



**Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino**

**Appunti universitari**

**Tesi di laurea**

**Cartoleria e cancelleria**

**Stampa file e fotocopie**

**Print on demand**

**Rilegature**

NUMERO: 1705A -

ANNO: 2015

# **A P P U N T I**

STUDENTE: Bettale Valentina

MATERIA: Bionanotecnologie Appunti + riassunti + domande esame + temi esame - prof. Ciardelli (2015)

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.**

# CAPITOLO 2 (1 = INTRODUZIONE)

**Biomems** = BIOLOGICAL MICRO-ELECTRO-MECHANICAL SYSTEMS  
SISTEMI O DISPOSITIVI, REALIZZATI UTILIZZANDO  
TECNICHE ISPIRATE ALLA FABBRICAZIONE SU MICRO-  
E NANO-Scala che siano usate x lavorazione,  
TRASPORTO, MANIPOLAZIONE, ANALISI O COSTRUZIONE  
DI ENTITA' CHIMICHE O BIOLOGICHE

MATERIALI /  
- MICROELETTRONICI (Si)  
- PLASTICI / POLIMERICI (PDMS)  
- BIOLOGICI (PROTEINE / CELLE)

Biomems x applicazioni diagnostiche = BIOCHIPS =  
RILEVARE CELLE, MICROORGANISMI, VIRUS, PROTEINE,  
DNA E ACIDI NUCLEICI CORRELATI AD ALTRA MOLECOLE  
DI RILEVANTE IMPORTANZA ED INTERESSE BIOCHIMICO

**Biosensori** = DISPOSITIVI ANALITICI CHE COMBINANO  
- **BIORECETTORE** = elemento sensibile  
- **TRASDUTTORE** = fisico o chimico  
- **COMPONENTE BIOLOGICO** = analita da determinare

x DIAGNOSTICA  
CLINICA

servono x determinare sensitivamente e  
QUANTITATIVAMENTE LA PRESENZA DI COMPOSTI  
SPECIFICI IN UN DATO AMBIENTE ESTERNO

elemento di  
RICONOSCIMENTO  
MOLECOLARE

ex: ENZIMA

(Responsabile della selettività)

elemento che TRASDUCE  
IL SEGNALE DI RICONOSCIMENTO BIOLOGICO  
IN UN SEGNALE ELETTRICO  
(Differenziale di modifica biochimica)

Si classificano secondo la classe della molecola che  
costituisce la parte sensibile del sistema.

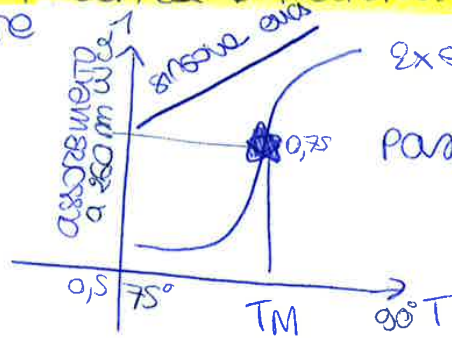
- ENZIMATICI
- IMMUNOLOGICI
- DNA x RICONOSCIMENTO DEI GENI
- CELLULARE
- TISSUTALI

L'assorbimento ↑ con la denaturazione. xk le basi non sono nascoste

$$A = -\log T$$

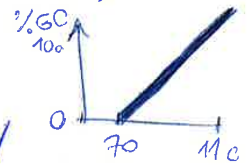
$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

$$A = \log \left( \frac{I_0}{I} \right)$$



2x euca

passaggio ordinato / disordinato



$T_M = T$  alla quale il 50% della sequenza è ibridata al suo filamento complementare  
 caratteristica di stabilità per l'ibrido che si forma tra la sonda e il suo filamento complementare

## ② annealing

a TA i "primer" oligonucleotidici ibridano con i 2 filamenti denaturati di DNA

si devono scegliere

- tempo di appaiamento dei primer (30 sec o -)
- temperatura di annealing TA ( $T_M - 5^\circ C$ )

costante durante i cicli  
 touch-down = diminuisce ad ogni ciclo  
 ↑ T x selettività  
 ↓ T xk serve - selettività  
 miglior attacco del primer

