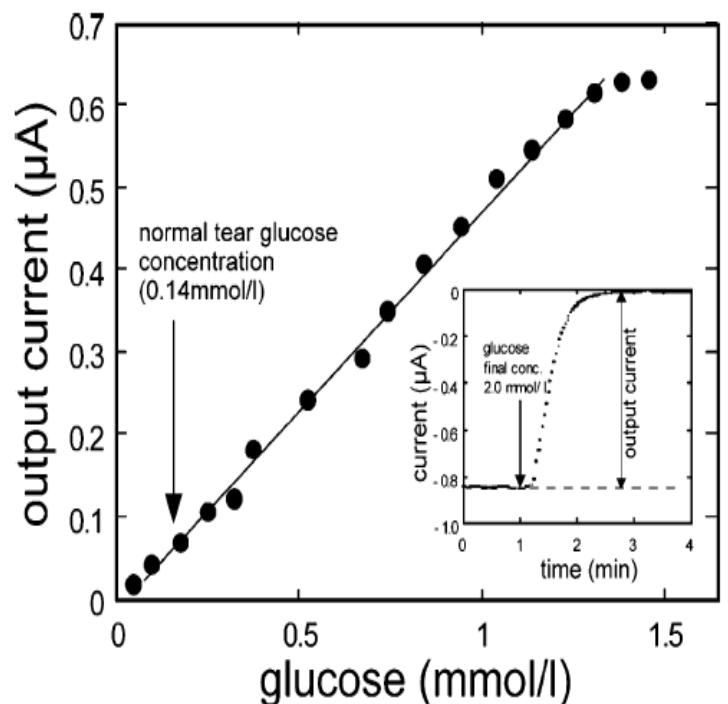
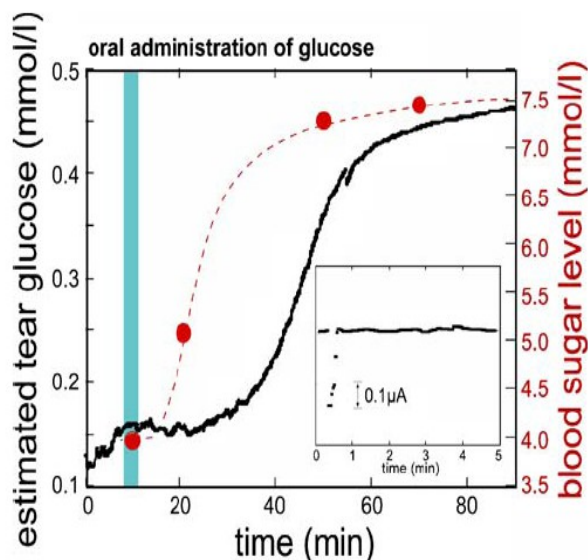
La fabbricazione di questi elettrodi prevede l'uso di tecniche particolari, quali la fotolitografia, lo sputtering per la deposizione del metallo e la lift off. Il processo può essere schematizzato dai seguenti passi:

- deposizione del fotoresist positivo sul substrato attraverso lo spin coating;
- esposizione ai raggi UV (con opportuna maschera) del fotoresist. I raggi UV che lo colpiscono nelle zone senza maschera fanno sì che il resist in quel punto rammollisca e possa essere successivamente portato via durante la fase di sviluppo. Il fotoresist usato è positivo perché ricalca la forma della maschera;
- si deposita il platino sul fotoresist mediante il processo di sputtering;
- le zone di interesse sono ricoperte con altro fotoresist positivo;
- si deposita l'Ag/AgCl sulla struttura attraverso un processo di sputtering;
- attraverso il processo di lift off si eliminano i fotoresist residui e si ottiene la struttura finale dell'elettrodo.



La calibrazione del dispositivo si fa andando a prendere una soluzione contenente glucosio in concentrazione nota e misurando la corrente generata. C'è proporzionalità diretta tra concentrazione di glucosio e corrente.

$$\text{output current } (\mu\text{A}) = -0.016 + 0.491[\text{glucose}(\text{mmol/l})]$$



su di esse non presentavano il recettore per l'anticorpo.

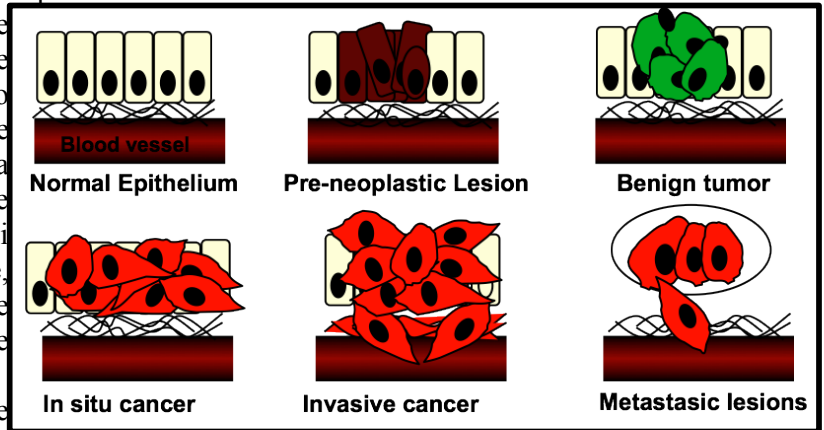
Per il riconoscimento di cellule del carcinoma mammario si è sviluppato un dispositivo con le seguenti caratteristiche:

- device microfluidico, su chip, basato su anticorpi;
- microcanali lunghi 2 cm e larghi e profondi 500 μm ;
- anticorpi: EMA (epithelial membrane antigen) e EGFR (epithelial growth factor receptor);
- velocità cellule di 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

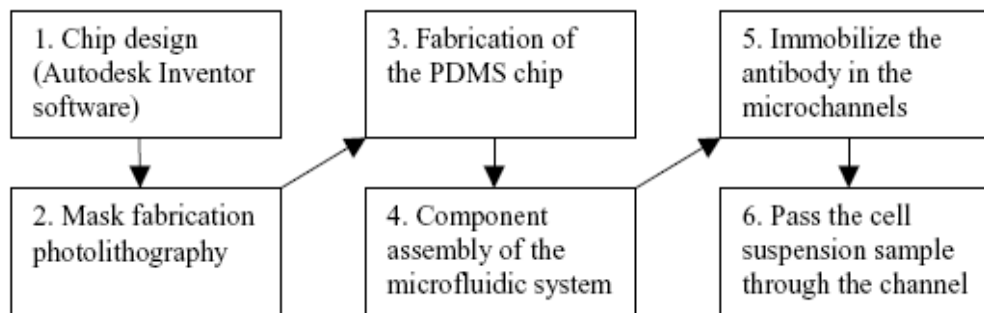
Il cancro è una malattia multifunzionale caratterizzata dall'evoluzione clonale di una singola cellula, seguita dall'accumulo di multiple mutazioni sequenziali.

Le cellule tumorali derivano da cellule normali tramite un processo di mutazione del materiale genetico; sono antigenicamente distinte dalle cellule normali dalle quali derivano. Il sistema immunitario cerca e distrugge le cellule che portano antigeni associati al cancro; se si sviluppano varianti meno immunogeniche, si generano cellule tumorali resistenti che non vengono più riconosciute o controllate dal sistema immunitario.

Il cancro si diffonde mediante angiogenesi e metastasi. L'angiogenesi comincia quando il tumore in crescita inizia a secernere fattori in risposta a ipossia o ad altri stimoli. I fattori di angiogenesi agiscono sulle normali cellule endoteliali vascolari, stimolandone la crescita e la divisione, ottenendo la formazione di un nuovo vaso sanguigno. Questo permette al tumore di allargarsi e di mandare metastasi a siti distali.



I passi per la costruzione di un dispositivo che riconosca le cellule del carcinoma mammario sono i seguenti.



Se si confrontano tra loro il recettore EMA e il recettore EGFR, il primo risulta più specifico in quanto cattura un maggior numero di cellule tumorali. I risultati migliori si ottengono con una velocità di flusso più alta (confronto tra 1-5-10-15 $\mu\text{L}/\text{min}$).

- mescolamento;
- incubazione;
- reazione;
- separazione;
- rilevazione del segnale.

Il chip è formato da microcanali riempiti da un polimero setacciante. Il campione viene direzionato mediante forze elettrocinetiche attraverso i canali. La rilevazione è basata su fluorescenza indotta da laser.

Il chip viene usato per riconoscere mutazioni nel genoma che provocano una specifica malattia tramite il RFLP (restriction fragment length polymorphism). Si provvede all'estrazione e alla purificazione del DNA da un campione individuale. Il DNA viene quindi sezionato in frammenti di restrizione mediante gli enzimi endonucleasi, che attuano il taglio unicamente in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche. I frammenti di restrizione vengono quindi separati per lunghezza mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Successivamente attraverso il southern blot si identificano le bande con sonde di sequenza nota marcate radioattivamente: le differenze tra i genotipi sono determinate dal numero di bande.

OTTIMIZZAZIONE DELLE INTERAZIONI CELLULA – MATRICE

La cellula è la più piccola unità vivente. È separata dall'ambiente esterno da una membrana fosfolipidica (spessore: 5 nm). Nella componente lipidica si vanno a collocare proteine, colesterolo e una piccola percentuale di glucidi in forma di glicoproteine e glicolipidi. Funzioni membrana plasmatica:

- tenere concentrate tutte le sostanze indispensabili alla vita;
- tenere fuori dalla cellula sostanze dannose;
- rendere possibile la comunicazione con l'esterno;
- permettere la comunicazione intracellulare.

L'ECM è una complessa entità strutturale che circonda e supporta le cellule. È composta da:

- proteine strutturali (collagene, elastina);
- proteine specializzate (fibrillina, fibronectina, laminina);
- proteoglicani (GAG + proteine).

La membrana cellulare ha una carica negativa. L'adesione tra cellula e ECM è mediata da recettori della superficie cellulare che si legano a specifiche sequenze peptidiche o molecole; in assenza di ligandi, l'adesione è elettrostatica o regolata dalla bagnabilità.

Fattori per controllare la forza delle interazioni:

- tensione superficiale;
- carica superficiale (aumenta adesione);
- rugosità superficiale (area specifica più alta promuove l'adesione);
- chimica superficiale:
 - ligandi di adesione: fibronectina, collagene, rivestimenti idrofilici;
 - agenti bloccanti: albumina da siero bovino, eparina.

L'adesione, la proliferazione, la migrazione e il differenziamento cellulare su un substrato è influenzata da:

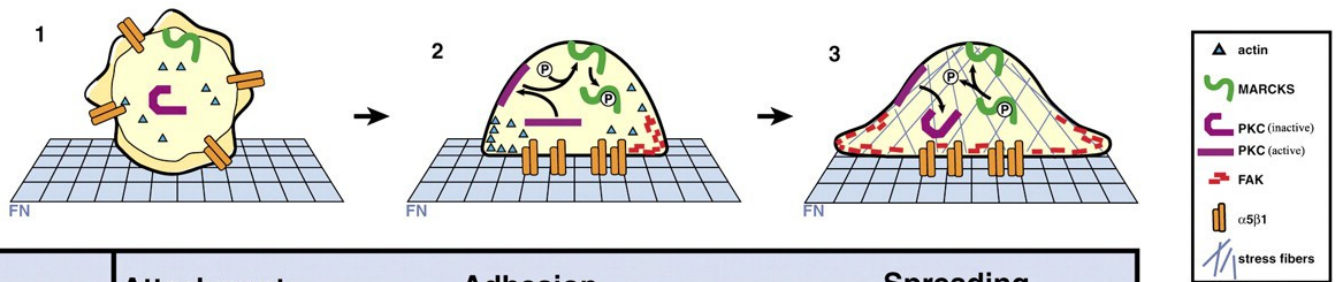
- proprietà di superficie (topografia);
- proprietà meccaniche;
- proprietà morfologiche;
- proprietà elettriche;
- nanoparticelle polimeriche.

- promuove:
 - adesione cellulare;
 - migrazione cellulare;
 - crescita;
 - differenziamento;
 - apoptosi;
- modula:
 - attivazione molecole segnale (citochine);
 - produzione fattori di crescita;
 - produzione segnali intracellulari.

L'ECM fornisce:

- istruzioni per tutti i processi cellulari;
- supporto meccanico alla migrazione cellulare;
- protegge dalla degradazione citochine e fattori di crescita e li presenta più efficacemente ai recettori cellulari.

Lo spreading cellulare è un processo che unisce l'attività adesiva e la rete contrattile intracellulare (citoscheletro). Inizialmente si formano delle protrusioni citoplasmatiche e dei filamenti tra cellula e substrato; all'apice di queste formazioni si formano adesioni focali. Nello stadio finale le protrusioni si appiattiscono e si allargano fino a far assumere alla cellula una forma completamente appiattita. Quando un ancoraggio dipendente incontra la membrana di un'altra cellula, il contatto inibisce il






	Attachment	Adhesion	Spreading
Integrin	binding to FN	→ activation/clustering	→ activation
PKC	inactive/cytosol	→ active/membrane	→ inactive/cytosol
FAK	cytosol	→ leading edge	→ focal adhesion
MARCKS	membrane	→ phosphorylated/cytosol	→ membrane
Actin	cytosol	→ cortical	→ stress fibers

L'adesione cellulare e lo spreading sono influenzati dalle caratteristiche chimiche del sottostante substrato solido. L'energia libera di superficie del substrato è collegata allo spreading cellulare. Substrati idrofobici diminuiscono questo fenomeno che viene invece favorito da superfici idrofiliche in presenza e assenza di proteine adsorbite.

I complessi focali sono piccole strutture che contengono integrine e molecole associate, situate sul bordo di lamellipodi. Possono essere transienti o evolvere in adesioni focali, in seguito a forze di tensione generate all'interno della cellula o applicate dall'esterno (perturbazioni meccaniche).

sua presenza in tutte le adesioni focali ed in forma monomeric: sono inoltre disponibili anticorpi monoclonali.

Cell behavior / Cell spreading	Viability	Migration	Proliferation	Differentiation
SMALL 	↓	↓	↓	↓
MEDIUM 	↑	↑	↑	↓
HIGH 	↑	↓	↓	↑

Generazioni di biomateriali:

1. bioinerti: dovevano sostituire i tessuti e non interagire con l'organismo (per es gomma siliconica);
2. bioattivi e biodegradabili: inducono una risposta da parte dell'organismo (per es rilascio di farmaco) e devono essere biodegradabili perché si è visto che dopo lungo tempo anche i materiali bioinerti danno reazioni negative;
3. stimolo di una specifica risposta cellulare: sono sia bioattivi che biomimetici.