## ③ sintesi

i primer vengono estesi e i filamenti si sintetizzano dalla DNA polimerasi si ha un'ampificazione esponenziale del DNA bersaglio

$$N = (1 + e)^n$$

N = copie ottenute  
 e = efficienza (0,7 - 0,8)  
 n = cicli

### Resumé:

il materiale di partenza è frammento di DNA clonato o una miscela di molecole di DNA. I primer sono invece oligonucleotidi sintetizzati chimicamente e sono usati 2 primer x iniziare la sintesi di DNA in direzioni opposte. la reazione inizia con la separazione dei 2 frammenti di DNA a  $\uparrow T = 95^\circ C$ . poi la T è abbassata x permettere l'attacco del primer alle sequenze complementari su 2 opposti filamenti di DNA.

la DNA polimerasi usa i primer x sintetizzare ogni filamento complementare → rappiamento ad ogni ciclo di amplificazione



## PRINCIPIO DI RILEVAZIONE

PRIMER  
TTTT

① Denaturazione

Sequenza complementare  
AL LOOP



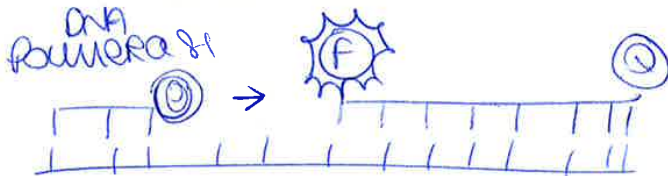
Molecular Beacon

F = molecola  
FLUORESCENTE

Q = quencher

se Q è vicino a F, F è spenta

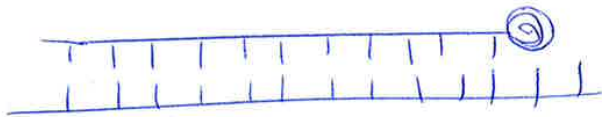
② Ibridizzazione



si accende (F) xk  
IL LOOP è STESO

si marca il DNA  
che si sta x estendere

③ estensione



porta la DNA Polimerasi  
e scatta via il MB  
che si spegne di nuovo

→ con la FLUORESCENZA  
si vede se la molecola  
si sta allungando

## DISPOSITIVO X RILEVAZIONE DEL DNA

PCR x amplificazione + elettroforesi su gel x rilevamento  
= Biomems che integra

↳ canali fluidici  
riscaldatori  
sensori di T  
rilevatori di fluorescenza acidi nucleici / proteine

## ELETTROFORESI SU GEL

= tecnica utilizzata x la separazione di biomolecole  
= filtrazione x dimensione (gel) e x carica (campo elettrico)

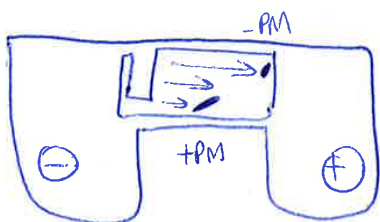
(peso molecolare) (forza di ostacolo) (carica elettrica) (forza di trascinamento)

→ Gli acidi nucleici migrano sempre verso il polo positivo x la presenza nella loro molecola di cariche negative nei gruppi fosfato ( $PO_4^{2-}$ )

↳ poliacrilamide  
agaroso

→ gel preparato in opportuni tamponi, può essere neutro o denaturante (urea) x migrazione di coppie o singole eliche

→ si assembla il sistema sulla cella elettrolitica



2 vaschette con tamponi, comunicanti, collegate ai 2 poli tra cui si genera  $\Delta V$

molecole ↑ pm  
molecole ↓ pm

↳ Lente  
veloci

Risultato = serie di bande grazie a miscela di frammenti a pm noto si fa il calcolo

# LCR

= **USASE CHAIN REACTION**  
alternativa alla PCR

= amplificazione di materiale genetico in un processo ciclico grazie ad una **USASI** termostabile e 4 subunitari

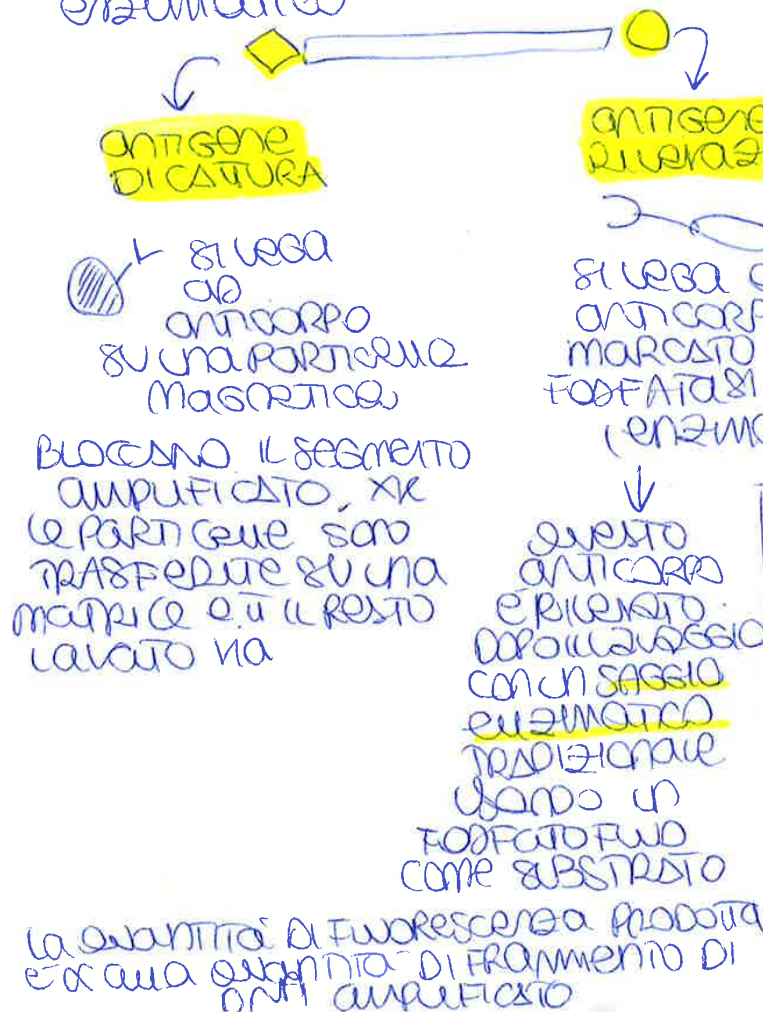
- ① PCR → **amplifico target** / LCR → **amplifico probe!!!**
- ② annealing del probe = sonda di DNA complementare ad una sequenza da rilevare
- ③ si legano le probe x realizzare una copia del DNA
- ④ si denatura il DNA
- ⑤ nuovi stampi x legare il probe
- ⑥ amplifica probe

# GAP LCR

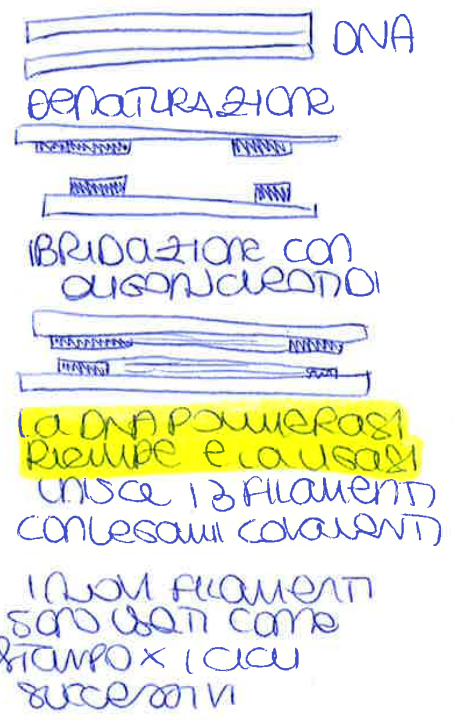
= variante in cui si ibrida un pezzo, si usa la polimerasi x completare la sequenza e poi si mette la **USASI** usata x probe unghi o x amplificare sequenze di DNA ristrette

# LCR Rilevazione

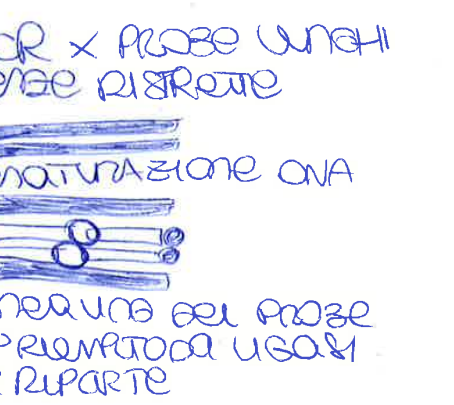
= effettuata tramite cattura con microparticelle ed un saggio immunoenzimatico



**LCR** 1



**LCR** 2



# CAPITOLO 2

## METODI DI RILEVAZIONE

= METODI (FENOMENI FISICI) CHE PERMETTONO DI LEGGERE I RISULTATI DEI PROCESSI BIOCHIMICI INSERITI ALL'INTERNO DEI BIOMEMIS



**MECCANICA** → VANTAGGIO: NESSUN UTILIZZO DI MARCATORI PARTICOLARI, MA SFRUTTA LA VARIAZIONE NELL'OSCILLAZIONE (LABEL FREE)