Per stimolare le cellule si usano metodi di funzionalizzazione (soprattutto modifica della superficie, ma anche in bulk). Possibili metodi di funzionalizzazione mediante nanotecnologie:

- impronta molecolare;
- self assembled monolayers (SAM);
- film di Langmuir-Blodgett;
- ECM sintetica;
- tecnica layer-by-layer.

L'interazione tra i tessuti e un materiale inerte passa attraverso diverse fasi. Per prima cosa si ha adsorbimento di proteine sul materiale. Le cellule della risposta immunitaria vedono lo strato proteico e a seconda che i segnali siano positivi o negativi si ha l'integrazione del materiale nel tessuto o la formazione di una capsula fibrotica, rispettivamente.

Le proteine possono aderire quasi a ogni tipo di superficie perché hanno caratteristiche sia idrofiliche che idrofobiche. Non gradiscono proprietà estreme, quindi un materiale molto idrofilico o molto idrofobico è anti-fouling (le proteine non si adsorbono). Una proteina adsorbita può denaturarsi (e in tal caso le cellule recepiscono uno stimolo negativo: la superficie non è biocompatibile). Con l'adsorbimento, la proteina sposta l'acqua e aumenta l'entropia. Un alto adsorbimento può essere legato ad un'alta concentrazione della proteina (effetto cinetico).

riconoscere e specificare quali siano i parametri più importanti per capire, prevenire ed indirizzare la risposta biologica.

Le caratteristiche di superficie determinano il comportamento all'interfaccia. La superficie si trova ad uno stato energetico più alto rispetto alla massa a causa di legami mancanti, legami in tensione o polarizzazione indotta da adsorbati. Tutto questo le conferisce una maggiore reattività. Gli atomi sulla superficie hanno un'aumentata mobilità a causa del minor numero di legami e della maggior possibilità di movimento.

Si può quantificare l'energia di superficie attraverso la tensione superficiale:

$$dG = SdT + VdP + \gamma dA$$

dove γ è il lavoro richiesto per creare un'area di superficie unitaria a temperatura, pressione e numero di molecole costanti.

Le superfici tendono a ridurre la propria energia libera mediante adsorbimenti, segregazione/agggregazione, ricostruzione superficiale, reazioni alla superficie. Materiali con elevata energia di superficie verranno rapidamente rivestiti con strati di molecole a più bassa energia mediante:

- chemisorbimento (legame, forte interconnessione);
- fisorbimento (forza di dispersione, legame più debole).

Le molecole di un liquido hanno un certo grado di attrazione (coesione) le une con le altre, che dipende dalle proprietà della sostanza. L'energia di coesione può essere quantificata anche come una forza/lunghezza \rightarrow tensione superficiale. Per esempio, l'aria è un mezzo idrofobico, mentre l'acqua è idrofilica: la loro interfaccia ha un'alta tensione superficiale.

L'energia superficiale può essere stimata tramite la bagnabilità. Per esaminare gli angoli di contatto di una goccia di acqua su una superficie si usa l'equazione di Young:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL}$$

dove:

$\theta \rightarrow$ angolo di contatto;

$\gamma_{SV} \rightarrow$ tensione interfacciale solido-vapore;

$\gamma_{SL} \rightarrow$ tensione interfacciale solido-liquido;

$\gamma_{LV} \rightarrow$ tensione interfacciale liquido-vapore.

Nell'ipotesi di una superficie ideale (liscia ed omogenea) vale la relazione di Young. L'angolo di contatto è definito come l'angolo compreso tra la

direzione della tensione solido-liquido e la direzione della tensione liquido-vapore, tangente alla superficie esterna della goccia e con il vertice nel punto trifase liquido-vapore-solido.

L'equazione di Cassie vale in assenza di equilibrio chimico dovuto alla presenza di eterogeneità chimiche:

$$\cos \theta = f_A \cos \theta_A + f_R \cos \theta_R$$

dove:

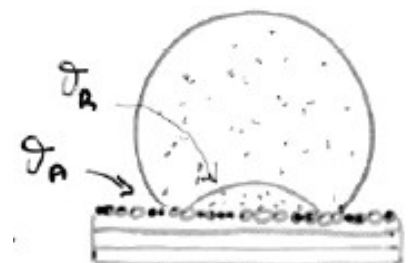
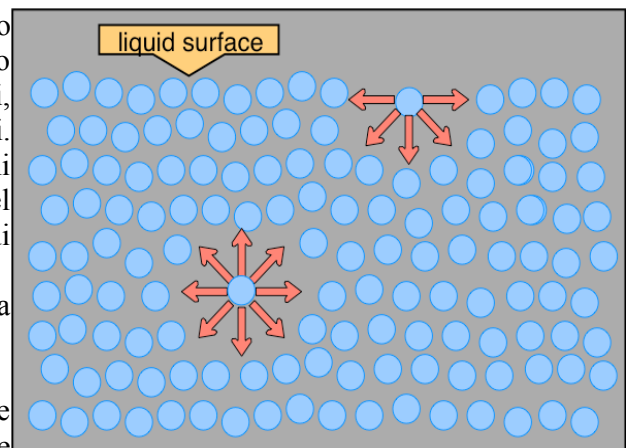
$\theta \rightarrow$ angolo osservato;

$\theta_A, \theta_R \rightarrow$ angolo di contatto sullar regione R, A;

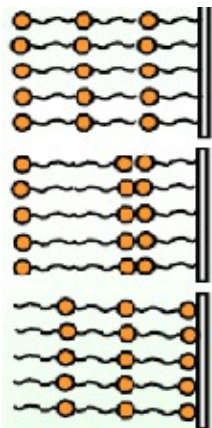
$f_A, f_R \rightarrow$ ricoprimento superficiale frazioni di R, A.

Al crescere dell'energia superficiale, cresce anche la bagnabilità.

La bagnabilità, però, dipende dal liquido: per avere un valore associabile solo al solido si misura l'angolo di contatto di vari liquidi su di esso, poi si estrapola una retta per trovare il valore di γ_{GL} ,



della superficie idrofilica del substrato. Il secondo trasferimento è dovuto a una forte interazione idrofobica tra le catene alchiliche del primo monolayer e quelle che si protendono dalla superficie d'acqua nel monostrato flottante.



Si può eseguire un Langmuir-Blodgett trough per ottenere strati di molecole diverse: si usano due trogoli a singolo compartimento ibridizzati in una unità sola. La stabilità del sistema dipende dalle stabilità energetica e strutturale.

Si possono ottenere multistrati con deposizioni diverse: X, Y e Z.

Per la valutazione della realizzazione di un buon rivestimento si usa il rapporto di trasferimento:

$$\tau = \frac{A_L}{A_S} \cdot 100$$

dove:

Z AL → area del monolayer rimosso dalla superficie del liquido;

AS → area del substrato da rivestire.

Se il rapporto AL/AS = 1 si è ottenuto un ottimo rivestimento.

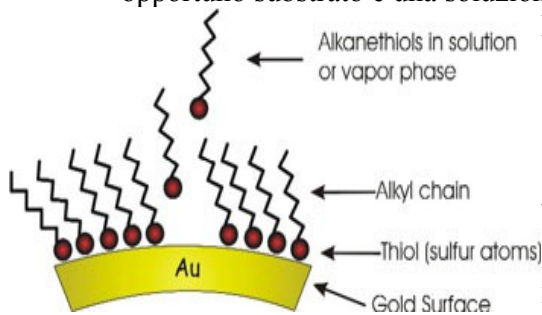
Per valutare l'uniformità del film ottenuto si può usare la spettroscopia UV e visibile. Si osserva un aumento dell'assorbanza in funzione del numero di monolayer trasferiti sul supporto solido.

Tramite microbilancia a cristalli di quarzo si può misurare l'estensione del trasferimento. Un dispositivo al quarzo che oscilla a 10 MHz viene caricato con il monolayer. Si verifica una diminuzione della frequenza di oscillazione: si registra una relazione lineare tra la diminuzione della frequenza e il numero di strati trasferiti.

Altre tecniche permettono di avere un film sottile su un substrato solido:

- evaporazione del solvente;
- sputtering;
- SAM;
- electrodeposition.

Il SAM è un assemblaggio molecolare organizzato, formatosi spontaneamente all'interfaccia tra un opportuno substrato e una soluzione surfattante.



Due processi importanti sono alla base della tecnica:

- un forte assorbimento esotermico di gruppi chimici in superficie;
- interazioni di Van der Waals tra le catene alchiliche.

Si usano molecole anfifiliche con una testa che presenta gruppi tiolo (SH), che si legano bene all'oro.



Il legame che si forma è paragonabile a un legame covalente.

I SAM si autassemblano e non vanno spinti.

La selezione del gruppo di testa dipende dall'applicazione del monostrato autoassemblato; in genere i gruppi di testa sono collegati a una catena alchilica, la cui estremità può essere funzionalizzata per modulare le proprietà interfacciali. Un substrato appropriato viene scelto per interagire con i gruppi di testa: può essere una superficie piana o curva (nanoparticelle). Gli alcantoli sono le molecole più usate; essi sono usati su substrati di metallo nobile a causa della forte affinità dello zolfo per tali metalli.

I SAMs possono essere usati per immobilizzare peptidi, proteine o altre biomolecole sulla superficie. Poiché le molecole proteiche sono significativamente più grandi di quelle di tiolo, le molecole SAM che contengono il gruppo di legame con la proteina sono tipicamente diluite con un

natura multilayer.

In confronto a Langmuir-Blodgett, la layer by layer è più semplice, più veloce e consente di ottenere film più stabili.

È una tecnica flessibile e versatile, applicabile a tutte le specie cariche e su un'ampia varietà di substrati. Coinvolge interazioni elettrostatiche, legami H, trasferimento di carica, legami covalenti, riconoscimento biologico e interazioni idrofobiche.

Ha molte applicazioni biomediche:

- **biosensori** → dispositivi che incorporano biomolecole che sono responsabili delle interazioni con un analita di interesse. Un trasduttore fisico-chimico converte il segnale biochimico in un segnale elettrico quantificabile. Diversi tipi di proteine o colloidali organici o inorganici possono essere incorporati nei film multilayer e usati come sensori:
 - biosensori enzimatici;
 - immunosensori;
 - sensori proteici;
 - sensori con acidi nucleici;
 - biosensori da colloidali inorganici e molecole organiche;

Per esempio si è realizzato un biosensore per rilevare la quantità di paclitaxel (farmaco antitumorale): si è fatto un multistrato con un anticorpo incorporato su un cristallo piezoelettrico. All'aumentare della quantità di paclitaxel aumenta la variazione della frequenza di oscillazione del cristallo piezoelettrico;

- **rilascio di farmaci** → lo scopo di questi sistemi è quello di mantenere la quantità di farmaco nel corpo all'interno della finestra terapeutica, senza sfiorare nelle dosi inefficaci o tossiche come avviene nella somministrazione tradizionale. Per esempio si possono costruire capsule rivestendo una geometria sferica (per es di carbonato) tramite la tecnica layer-by-layer. In seguito si scioglie il core di carbonato (per es in condizioni acide, stando attenti a non danneggiare il multistrato) e si ottiene una sfera cava. Per caricare la nanocapsula, essa viene immersa in una soluzione di etanolo e acqua con rapporto 1:1; il multistrato diventa poroso e si può caricare il farmaco per diffusione. In seguito si rimuove l'etanolo per evaporazione e la capsula si richiude con il farmaco al suo interno.

Per esempio si è incapsulata dell'albumina in una particella di chitosano (polisaccaride cationico: uno dei pochi polimeri naturali con carica positiva a pH fisiologico) e polidestrano (polisaccaride anionico). Il core usato è di silice (carica positiva), sul quale si è adsorbita l'albumina (carica negativa). Si costruisce il multistrato, si distrugge il core e si ottiene la capsula layer-by-layer. Al variare del pH si ha il rilascio del farmaco.

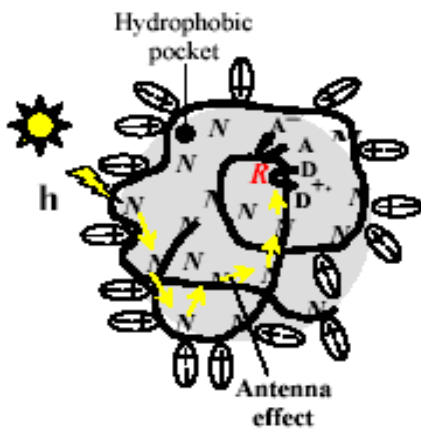
Un altro esempio è quello di cristalli di farmaco rivestiti mediante la tecnica layer-by-layer. Nell'ultimo strato si sostituisce il polimero cationico con gelatina, che sensibile alle variazioni di pH e può rendere la capsula più lasca, favorendo il rilascio del farmaco;

- **mediazione di funzioni cellulari;**
- **adesione di proteine e cellule** → è uno step fondamentale per la preparazione di dispositivi biomedicali. Per esempio si confrontano due superfici di silicone con lo stesso bulk, ma su una si fa un rivestimento layer-by-layer (4 strati di polimeri sintetici, ultimo strato di gelatina) e su una si fa un semplice coating di gelatina. Si vede che la proliferazione cellulare sulla prima superficie è molto maggiore rispetto alla seconda. In generale la gelatina funziona bene per l'adesione cellulare perché è collagene denaturato e presenta le corrette sequenze di adesione;
- **rivestimenti per impianti:** per esempio si applica alla riparazione di vasi sanguigni. I vasi sanguigni sono formati da 3 strati: il più interno (*intima*) è costituito solo dall'endotelio, quello in mezzo (*media*) da cellule muscolari lisce e quello esterno (*avventizia*) da tessuto connettivo lasso. Se l'intima si danneggia, il sangue si coagula. Si è provato a fare mediante

La formazione di fibre è verificabile sperimentalmente.

Si è provato a rivestire un biomateriale (schiuma di titanio e alluminio) con queste molecole anfifiliche, che vanno ad occupare i pori interconnessi della schiuma. In certe condizioni, dalle nanofibre può nucleare del fosfato di calcio con la stessa composizione di quello delle ossa.

Si possono anche usare molecole leggermente diverse. Per esempio, per poter valutare se le molecole anfifiliche vanno a occupare davvero i pori del materiale, le si è legate a una molecola di biotina. Aggiungendo della streptavidina fluorescente, si può vedere dove si depositano. In un altro caso si è usata una miscela di due tipi di molecole anfifiliche: nella testa, una conteneva solo la sequenza RGD e l'altra solo la fosfoserina. Si è fatto anche un modello in vivo.