- SVILUPPATO + PROMETTENTE  
 LA RILEVAZIONE MECCANICA DI ENTRATE E REAZIONI BIOCHIMICHE È REALIZZATA TRAMITE L'USO DI SENSORI INSERITI SUL CANTILIVER (BILANCIA REALIZZATA COME TRAVE A MENSOLO)

\* VARIAZIONE DI MASSA = **MASS SENSING**

- cantiliver
- equazione meccanica esterna
- vibra in risonanza
- confronto f prima/dopo analisi
- usata x "grandezza" entrata (cellule)

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

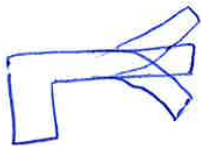
$$2\pi f \sqrt{m} = \sqrt{k}$$

$$m = \frac{k}{(2\pi f)^2}$$

mensola caricata

mensola scarica

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



\* REAZIONE BIOCHIMICA = **STRESS SENSING**

- reazione selettiva sul lato
- cambia energia usata
- cambia stress superficiale
- bending = piezoelemento misurabile con cader o piezoresistore

$$\Delta z = 4 \left( \frac{l}{t} \right)^2 \frac{(1-\nu)}{E} (\Delta \sigma_1 - \Delta \sigma_2)$$



ESEMPLI:

- **RILEVAZIONE DI FILAMENTI DI DNA**  
 SUI CANTILIVER SONO IMMOBILIZZATI MONOFILAMENTI DI DNA. DATA UNA SEQUENZA, LA SI AMPLIFICA CON LA PCR, LA SI DENATURA, SI METTE SUL CANTILIVER E SE È COMPLEMENTARE SI IBRIDA A OLL PRESENTE AUMENTANDO LA DEPRESSIONE DELLA MENSOLO (STRESS)

# TRANSISTOR

Tecnologia alla base dei sensori potenziometrici, che misurano un cambiamento di potenziale agli elettrodi causato da ioni o da una reazione chimica ad un elettrodo

= Dispositivo a stato solido formato da semiconduttori, 3 terminali, giunzione p-n x diverso drogaggio

**BJT** = Transistore a giunzione bipolare  
**FET** = Transistore a effetto di campo (unipolare)  
 SiLicio drogato + GATE/SOURCE/DRAIN/BULK  
 JFET - MOSFET - MESFET

## MOSFET

TRANSISTORE a effetto di campo metallo ossido conduttore

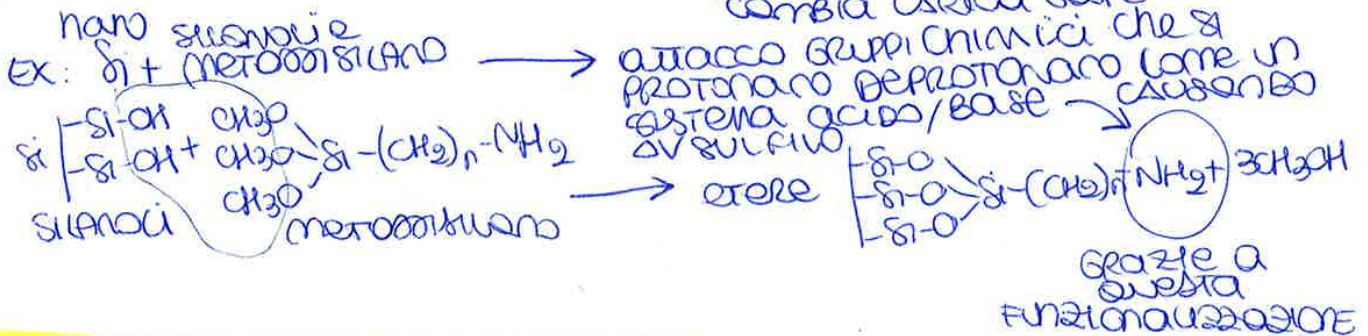
- condensatore (MOS)
- Strati 3
- 2 terminali: S e D
- substrato drogato ≠ dai terminali

La tensione sul gate crea una zona svuotata priva di portatori. Se oltre soglia provoca una inversione di popolazione nel Si a ridosso del ossido (canale)

Sensori potenziometrici (MOSFET)

### X LA MISURA DEL PH:

- **ISFET**: FET sensibile agli IONI: misura [H<sup>+</sup>] in soluzione MOSFET, TAGO GATE, USANTE ESPOSTO ALLA SOLUZIONE
- **CHEMFET**: FET COMPO CHIMICO: MOSFET, SOTTO GATE, ELEMENTO SENSIBILE CHE ASSORBE IONI CAMBIA CARICA GATE