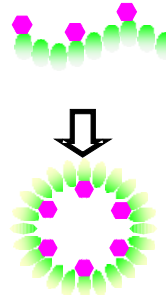
I **fotozimi** sono copolimeri di vinili aromatici con acido metacrilico o acido acrilico. Sono formati da una catena dalla quale pendono dei gruppi idrofobici (cromofori) e dei gruppi idrofilici (zwitterionici). Se posti in acqua, assumono una forma pseudomicellare.

I fotozimi possono trasmettere l'energia luminosa all'interno della micella grazie all'effetto antenna.

Un possibile uso dei fotozimi è quello di detossificare le acque reflue sfruttando l'energia del sole. In ambito biomedico, possono essere usati per stimolare processi di biomineralizzazione.

Si è fatto un film di chitosano e fluoresceina (che funge da cromoforo), che poi è stato immerso in soluzione fisiologica. Si è visto che tale film stimola la formazione di fosfato di calcio se viene illuminato (sia se l'illuminazione è continua durante il processo, sia se si illumina solo all'inizio).

Self-assembling ability



Encapsulation ability

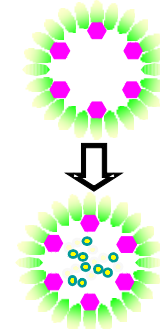
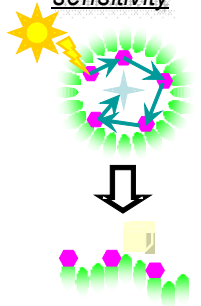


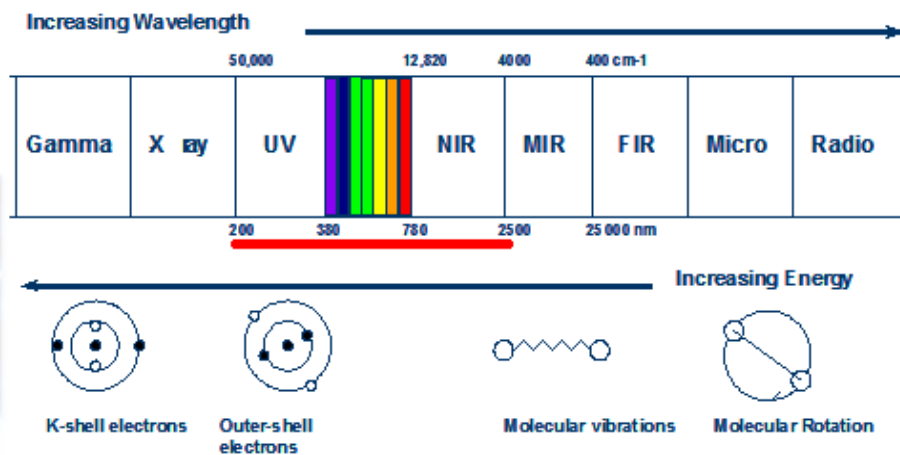
Photo sensitivity



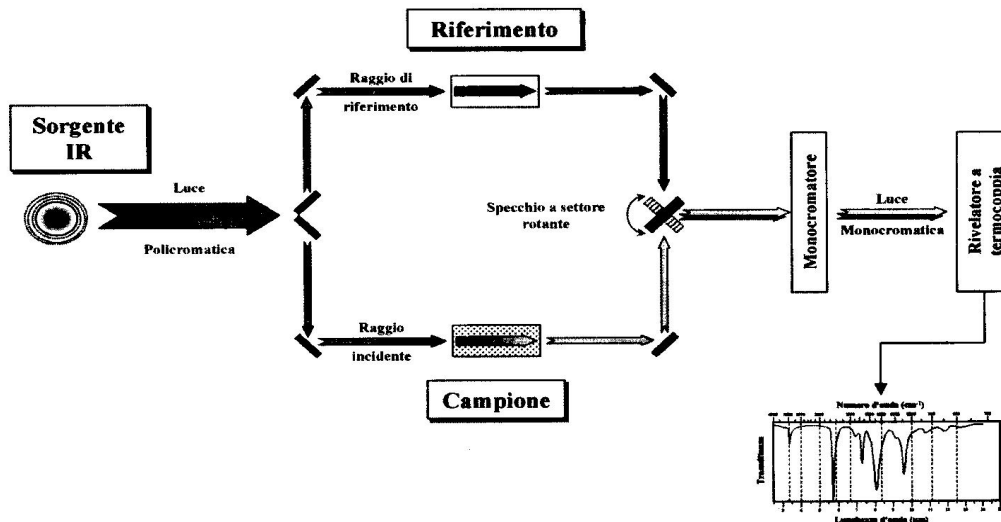
SPETTROSCOPIA

Tramite spettroscopia si può verificare se una tecnica di funzionalizzazione ha avuto successo.

Lo spettro elettromagnetico è definito dalla teoria ondulatoria. Ciascuna energia interagisce in maniera diversa con la materia: i raggi UV promuovono elettroni a orbitali a più alta energia, mentre gli infrarossi fanno vibrare la molecola.



Le spettroscopie con UV e infrarossi vengono dette spettroscopie molecolari. Come unità di misura per l'infrarosso si usa il numero d'onda, che è l'inverso della lunghezza d'onda.



Il problema è che si deve fare un confronto tra il campione e il riferimento, con la possibilità di commettere errori se lo strumento non è ben tarato.

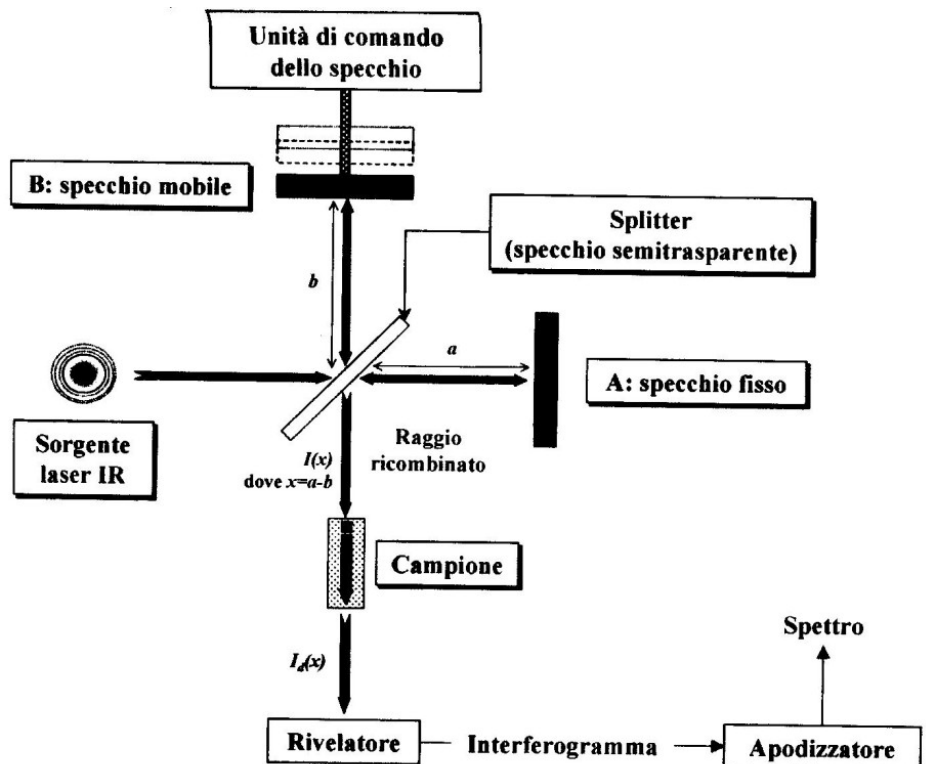
Per migliorare il sistema si usa l'interferometria. In fisica il fenomeno dell'interferenza è un fenomeno dovuto alla sovrapposizione, in un punto dello spazio, di due o più onde. Quello che si osserva è che l'intensità o ampiezza dell'onda risultante in quel punto può essere diversa rispetto alla somma delle intensità associate ad ogni singola onda di partenza; in particolare, essa può variare tra un minimo, in corrispondenza del quale non si osserva alcun fenomeno ondulatorio, ed un massimo coincidente con la somma delle intensità. In generale, si dice che

l'interferenza è *'costruttiva'* quando l'intensità risultante è maggiore rispetto a quella di ogni singola intensità originaria, e *'distruttiva'* in caso contrario.

Una sorgente (anche monocromatica) manda una radiazione verso uno specchio (beamsplitter), che separa il raggio: metà va verso uno specchio mobile, metà verso uno specchio fisso. In seguito i raggi si ricombinano, ma avendo percorso distanze diverse non sono più in fase, quindi c'è interferenza. L'onda risultante dipende dalla differenza di cammino ottico percorso. Tale onda viene fatta passare per il campione, poi arriva a un rivelatore che fornisce l'interferogramma: intensità vs tempo (o differenza di cammino ottico). Per ottenere lo spettro se ne fa la trasformata di Fourier. Il vantaggio di questa tecnica è che non c'è bisogno di una calibrazione esterna (non serve il riferimento).

La trasformata di Fourier della spettroscopia a infrarosso (FT-IR) ha numerosi vantaggi:

- è una tecnica non distruttiva;



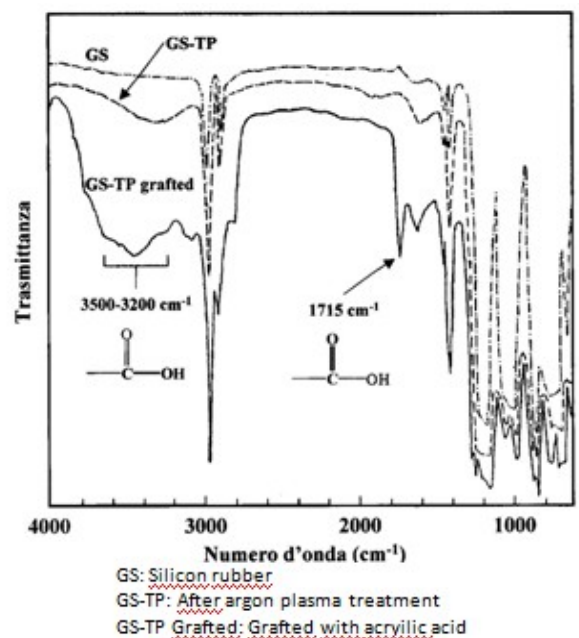
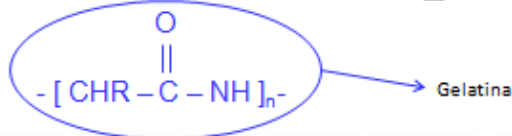
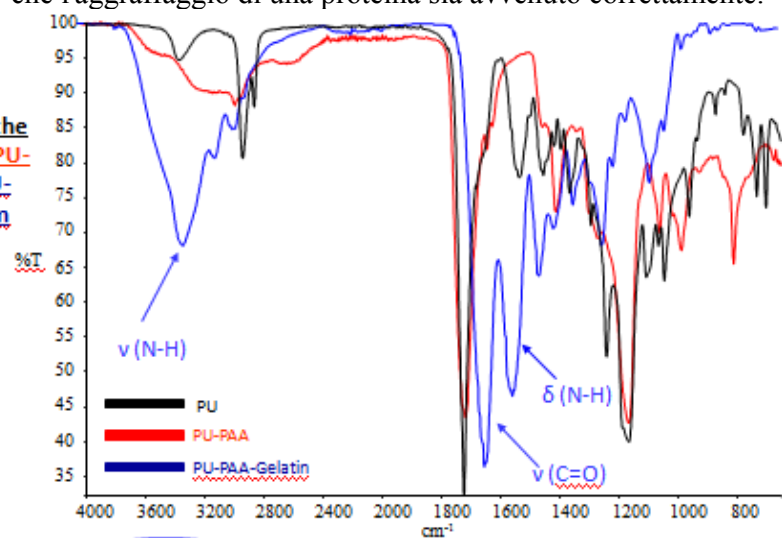
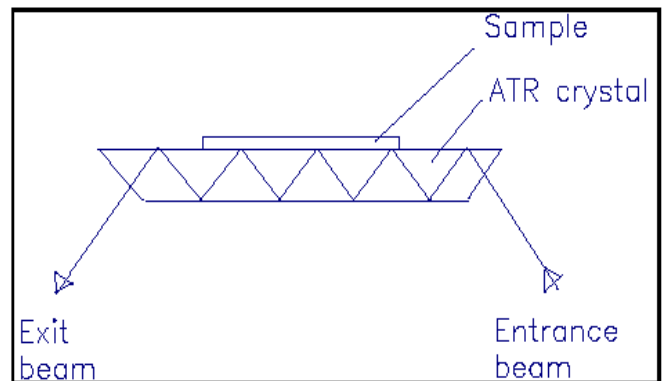
Nella **riflettanza totale attenuata** (ATR), la luce IR attraversa un cristallo ATR (spesso è un campione di diamante) caratterizzato da elevato indice di rifrazione, in cui avviene la riflessione totale. Una parte della radiazione che incide sul cristallo viene assorbita dal campione (onda evanescente).

A seguito dell'assorbimento di radiazione da parte del campione (fenomeno che avviene solo in superficie), il raggio in uscita risulterà attenuato rispetto al raggio incidente. In questo modo è possibile registrare lo spettro ATR.

La penetrazione della radiazione nel campione è circa pari alla lunghezza d'onda del raggio IR (circa 5 μm). Per migliorare la misura si può far aderire bene il campione al cristallo esercitando una pressione. Per la buona riuscita della tecnica si devono soddisfare due necessità:

- il campione deve essere a diretto contatto con il cristallo ATR;
- l'indice di rifrazione del cristallo deve essere significativamente più grande di quello del campione (altrimenti non avviene riflessione interna).

Tramite la spettroscopia a IR si può verificare che una superficie sia stata modificata da un trattamento al plasma e che l'aggraffaggio di una proteina sia avvenuto correttamente.