### X IL RICONOSCIMENTO MOLECOLARE = BIOFET

Si modifica con proteine x renderlo biocompatibile e x utilizzabile come recettori ed elementi sensibili

X immobilizzare le proteine, si inseriscono nanotubi di carbonio

ex: NANOTUBI C + enzima = misura del potenziale elettrico tra SOURCE e DRAIN (x le reazioni REDOX)

La modifica dei sensori MOSFET può avvenire tramite

- **NANOWIRES DI SILICIO** → **MECCANISMO VLS**: i costituenti in forma gassosa precipitano attraverso un catalizzatore liquido su di una superficie cristallina con formazione di fili su di un substrato solido
  - **NANOTUBI DI CARBONIO** → **MECCANISMO VLS**: i costituenti in forma gassosa precipitano attraverso un catalizzatore liquido su di una superficie cristallina con formazione di fili su di un substrato solido
- Ma il metodo + comune è la crescita termolitografica da vapori partendo da precursori solidi, ad 1T



## 1) ARCO elettrico

- 2 elettrodi in grafite, uno con metano x catalizzare
- applico  $\Delta V$
- Gas inerte in camera
- amaro elettrodi avere scarica elettrica
- $\uparrow T$  (4000°C)
- sublimazione del C dell'altro
- che si deposita sulle pareti in NT

resa 30%  
vari tipi  
non puri  
corn

## 2) miscela di C e metano vaporizzata tramite laser

## 3) vaporizzare grafite e metano con energia solare concentrata con un forno solare a specchio parabolico in sviluppo ancora

+ resa  
+ qualità

## 4) solo metodo continuo

sorgente gassosa di C in un reattore,  $\uparrow T$  con catalizzatore la sorgente si decompone, rilascia C, trasformato in NT (CO, CH<sub>4</sub>)

+ resa  
taglia scelta

+ difetti

lungi  
+ MWNT  
che SWNT

## CRESITA

il C è adsorbito sulla superficie usata del catalizzatore e diffonde dentro esso x aumentare la crescita del tubo

il cata  $\left\{ \begin{array}{l} \text{rimane come base} \quad \text{BASE-GROWTH} \\ \text{avvicinarsi dal supporto} \quad \text{TIP-GROWTH} \end{array} \right.$

H

I

la formazione di singola parete o multipla dipende da quale tappa è cineticamente + impo

Diffusione C in partic  
aumentazione C  
alla particella  
SWNT

MWNT

## PURIFICAZIONE

non si riesce a purificare senza danneggiare  $\rightarrow$  compromesso qualità/quantità

eliminazione di:

- particelle di catalizzatore : ossidazione, acidi, sublimazione
- particelle di supporto : trattamento con soluzioni acide
- altre forme di carbonio : filtrazione, centrifugazione, riduzione con H<sub>2</sub>, ossidazione all'aria con permanganato (e altri reagiscono + dei NT)

## Funzionalizzazione x rendersi + solubili in H<sub>2</sub>O

prima ossidazione acida x esporre gruppi carbonilici eliminando le catene estere NT + corn e solubili grazie a acqua regia, poi asu -COOH si legano le molecole varie

oppure fine con estere attivo e gruppo pirone } si lega legame ammidico  
(part NT / proteina)  $\rightarrow$  CARBOIMMIDE

immobilizzazione di streptavidina-BIOTINA / enzima ossidasi

## TOSSICITÀ $\uparrow$ con funzionalizzazione

- tossici di fibre o nanotubo x concentrazione e x tempo ma cmq sono tossici!

$\rightarrow$  ma cmq applicazioni biomediche, su non è tossico x il na di fibre

# MICROARRAYS

TUTTI I SENSORI (MECCANISMI X LA RILEVAZIONE) POSSONO ESSERE SVILUPPATI ALL'INTERNO DI UN FORMATO ARRAY X RILEVARE ENTITÀ MULTIPLE SIMULTANEAMENTE.