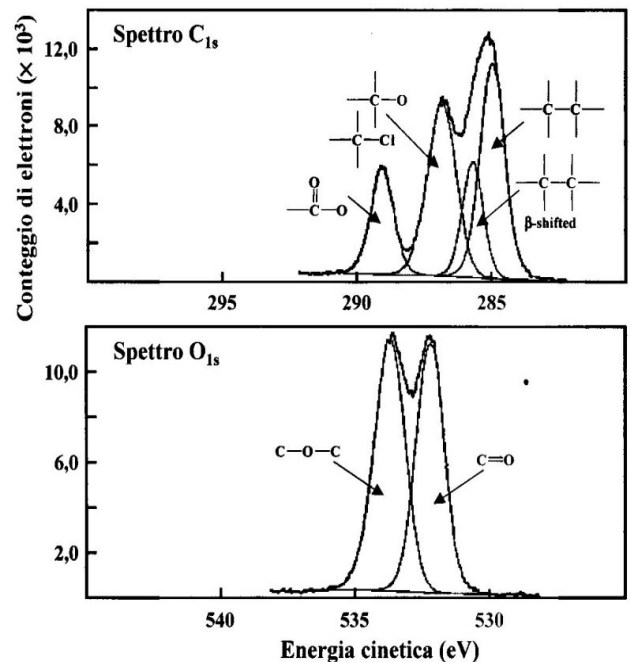
Nel caso del secondo esempio, quando si analizza il campione di PU-PAA a seconda dello spessore del coating si può vedere solo l'acido poliacrilico o anche il poliuretano. Grazie all'IR si possono seguire i passaggi della

funzionalizzazione.

Un'applicazione del FT-IR è il **chemical imaging**. Da un'immagine al microscopio visibile si passa a una immagine con codici colore collegati alla composizione chimica. Una punta IR fa campionamenti della superficie (microscopia IR): questo metodo, però, non è molto funzionale in quanto il campionamento è disomogeneo, si possono perdere punti importanti del campione. Un'altra tecnica è quella di lavorare in trasmissione; la risoluzione è legata alla lunghezza d'onda media della luce IR. Si divide il campione in punti e di ciascuno di essi si ottiene lo spettro IR: se il

livello atomico, se riescono a raggiungere la superficie del campione senza subire urti, escono dal campione con energia cinetica legata all'energia di legame che possedevano all'interno del materiale. Con la tecnica XPS è possibile, misurando l'energia cinetica degli elettroni fotoemessi, risalire alla loro energia di legame, individuando così in modo univoco la specie chimica degli atomi presenti nel campione. Per fare questo, gli elettroni fotoemessi sono raccolti da un analizzatore di elettroni, uno strumento in grado di misurare l'energia e il numero di elettroni che escono dalla superficie del campione. Si ottiene così uno spettro, in cui è riportato il numero di elettroni fotoemessi e raccolti dall'analizzatore in funzione dell'energia di legame che essi avevano all'interno del materiale (riportata in ascissa e ricavata attraverso l'energia cinetica misurata). Lo spettro è costituito da diversi picchi ad energie ben precise: ciascuno di essi corrisponde ad un livello energetico e quindi ad un elemento chimico. I valori delle energie di legame di ciascun orbitale sono tabulati ed è quindi facile individuare a partire da uno spettro XPS gli elementi presenti nel campione. Dall'area di ciascun picco è possibile risalire alla quantità percentuale di quel elemento all'interno del materiale. Questa tecnica è molto sensibile ed è in grado di rilevare elementi presenti con concentrazioni dell'ordine dello 0.1%. Lo spettro XPS è costituito da una serie di picchi, sovrapposti ad un fondo crescente. Questo fondo è costituito da quegli elettroni che, prima di riuscire ad uscire dal campione, hanno subito degli urti anelastici con gli atomi circostanti perdendo così parte della loro energia. A causa degli urti subiti questi elettroni, detti secondari, hanno 'perso memoria' della loro energia iniziale, cioè del livello energetico di provenienza e sono quindi distribuiti in modo quasi uniforme su tutte le energie. Gli urti subiti dagli elettroni fotoemessi determinano un'altra caratteristica molto importante della spettroscopia di fotoemissione, cioè la sua sensibilità alla superficie: a causa degli urti, solo gli elettroni che provengono da atomi abbastanza vicini alla superficie del campione riescono a raggiungerla senza subire urti o comunque con una energia sufficiente per uscire dal campione stesso. Gli elettroni rivelati giungono quindi da uno strato di atomi che distano al più qualche nanometro dalla superficie.

L'analisi della forma dei picchi fotoelettronici viene effettuata mediante una procedura matematica di deconvoluzione (curve-fitting) per separare le diverse componenti relative ai diversi ambienti chimici degli elementi. Ogni banda in un picco corrisponde a uno stesso tipo di atomo in condizioni di legame diverse. In questo modo si ottengono informazioni paragonabili a quelle della spettroscopia IR.



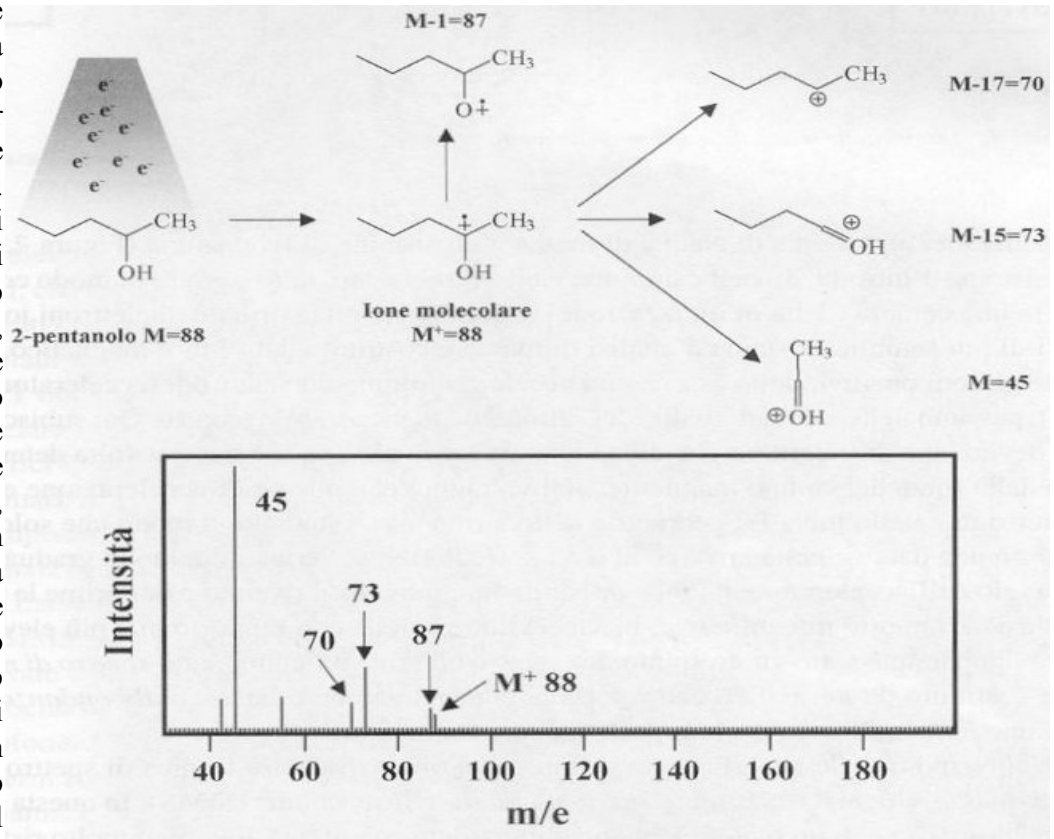
La **microscopia elettronica** dà informazioni morfologiche (come è fatto l'oggetto). Tramite la microscopia elettronica a scansione si ha una risoluzione fino a 5 nm, mentre con quella a trasmissione si arriva a meno di 1 nm.

nel loro stato naturale. Come conduttore si usa l'acqua, quindi non ci sono problemi per campioni umidi.

Il SEM-EDXA combina spettroscopia a microscopia.

La **spettrometria di massa** è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze. Non è una vera e propria spettroscopia perché non

usa una radiazione elettromagnetica, ma applica un'energia molto forte alle molecole per modificarle (frammentarle o trasformarle in ioni). C'è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica, generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. La miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente tramite un fascio di elettroni a energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Il diagramma che riporta



l'abbondanza di ogni ioni in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica e alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto. I segnali forniti sono il risultato diretto di reazioni chimiche (ionizzazione, frammentazione, riarrangiamento) piuttosto che di cambiamenti di stato energetico, caratteristico degli strumenti spettroscopici.

La sorgente è la parte dello spettrometro di massa che ha il compito di trasformare le molecole del campione in ioni (*ionizzazione*). Inoltre gli ioni prodotti non devono trovarsi in uno stato condensato (p.e. in soluzione), ma devono essere liberi di muoversi nel vuoto (*volatilizzazione*) per la misura del rapporto m/z . Esistono molto modi diversi per ionizzare e volatilizzare un campione, ed esistono quindi molti tipi diversi di sorgente.

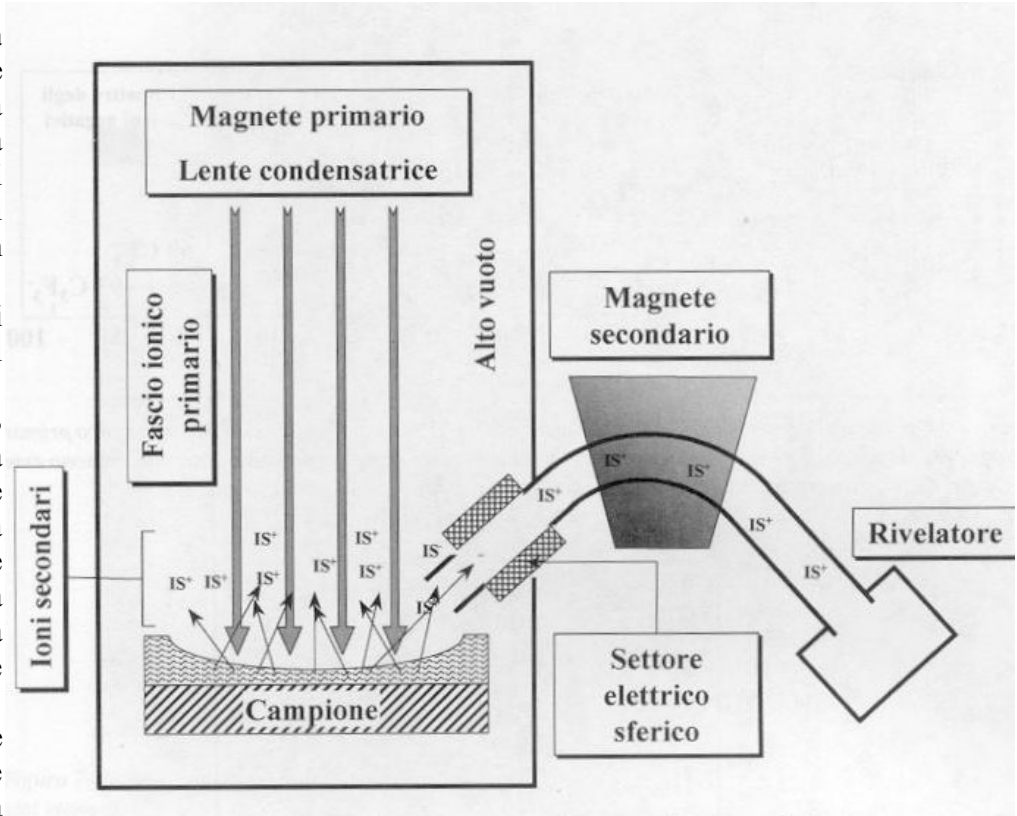
L'analizzatore è la parte dello spettrometro di massa che permette di misurare il rapporto massa/carica (rapporto m/z) degli ioni prodotti dalla sorgente. Anche questa misura può essere fatta in molti modi.



precedente, è considerata una modalità soft di ionizzazione che produce miscele ricche di molecole ionizzate integre.

- *Ionizzazione al plasma.* Gli ioni vengono prodotti introducendo il campione vaporizzato in una torcia di plasma a induzione, generalmente prodotto con argon ad elevata purezza. Questo tipo di ionizzazione, unito ad un analizzatore ad elevata sensibilità, è quello che offre oggi le migliori prestazioni in termini di sensibilità dello strumento; è possibile rintracciare elementi in concentrazioni fino a poche parti per miliardo (ppb).

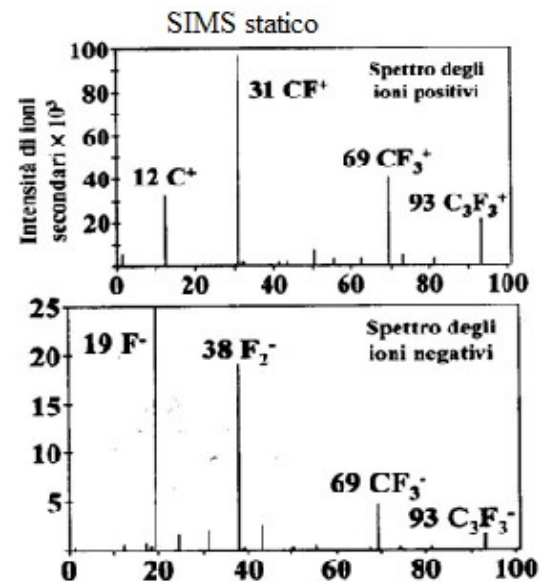
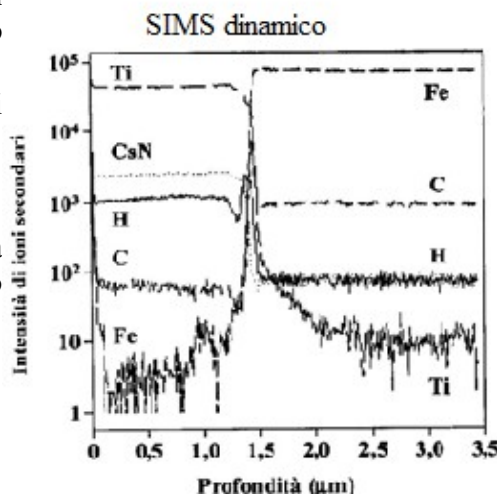
La **spettrometria di massa di ioni secondari (SIMS)** è una tecnica di spettrometria di massa utilizzata per la caratterizzazione di superfici. Consiste nel bombardare il campione con un fascio di ioni (detti *ioni primari*) ed analizzare gli ioni prodotti dal bombardamento (*ioni secondari*). La tecnica SIMS garantisce un'altissima sensibilità nel rilevare sostanze presenti in traccia (ppm-ppb) e un'eccellente risoluzione in profondità (3÷10 nm). La spettrometria di massa di ioni secondari è generalmente una *tecnica distruttiva*, poiché interagisce con il campione alterandolo. A seconda



dell'intensità del processo di erosione si fa però distinzione tra *SIMS dinamico* e *SIMS statico*, nel caso in cui la superficie analizzata non venga modificata durante l'analisi. Il SIMS dinamico, pur essendo una tecnica distruttiva, ha una maggiore sensibilità e permette la *quantificazione* dei risultati. In realtà anche nel SIMS statico si ha alterazione della superficie del campione, sebbene essa sia assai limitata (in particolare utilizzando un fascio primario defocalizzato). Nel SIMS statico sono necessari tempi di analisi (tempi di erosione) di alcune ore per consumare interamente un solo strato molecolare.

Caratteristiche SIMS:

- si bombarda superficie con un fascio ionico ristretto;
- si analizzano ioni secondari prevalentemente monoatomici;
- alta sensibilità (ppb), si studiano superfici tra 1



$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 r^2}{2V}$$

Normalmente H e r dipendono dal tipo e dalle dimensioni del magnete usato e sono quindi mantenuti statici, ciò significa che ad ogni valore del potenziale di accelerazione V solo gli ioni di una data massa m (trascuriamo le ionizzazioni multiple) andranno a collidere col rivelatore. Nella pratica, V viene fatto variare in un intervallo di valori tale da coprire il corrispondente intervallo di m (corrente ionica totale o *total ion current*, *TIC*). Per misure ad alta sensibilità atte a rilevare la presenza di uno ione ben preciso è anche possibile fissare il valore di V sul valore corrispondente alla massa desiderata (monitoraggio del singolo ione o *selected ion monitoring*, *SIM*).

Abbiamo visto come l'energia cinetica degli ioni creati nella camera di ionizzazione dipenda dal potenziale di accelerazione; questo significa che gli ioni, lasciati liberi di muoversi su una traiettoria rettilinea in assenza di altri campi elettrici o magnetici, si muovono con velocità diverse in funzione della loro massa:

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}}$$

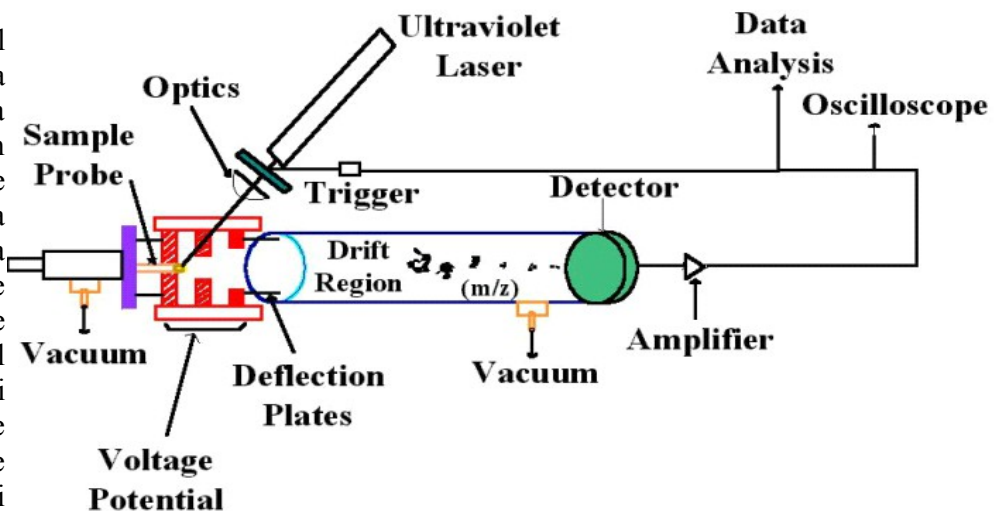
per un analizzatore di data lunghezza si ha quindi che il **tempo di volo**, cioè il tempo impiegato da uno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore e giungere al rivelatore, t è:

$$t = k \sqrt{\frac{m}{e}}$$

dove k è una costante tipica dello strumento.

Il valore di t è generalmente dell'ordine di pochi (5-20) microsecondi. È chiaro che se gli ioni entrano nell'analizzatore a tempo di volo in continuazione, come nel caso degli analizzatori precedenti, è impossibile ottenere una loro separazione. La miscela di ioni deve essere quindi suddivisa in una serie di brevissimi impulsi agendo sul potenziale di accelerazione.

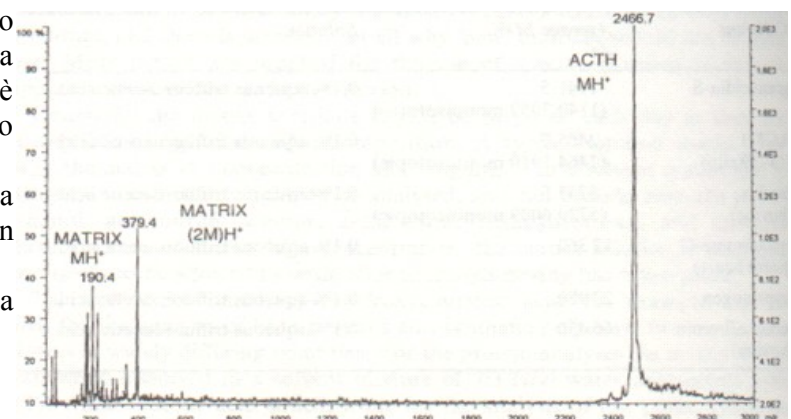
Nel **MALDI-TOF** il campione viene miscelato a una matrice a basso PM. La miscela è posta su un reggicampione, poi viene bombardata con un laser. La matrice assorbe energia e la trasmette al campione, che ionizza (è una ionizzazione soft che non frammenta il campione). In seguito si applica un campo elettrico che accelera gli ioni; l'analisi viene fatta mediante il tempo di volo.



Nei risultati delle analisi può esserci dello "sporco" a basso PM dovuto alla matrice, ma non è un problema perché la matrice è nota ed è sempre la stessa, quindi se ne conosce l'effetto sul grafico.

Un'altra applicazione del MALDI-TOF è quella di determinare la distribuzione del PM di un polimero.

Il metodo classico per determinare la



strettamente legate al pH: a pH basico sono antiossidanti, mentre a pH acido sono proossidanti (danneggiano le cellule). Per questo motivo bisogna stare attenti al pathway di internalizzazione. Possono essere usate per colpire selettivamente le cellule tumorali, che hanno pH acido. In una coltura mista di cellule sane e tumorali, le nanoparticelle hanno un comportamento selettivo senza necessità di funzionalizzazione. Hanno anche un potenziale uso nel trattamento di malattie neurodegenerative in quanto possono fungere da neuroprotettivi e incrementare la produzione di dopamina. Per ora sono stati fatti solo studi in vitro. Le nanoparticelle, inoltre, influenzano il differenziamento delle cellule staminali: anche a basse dosi inibiscono l'adipogenesi, pur non interferendo con la vitalità delle cellule (risultati confermati in vivo).

- *Vettori magnetici*. Si tratta di nanovettori in grado di traghettare un chemioterapico (in particolare serafenib contro il carcinoma al fegato, che ha buoni risultati ma pesanti effetti collaterali). Si usano particelle paramagnetiche, che sono tracciabili tramite RM e possono essere guidate tramite campi magnetici esterni. Inoltre possono essere stimulate inducendo ipertermia per modulare il rilascio di farmaco.

Nano strutturazione di superfici: si sfrutta il *direct laser writing* (litografia 3D a due fotoni). Ha una risoluzione molto buona (meno di 100 nm), ma si può usare solo su superfici di dimensioni limitate (minori di 2-3 mm); inoltre è molto costoso. Il materiale deve essere trasparente alla lunghezza d'onda del laser, ma reticolare alla lunghezza d'onda dei due fotoni: si usa ormocorp, un ibrido di un materiale polimerico e di uno ceramico.

- *Superfici bioispirate*. Si realizzano gratings per colture di cellule neuronali. La spaziatura influenza sia lo sviluppo che la lunghezza del neurite, per i quali la distanza ottimale è di 2,5 μm . Inoltre aumenta il differenziamento. Oppure si è replicata la struttura di osso trabecolare a partire da una μTC : coltivando cellule ossee sulla replica, si vede che aderiscono, differenziano e proliferano anche se la superficie non è stata funzionalizzata.
- *Superfici frattali*. Si tratta di superfici browniane con caoticità crescente. La struttura deve essere costruita strato su strato, se no il materiale collassa. L'effetto sulle cellule è che i clusters di vinculina si disgregano all'aumentare della dimensione frattale; inoltre per le cellule staminali si può promuovere la formazione di uno specifico fenotipo.

FABBRICAZIONE DI MICRO E NANOSTRUTTURE

Possibili approcci:

- top down \rightarrow si scolpisce una struttura più grande:
 - litografia ed etching;
 - litografia soft;
 - ball milling;
- bottom up \rightarrow si assemblano nanoblocchi:
 - compattazione nanopolveri;
 - deposizione chimica o fisica di materiali nanostrutturati su substrati;
 - assemblaggio di elementi nanometrici tramite manipolazione atomica o tramite molecular self assembly.

Tecnologie top down:

- litografia tradizionale;
- LIGA (litografia, elettrodeposizione, stampo);
- litografia soft;
- focused ion beam (FIB);

raggi X. Bisogna anche cambiare il resist, che deve essere reattivo a radiazioni diverse.

La **litografia a fascio di elettroni** è analoga a quella tradizionale: si espone il resist a un fascio di elettroni (dimensioni di circa 50 nm) o ioni. Permette risoluzione di 10 nm o meno. Gli elettroni possono generare radicali, iniziando un processo di polimerizzazione del resist. Di fatto si ha una reticolazione che rende il resist insolubile. Un solvente selettivo rimuove le parti non colpite. (resist negativo). Un'altra possibilità è quella di rompere legami nelle molecole: il PM si riduce e il resist colpito è più solubile (resist positivo).

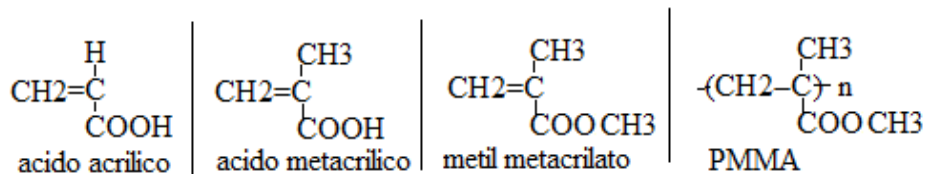
La **LIGA** è una tecnica avanzata schematizzabile in 3 passi: litografia, elettrodeposizione e stampo. La tecnologia LIGA essenzialmente combina resist molto spessi (a volte più di 1 mm) e litografia a raggi X a grande energia (circa 1 GeV). Il resist è realizzato in PMMA perché ha alta sensibilità ai raggi X e permette di ottenere un'elevata risoluzione. La maschera deve avere parti assorbenti, realizzate con particelle ad alto numero atomico, e parti bianche, con alta trasparenza ai raggi X, realizzate con particelle a basso numero atomico.

Svantaggi LIGA:

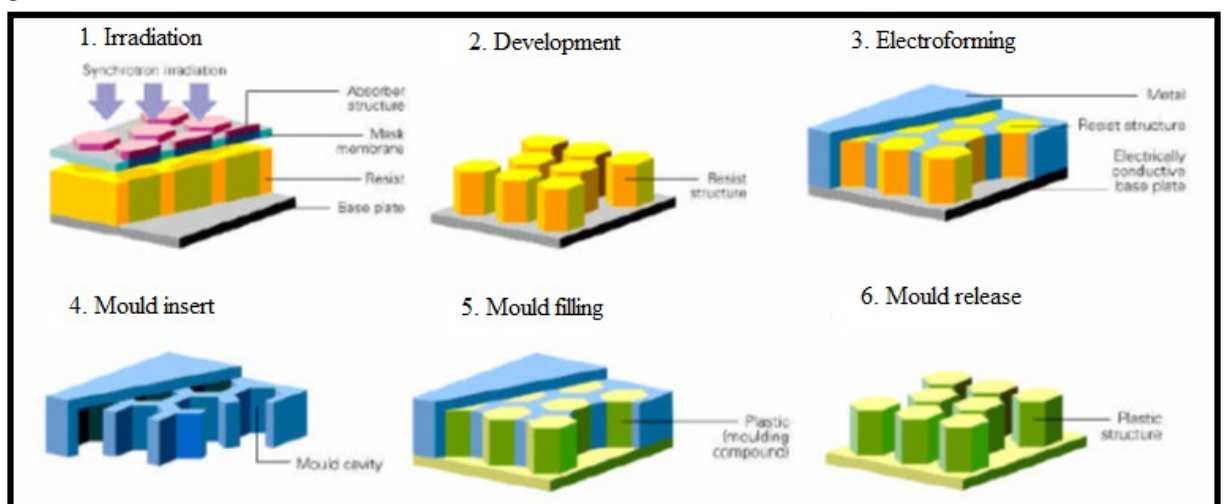
- necessita di un investimento considerevole non essendo un processo standard;
- realizzazione della maschera molto costosa;
- necessità di sorgenti di raggi X ad elevata energia, molto costose e rare;
- tempi di sviluppo lunghi.

Vantaggi LIGA:

- può impressionare resist spessi con elevata fedeltà per realizzare strutture con spessori variabili e buon aspetto di forma;
- i raggi X hanno lunghezza d'onda corta e quindi si ha bassa diffrazione e alta profondità di messa a fuoco, per cui la maschera può essere distanziata dal resist con il vantaggio di aumentarne la vita media.



Si deposita il resist di PMMA su un substrato di silicio, poi si pone un'opportuna maschera e si irradia con raggi X. Si sviluppa. Per elettroformatura (reazione elettrolitica) si versa un metallo che ricopre lo stampo. Si ottiene uno stampo in metallo, che viene riempito con il materiale voluto: si ottiene la geometria della maschera nel materiale desiderato.



Il

focused ion beam (FIB) è una tecnica in cui un fascio di ioni altamente focalizzato è puntato su un'area target di un campione. Può lavorare sia con approccio bottom up che con quello top down.