= **micromatrice di elementi sensibili**

## • DNA MICRO ARRAY

≠ tecniche  $\left\{ \begin{array}{l} \text{OTICA} \checkmark \\ \text{ELETTRICA} \checkmark \\ \text{CHIMICA} \times \end{array} \right.$

BISOGNA COSTRUIRE IN OGNI ELEMENTO DELLA MATRICE 1 SEQUENZA DI DNA NOTA (**CAPTURE PROBE**) e LESORLA IN MODO CONSISTENTE



TECNICHE DI AUTOMAZIONE X CAPTURE O NON

### TECNICA OTICA:

VERINO MODIFICATO X ESPORRE  $NH_3^+$  → SI IRRADIA CON UNA MASCHERA IN CERTE ZONE X DEPROTEGGERE → ATTACCO NUCLEOTIDE → SECONDA MASCHERA ETC

### TECNICA ELETTRICA:

(X SEQUENZE + UNICHE) → ~~LOW COST!~~ GRAZIE AL FATTO CHE IL DNA HA CARICA  $\ominus$  X LO SCHELETRO DI FOSFATO  $\oplus$  X ATTACCARE I PROBE → DNA FWO CHE SI IBRIDAZZA →  $\ominus$  X STACCARE I NON ATTACCATI DEL CAPTURE

### TECNICA CHIMICA:

LASTRE AMMINO MODIFICATE  $NH_3^+$   
 $H_2=O$  AIBERLE

SOFT LITHOGRAPHY  
STAMPA A MICRO-CONTATTO

• RICERCA DI PROTEINE MALATTIA-SPECIFICHE  
ARRAY DI PROTEINE E ANTICORPI

### • PROTOCOLLO DI ANALISI DEL MICROARRAY

• PRELEVATO RNA O MRNA

↓  
• CONVERTITO IN cDNA X TRANSCRIZIONE INVERSA

↓  
• cDNA IBRIDAZZATO CON LE PROBES DEL MA

↓  
• SCANNERIZZAZIONE DEL CHIP E ANALISI TRAMITE SOFTWARE DEDICATI

ad esempio  
2+ popolazioni  
marcate  
(MAPPATURA)

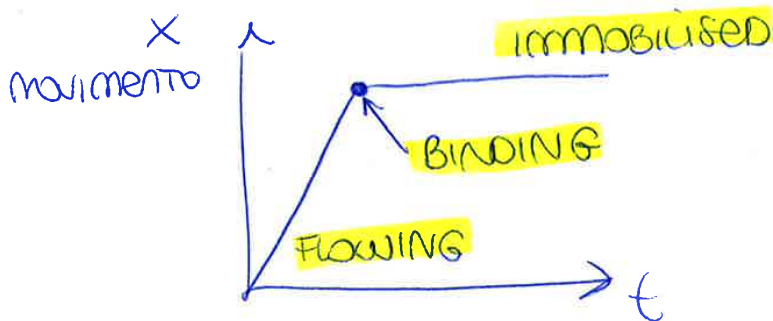
△ **IBRIDAZIONE GENOMICA COMPARATIVA (VEDO SUBE)**  
**ACGH**

# \*SASSI IMMUNOLOGICI

= INDIVIDUAZIONE cellule tumorali nel sangue a seconda della presenza di proteine diverse da quelle sane e individuati grazie ad anticorpi specifici

ex: CHIP MICROFLUIDICO ad 11 canali  
 Le cellule si muovono lungo le 11 linee funzionalizzate con gli anticorpi che rallentano e bloccano il percorso  
 + delle cellule tumorali  
 + riscaldatore x mantenere la T  
 + ventili x aspirare  
 + marcatore fluorescente delle cellule

= GRAFICO a 3 zone



LEGGI  
 CANCRO e  
 METASTASI

SOLTAMENTE I  
 DISPOSITIVI SONO  
 PROGETTATI AL PC  
 E POI COSTRUITI X  
 LITOGRAFIA SOFT

una prova pre-CHIP consiste nel verificare che gli anticorpi riconoscano le cellule tumorali  
 poi si deve scegliere la velocità del fluido → 1.5 μl/m

ex: CHIP x CTC = cellule tumorali circolanti  
 (sono utili x la terapia ma nel sangue ce ne sono poche)  
 → NANOVLCFO anche vi immobilizza uno specifico anticorpo

- nanofili di Si
- + SILANO
- + STREPTAVIDINA
- + MOLECOLA BIOTINATA

- } MIXER SERPENTINO
- } ABSTRATO SiNW
- } SILICURA WAFER DI Si con FOTOLITOGRAFIA + ETCHING CHIMICO FINALE DOPO IL COATING DI STRPE

# CAPITOLO 3

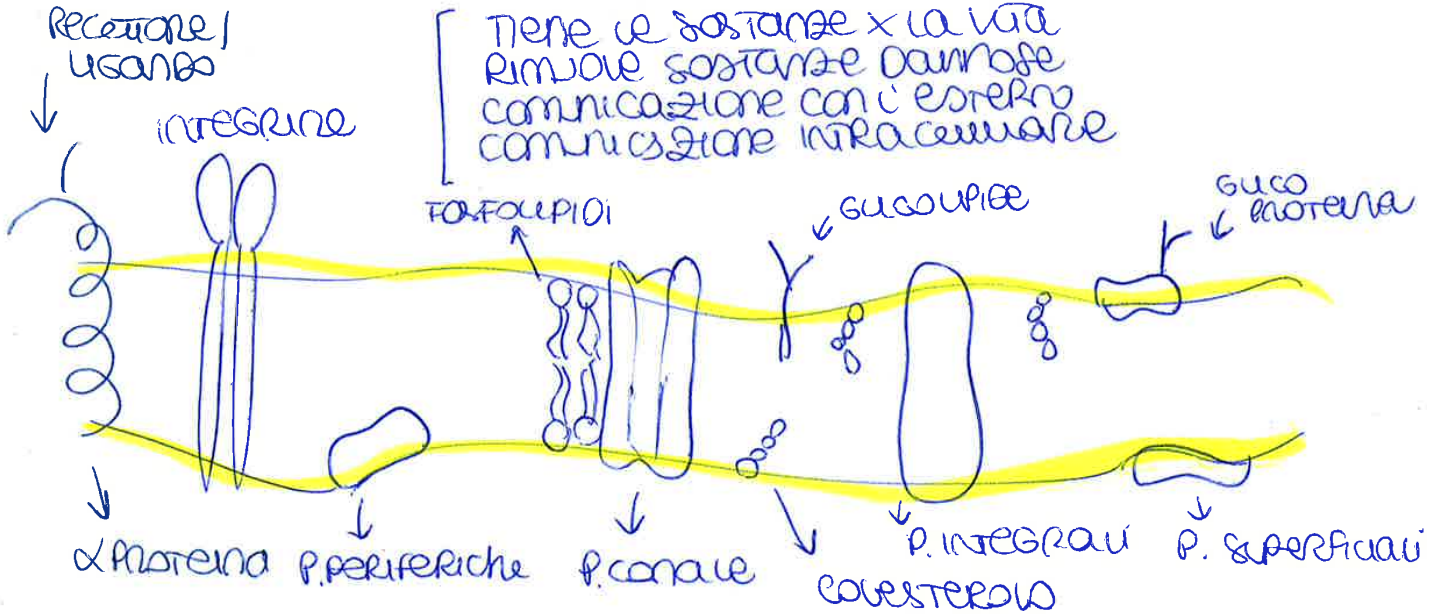
## ADESIONE CELLULARE

Cellula = entità chiusa e autosufficiente  
 Membrana cellulare = doppio strato lipidico (5nm)

Carica netta  $\ominus$   
 Recettori - usando

PROTEINE  
 Glicidi = Glicoproteine  
 Glicolipidi

Cole  
 IONOFORICHE  
 TESTE  
 IONOFORICHE



ECM = Fuori cellula

- collagene
- elastina
- fibruino
- fibronectina
- laminina
- proteoglicani

) P. STRUTTURALI

) P. SPECIALIZZATE

↳ GAGs  
 acido  
 CARBONICO



- Osteonectina
- Vitronectina
- Condronectina

compartimenti x adesione

- Proprietà superficiali
- P. Meccaniche
  - P. morfologiche
  - P. elettriche
  - Particelle non polimeriche

# CITOCOMPATIBILITÀ

La citocompatibilità di un materiale si calcola quantificando l'adesione nei punti focali. Ci sono 7 tecniche

- Metodi meccanici
  - Misura forza x presenza  $\Delta$  microspinta attaccata ad una cellula x sezione
  - AFM = microscopia a forza atomica (punta micrometrica collegata ad un cantilever che si fa scorrere sulla superficie misurando le forze di interazione punta/sup. (punta con forcecurve))
- Metodi non mecc
  - Quantificazione marcatura FWO con vincolanti
  - SEM microscopia ottica a sezione x vedere la marcatura per il p. di adesione

Metodi immunocitochimici - anticorpi marcati FWO x riconoscere antigeni (vere marcata la vincolanti)

Basso spreading  $\rightarrow$   $\downarrow$   $\bar{\mu}$  e viabilità  
 Medio spreading  $\rightarrow$   $\downarrow$  differenziazione  
 Alto spreading  $\rightarrow$   $\downarrow$  prolif/migraz  
 per  $\uparrow$  differenziamento

## Biomateriali

- 1° Gen = Bioinerti
- 2° Gen = Biostim - Biodegradabili
- 3° Gen = Biomimetici con simulazione di una risposta cellulare specifica