- casting → la soluzione polimerica è posta sullo stampo e lo permea in seguito all'applicazione di un vuoto spinto. L'eccesso di polimero viene rimosso. Lo stampo viene posto in forno a bassa temperatura per permettere l'evaporazione del solvente in eccesso. Il pattern polimerico viene rimosso dallo stampo;
- tecnica microfluidodinamica → lo stampo di PDMS viene fatto aderire su un substrato (per es vetro) e ad una sua estremità viene posta la soluzione polimerica. Dall'altra parte dello stampo viene applicato un vuoto in modo da riempire i microcanali. Il sistema è posto in forno per favorire l'evaporazione del solvente in eccesso. Il pattern è ricavato asportando semplicemente lo stampo;
- spin coating;

- **micro-replica molding:** si vuol realizzare un prodotto in materiale elastomerico che sia il negativo dello stampo (a sua volta elastomerico) ottenuto in PDMS. Si effettua una deposizione di materiale elastomerico sul master di PDMS. Per consentire una corretta separazione dei due stampo è necessario effettuare un pretrattamento chimico superficiale temporaneo che eviti il processo di reticolazione all'interfaccia;

- **micro contact printing:** utilizza lo stampo ottenuto dal processo di replica molding come timbro per stampaggio su un'apposita superficie. Lo scopo è quello di creare percorsi bidimensionali su cui coltivare cellule. Gli stampi possono essere planari o rotanti.

Una variante del replica molding prevede di versare nello stampo un prepolimero liquido, che poi viene fatto solidificare per post polimerizzazione (*curing*).

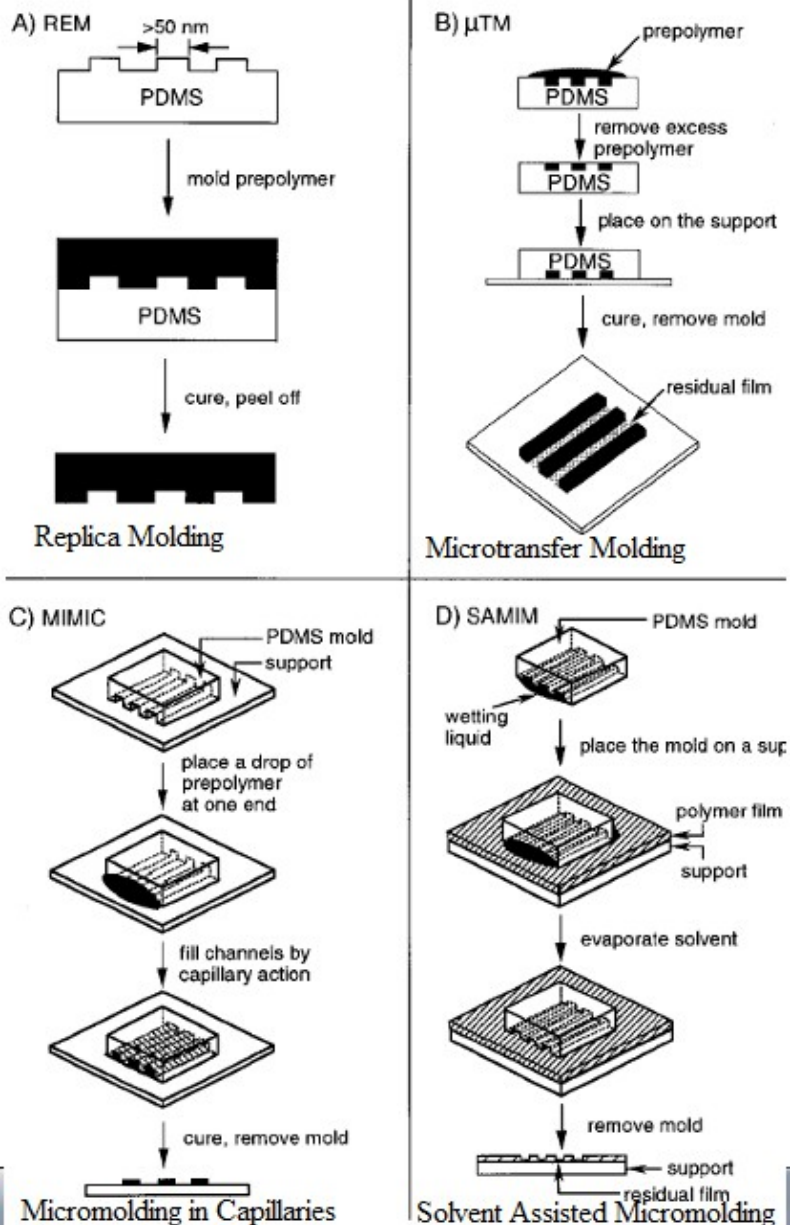
La risoluzione difficilmente è inferiore a 1 μm.

Nel microtransfer molding l'oggetto fabbricato non è self standing, quindi va trasferito su un supporto prima di fare il curing. Consente di ottenere piste polimeriche per fare pattern cellulari.

Si può anche sfruttare la capillarità nel micromolding in capillaries.

Nel solvent assisted micromolding lo stampo è bagnato con un solvente: dove viene appoggiato si rimuove il polimero.

Con il **nanoimprinting** si può ottenere la replica di nanostrutture da matrice per via termomeccanica. Si possono sfruttare due tecniche:

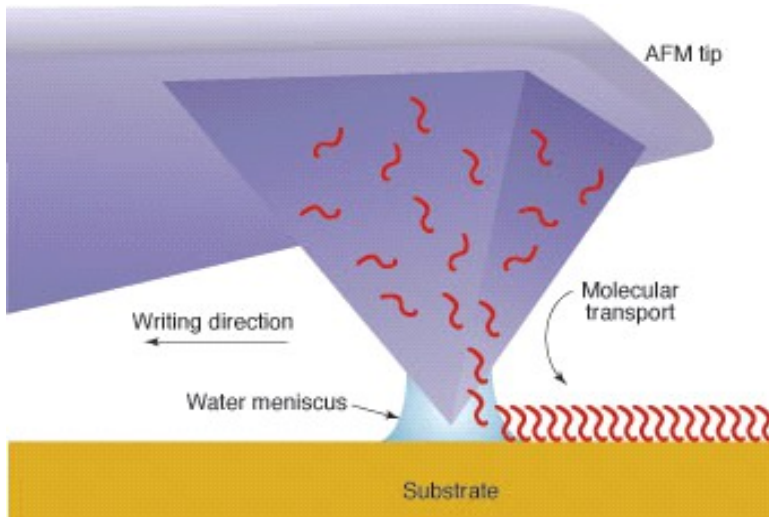
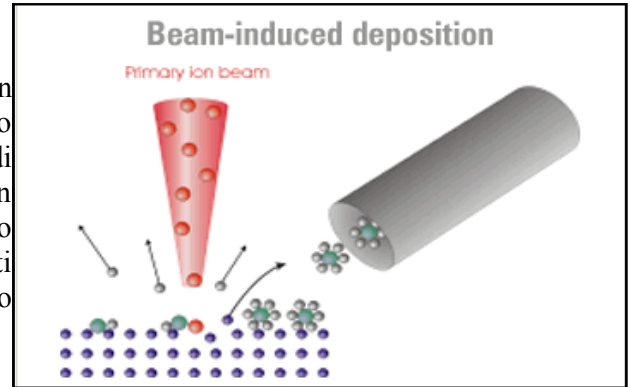


contatto con il substrato.

Tecnologie bottom-up:

- focused ion beam (FIB);
- DIP-PEN nano litografia;
- nanofabbricazione virus-assistita;
- nanofabbricazione proteina-assistita.

Il **FIB** può essere usato con approccio top-down o con approccio bottom-up. Nel secondo caso, il raggio ionico fortemente energetico viene usato per posizionare atomi di metallo, che in questo modo condensano in un punto ben preciso. Per rendere volatili gli atomi metallici si sintetizzano composti metallorganici (ione metallico circondato da leganti organici). Quando il raggio ionico lo colpisce, l'atomo metallico si libera dai leganti e si deposita.



La **DIP-PEN nanolitografia** sfrutta un cantilever come la microscopia a forza atomica (AFM): in questo caso, però, la punta viene usata come strumento di fabbricazione.

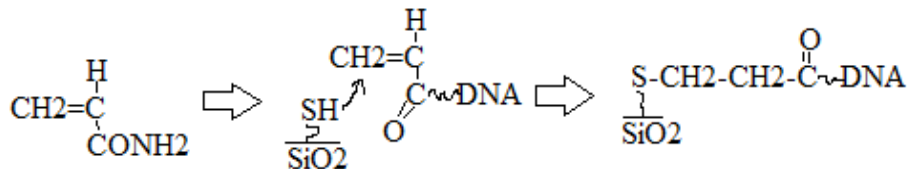
I “mattoni” sono tioli, che hanno la capacità di autoassemblarsi. La punta piramidale (in oro) viene rivestita di tioli, poi viene passata su una superficie d'oro umida. La gocce d'acqua inducono il passaggio dei tioli dalla punta alla superficie.

Si possono anche usare molecole diverse da tioli (ioni metallici, piccole molecole, nanoparticelle, polimeri, oligonucleotidi, peptidi, proteine, alcanetioli) e substrati diversi dall'oro (vetro,

quarzo, silicio, germanio, gallio, arsenide). La tecnica può anche essere usata per funzionalizzare superfici nanostrutturate (per esempio si è fatta una “foresta” di nanotubi di C).

Al crescere dell'umidità della superficie, crescono anche le dimensioni dello spot depositato, che dipendono anche dal tempo di contatto.

Spesso si usa DNA come inchiostro, che viene depositato su una superficie di silice. Si usa DNA funzionalizzato con acrilammide, che si lega ai gruppi SH.

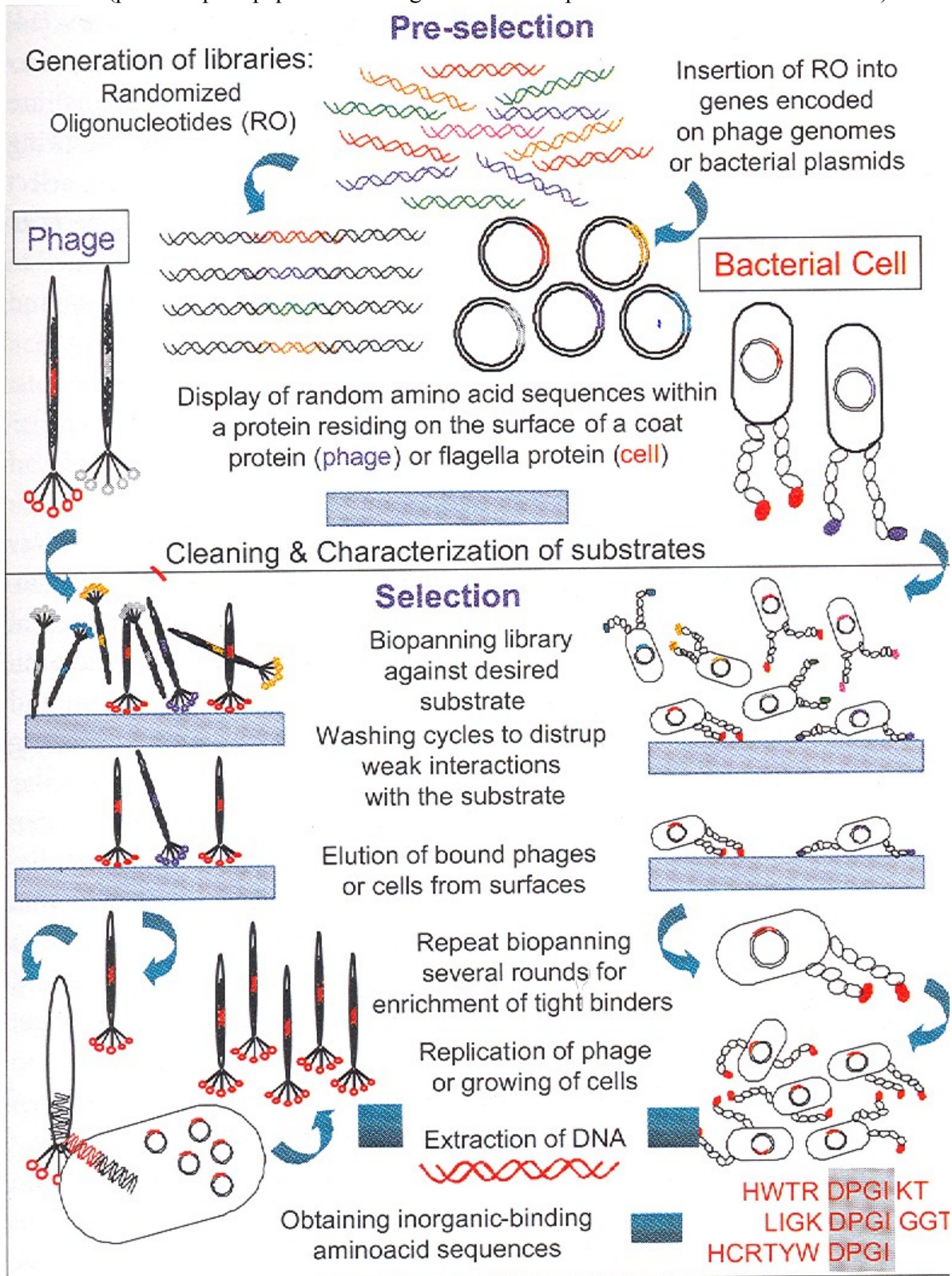


Si possono anche usare array di punte. Ne esistono di due tipi:

- array passivi → ogni punta è uno strumento di duplicazione. Sono adatti alla replicazione di nanostrutture e hanno la risoluzione dell'AFM;
- array attivi → ogni punta è attivata indipendentemente e costruisce diverse nanostrutture.

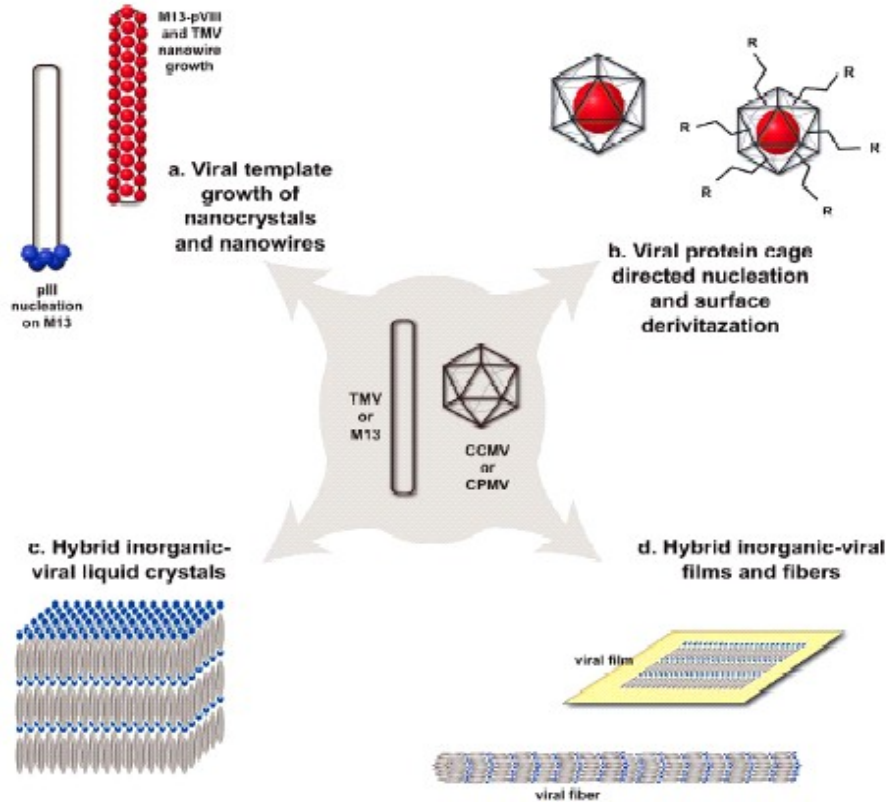
Si possono fare array per individuare marker tumorali: serve un sistema di detezione. Si possono usare sistemi sensibili a una variazione di massa, sfruttando il fatto che la variazione di massa comporti una variazione di una proprietà fisica (misura indiretta): per esempio microbilancia al

DNA viene messo nel plasmide (DNA circolare). Poi si vede quali “piedini” interagiscono meglio col cristallo (per esempio i peptidi del collagene e l'idrossiapatite hanno un'interazione forte).



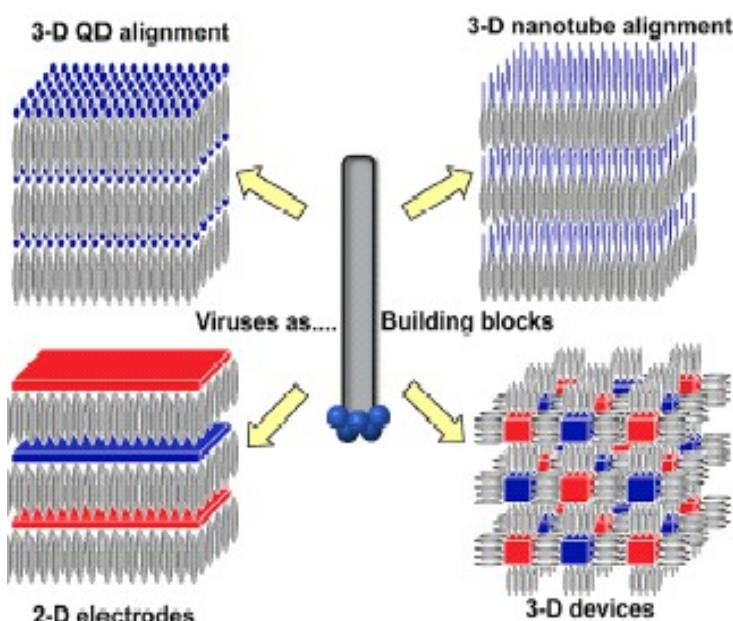
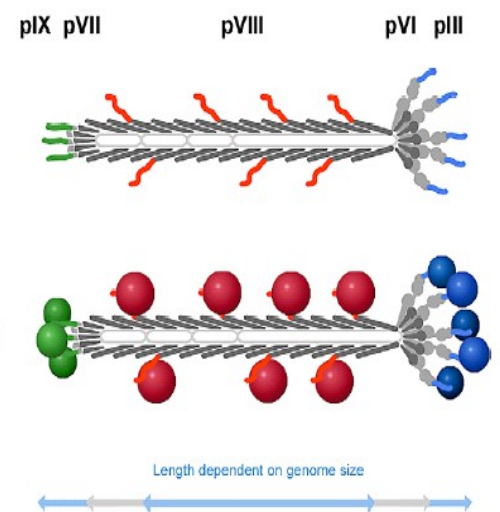
Invece che con i peptidi, si può studiare l'interazione del materiale inorganico con altre molecole, per esempio acidi nucleici con strutture diverse da quella a doppia elica. Si può selezionare la

liquidi oppure come films virali sottili auto-supportanti e fibre virali.



Uno stesso virus può esprimere diversi segmenti peptidici che interagiscono con cristalli diversi. Questo concetto è stato sfruttato sperimentalmente solo per il solfuro di zinco.

I virus a forma di bastoncino possono assemblarsi in fasi di cristalli liquidi, che sono controllabili tramite fattori quali la concentrazione della sospensione del virus, la forza ionica della soluzione e campi esterni. Se accoppiati con nanoparticelle, questi virus sono mattoncini versatili in grado di assemblarsi in varie forme di nanomateriali.



I cristalli possono avere proprietà di fluorescenza (punti quantici).

(imaging + terapia).

Nonostante vengano sintetizzate molte molecole nuove, solo poche di esse possono essere usate come farmaci a causa delle loro caratteristiche idrofobiche (molti sono composti aromatici), che le rendono poco adatte a lavorare in ambiente acquoso (quale è il corpo umano).

Una regola empirica per valutare la probabilità che una molecola si trasformi in un farmaco è la *regola del 5 di Lipinski*:

- non più di 5 donatori di legami H (atomi di N o O protonati);
- non più di 10 accettori di legami H (atomi di N o O);
- PM < 500 daltons;
- coefficiente di partizione < 5 in una miscela di octanolo e acqua.

In pratica la molecola non deve essere né troppo idrofobica né troppo idrofila.

Le nanotecnologie possono bypassare questi problemi e aprire l'applicabilità di molecole farmacologicamente attive, ma difficilmente formulabili.

Possibili sistemi a rilascio di farmaco:

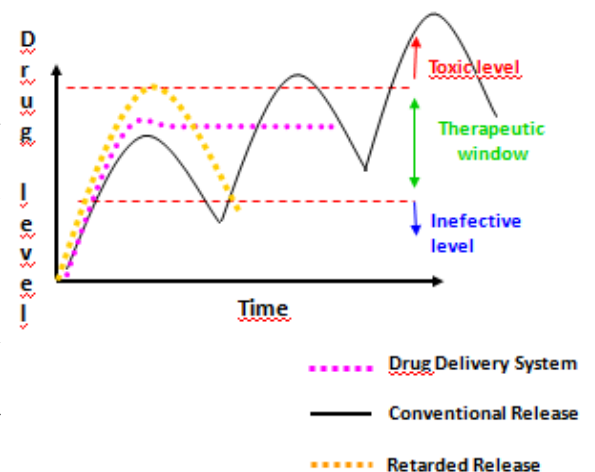
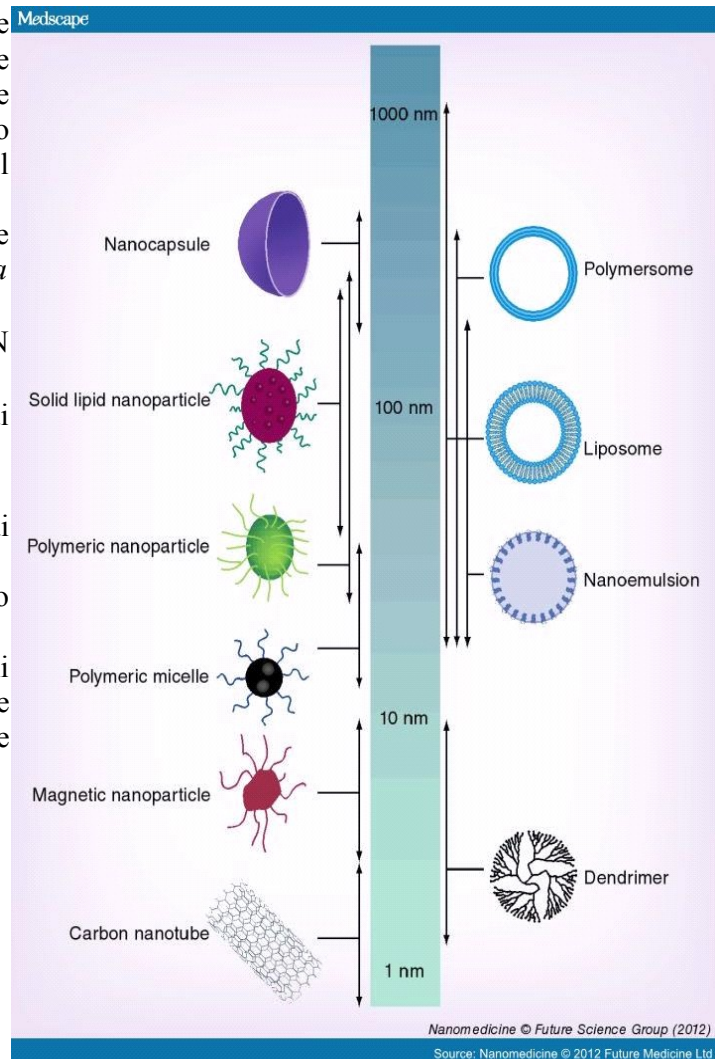
- sistemi liquidi:
 - emulsioni;
 - microemulsioni;
 - liposomi;
- cristalli liquidi:
 - surfattanti;
 - polimeri idrosolubili;
- micro e nanoparticelle:
 - lipidi;
 - polimeri.

Le nanoparticelle sono particelle con diametro di qualche nm (circa 100 nm). Le loro principali caratteristiche sono:

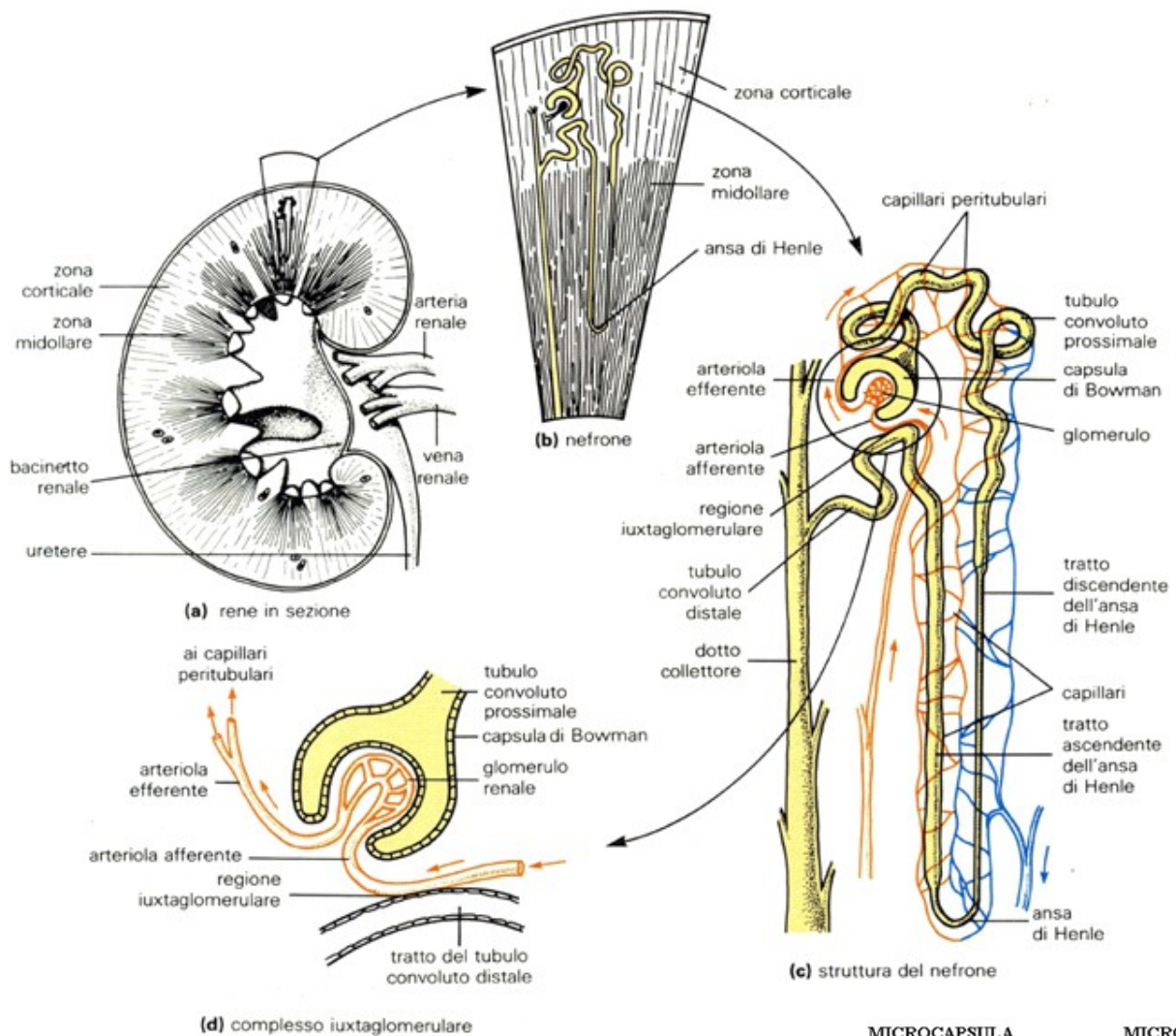
- ✓ riducono la concentrazione di farmaco nei tessuti sani;
- ✓ consentono targeting specifico (minor dose necessaria);
- ✓ rilascio controllato (la concentrazione di farmaco resta in intervallo terapeutico per tempi più lunghi);
- ✓ stabilizzano il principio attivo (per esempio nel caso di enzimi).

Comuni vie di somministrazione farmacologica:

- via topica (applicazione diretta del farmaco nella sede di azione);
- via percutanea (assorbimento del farmaco attraverso la pelle);
- via gastroenterica (attraverso mucosa orale, rettale,



filtrate mentre macro molecole di grandi dimensioni, compresa la maggior parte delle proteine, non riescono ad attraversare questo filtro.



Le microparticelle si dividono in **microcapsule** (gusci polimerici che contengono farmaco puro) e **microsfere** (matrici polimeriche in cui è disperso il farmaco).

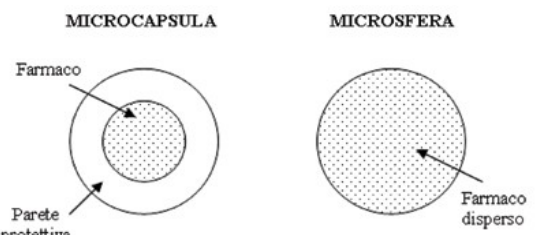
Se le particelle sono stabili (cioè se non vengono degradate), il rilascio di farmaco avviene per diffusione secondo la legge di Fick. Per avere un rilascio costante le microcapsule sono meglio delle microsfere in quanto il gradiente di concentrazione viene mantenuto più a lungo.

Per la preparazione di microparticelle si può partire da polimeri preformati (tramite precipitazione di farmaco e polimero) oppure sfruttare una polimerizzazione in presenza di farmaco. I metodi possibili sono:

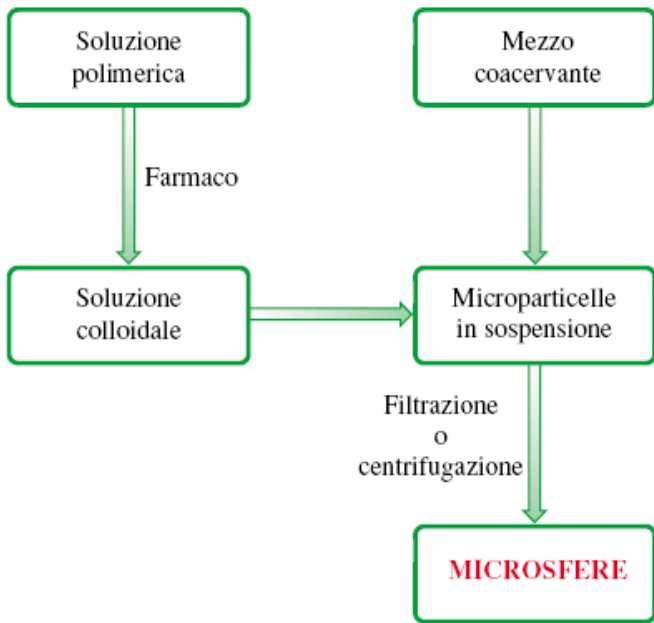
- evaporazione lenta del solvente;
- reticolazione in sospensione;
- coacervazione.

La preparazione di microparticelle deve soddisfare certi criteri:

- possibilità di incorporare concentrazioni relativamente alte di farmaco;
- stabilità della preparazione dopo la sintesi con un tempo di stoccaggio clinicamente



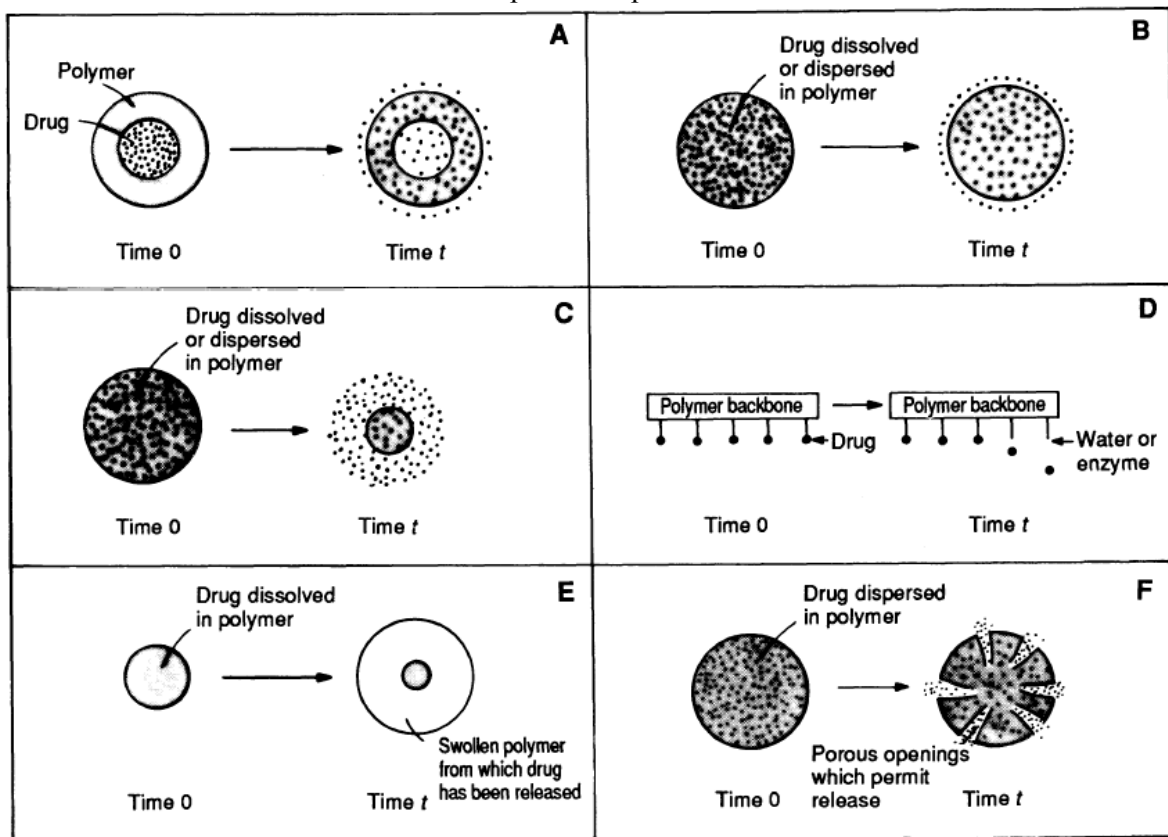
Coacervazione: separazione di fase in seguito alla desolvatazione delle molecole di polimero solvate: si formano aggregati macromolecolari.



Invece di un sospendente si usa un mezzo che sottrae solvente al polimero (è più affine al solvente di quanto lo sia il polimero).

Con il metodo della coacervazione si induce la precipitazione del polimero sulla superficie di un farmaco sospeso, mediante la variazione della temperatura o l'aggiunta di sali o solventi. È un metodo utilizzato prevalentemente con polimeri idrofilici (chitosani, sodio alginato e gelatina). Si ottengono così microcapsule di 200 – 1000 nm che vengono separate dal mezzo mediante evaporazione del solvente, filtrazione o centrifugazione.

La diffusione del farmaco da micro e nanoparticelle può avvenire tramite diversi meccanismi.



- A → diffusione da microserbatoi;
- B → diffusione da sistemi a matrice;
- C → degradazione del polimero;
- D → distacco del farmaco da un supporto polimerico;

durante la degradazione la matrice diventa più permeabile. Si devono usare polimeri che presentino legami che possano essere idrolizzati, come i legami esterei. Per esempio il PLA degrada nel monomero finale acido lattico, non tossico.

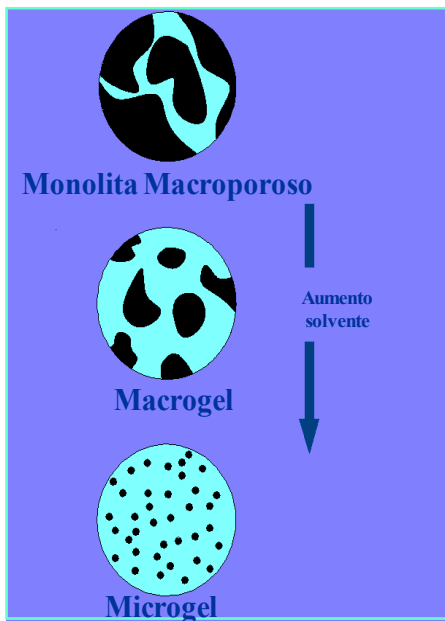
I polimeri con legami idrolizzabili possono avere due meccanismi di degradazione a seconda della loro idrofilicità.

I polimeri idrofobici (come i poliortoesteri o le polianidridi) subiscono una degradazione superficiale, il cui procedere può essere valutato misurando il PM del polimero.

I polimeri parzialmente idrofilici (come i poliesteri) subiscono un'erosione in massa, nella quale si rompono legami anche all'interno dell'oggetto.

Per esempio l'idrolisi degli esteri è catalizzata dagli acidi; la rottura di un legame estereo porta alla formazione di un prodotto acido, quindi durante la degradazione si forma un pH basso in bulk che potrebbe portare ad avere una degradazione più veloce all'interno piuttosto che sulla superficie.

Per avere rilascio graduale di farmaco è meglio sfruttare il meccanismo di erosione superficiale.



Esistono diversi metodi di preparazione di nanoparticelle.

Il metodo della **polimerizzazione per precipitazione** è molto simile a quello della sintesi in bulk, l'unica vera differenza consiste nel diverso rapporto tra la quantità di solvente porogeno (in questo caso molto maggiore) e gli altri composti presenti nella miscela di reazione. L'eccesso di solvente porogeno impedisce la formazione di un blocco solido e porta direttamente alla produzione di microsfele di polimero di dimensioni e forma regolari.

Gli altri metodi si dividono in due diversi approcci:

- top down: si parte da un polimero in polvere grossolana e si effettua una macinazione meccanica fino ad ottenere una nanopolvere. Tuttavia la macinazione meccanica non risulta adatta per la produzione di sistemi nanodispersi perché al diminuire della

dimensione diventa difficile garantire una distribuzione dimensionale omogenea;

- bottom up: il polimero viene processato attraverso diversi passaggi di soluzione e precipitazione. La formazione di nanoparticelle si verifica per:
 - precipitazione;
 - condensazione;
 - specifiche procedure di sintesi.

La differenza risiede nel ruolo svolto dalle sostanze specificatamente introdotte durante il processo. Nella *precipitazione* si introducono additivi (tensioattivi) che operano sulla superficie delle particelle, stabilizzando la sospensione. Nella *condensazione* gli additivi promuovono la formazione della fase nanodispersa. L'impiego di un solvente è un problema, perché poi deve essere allontanato.

La tecnica di **emulsione-evaporazione** si compone principalmente di 4 passaggi:

1. preparazione di due soluzioni immiscibili. La prima è ottenuta per dissoluzione del farmaco e del polimero con cui si realizzano le particelle in un solvente appropriato. La seconda consiste di una fase acquosa contenente un emulsionante;
2. attraverso l'aggiunta della prima soluzione nella seconda sotto vigorosa agitazione (agitazione meccanica, omogeneizzazione, sonicazione) avviene la formazione dell'emulsione;
3. estrazione/evaporazione del solvente dalla fase continua (acquosa) e solidificazione/indurimento delle micro o nanosfere;

- non richiede omogeneizzazione spinta;
- non richiede purificazioni energetiche.

Viene usata soprattutto su polimeri degradabili (PLGA, PLA, PCL) e come solvente si usa acetone.

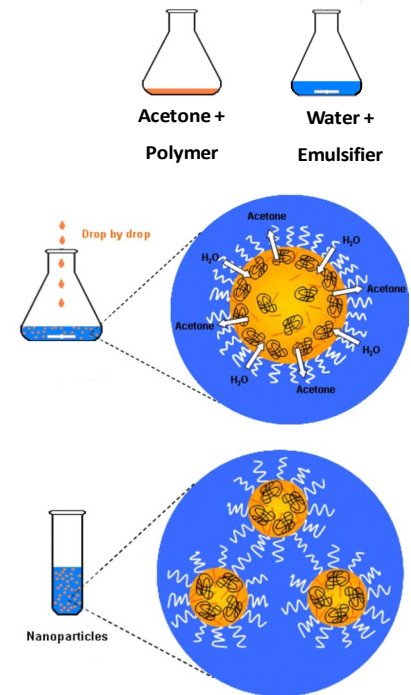
Il **salting-out** è una variante del processo di emulsione-diffusione. Permette di ottenere pseudolatex nanodispersi attraverso la formazione di un'emulsione durante una fase intermedia. Il processo si basa sull'utilizzo di elettroliti (NaCl, MgCl₂, CaCl₂ o saccarosio) che vengono addizionati in una soluzione acquosa.

Il metodo di **precipitazione per spostamento di solvente** viene usato per ottenere sistemi di trasporto per principi attivi lipofili, poco solubili o addirittura insolubili in acqua.

1. Preparazione delle due soluzioni reagenti. La prima è costituita da acqua e da un tensioattivo. La seconda da un solvente miscibile in acqua (tipicamente acetone) in cui è disciolto il polimero e il principio attivo.
2. Per l'ottenimento delle nanoparticelle è sufficiente aggiungere la seconda soluzione alla prima, mantenendo il sistema in blanda agitazione. Le particelle si formano spontaneamente per la diffusione del solvente dall'interno delle particelle verso la fase esterna.
3. Allontanamento del solvente per evaporazione, per riscaldamento o sotto vuoto.

Altri metodi di preparazione di nanoparticelle:

- I **fluidi supercritici (SF)** sono usati in diversi procedimenti di preparazione di sistemi organici micro e nanodispersi. Il loro uso industriale è legato alle particolari proprietà di solventi e alla flessibilità tecnologica legata alle basse temperature a cui possono essere utilizzati. I processi che utilizzano la CO₂ liquida quale agente di raffreddamento della soluzione contenente il principio attivo si basano sull'introduzione di una corrente di CO₂ che induce la formazione delle particelle per cristallizzazione.
- Un'altra tecnica produttiva è basata sulla **formazione di polianioni e policationi** in soluzione acquosa. Si ha la formazione di nanoparticelle per compensazione stechiometrica di carica, persino quando la struttura delle sostanze coinvolte è molto diversa.
- Le nanoparticelle possono essere preparate anche in fase di **sintesi del polimero**. Secondo questa procedura, il principio attivo viene disciolto nel mezzo di polimerizzazione, prima dell'aggiunta del monomero; in alternativa, introdotto alla fine della reazione di polimerizzazione. La reazione di polimerizzazione avviene all'interfaccia tra le due fasi e si formano gocce immiscibili di principio attivo incapsulate nella struttura polimerica. La sospensione di nanoparticelle viene purificata mediante ultracentrifugazione o per risospensione. La polimerizzazione interfacciale è molto rapida e semplice e l'efficienza di incapsulamento del principio attivo è buona.



Si possono usare **liposomi**, microsfeere cave formate da uno o più doppi strati lipidici. L'interesse dei liposomi è legato alla loro membrana (costituita da colesterolo e fosfolipidi come la fosfatidilcolina e il diacetilfosfato), la cui struttura, composizione e proporzioni sono praticamente identiche alla membrana delle cellule dell'ospite. Servono da piccoli depositi che possono contenere un antigene, un antibiotico, un allergene, un farmaco o un gene ed essere introdotti nell'organismo