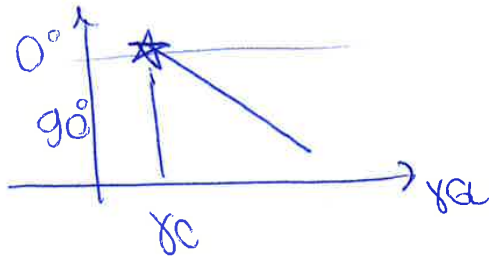
Funzionalizzare  $\leftarrow$  classica < surface bulk  
 con nanotecnologie  $\leftarrow$  impronta molecolare  
 self assembling monolayer  
 FLB  
 ECM sintetica

## Proteine x adsorbimento su superfici

- $\Delta$  cambia orientazione e conformazione
- $\Delta$  effetto **Uroman** - adsorbimento di siero è dinamico prima proteine  $\downarrow$  peso  $\uparrow$  concentrazione poi  $\uparrow$  peso e  $\downarrow$  conc ma + affinità

→ **METODO DI ZISMAN** =

si misurano  $\theta$  di uguali con tensioni superficiali note e crescenti sulla superficie di interazione  
 $\theta$  plotted in funzione di  $\gamma_{SL}$  (GAS-LIQUIDO)



$\gamma_c$  = tensione sup critica  
 a  $\theta = 0^\circ$

serve x stimare l'energia di superficie del materiale

**DEPOSIZIONE DI LANGMUIR - BLODGET**



strato ordinato di molecole artificiali

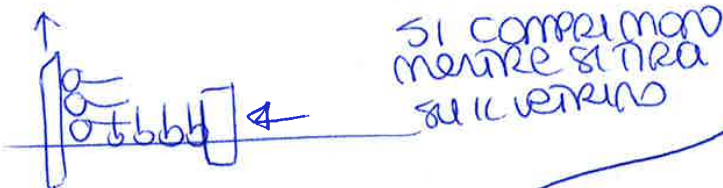
La tecnologia di LB è basata sulla proprietà delle molecole organiche come lipidi etc di orientarsi su un'interfaccia aria/acqua tra le fasi liquida e gommosa x minimizzare la loro energia libera e formare uno strato insolubile

strato LANGMUIR FILM

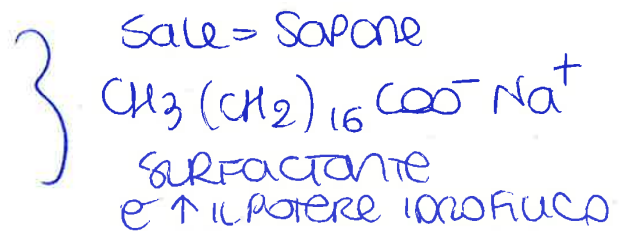
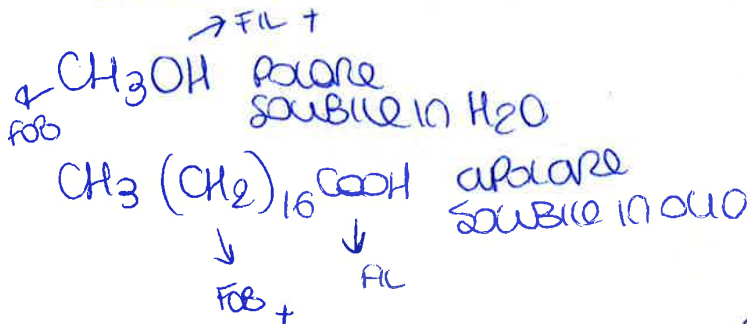
FILM LIPIDICO su strato acquoso



FILM LIPIDICO su vetro



**SURFACTANTI** = molecole artificiali capaci di ridurre la tensione all'interfaccia, x hanno caratteristiche intermedie tra le 2 fasi  
 sono composte da unità idrofobiche /  $\gamma_{OB}$   
 devono essere bilanciate x non farle sciogliere in una fase o nell'altra (solvanti polari / apolari)



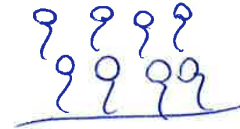
composizione  $\left\{ \begin{array}{l} \text{PARTE IDROFOBICA} = \text{catena idrocarburica} \\ \text{PARTE IDROFILICA} = \text{testa polare} \end{array} \right.$

assunta  $(\text{CH}_2)_n > 12$

$\left. \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{COOH} \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \right\} \rightarrow \text{O}$

# Deposizione a strati alternati x avere una struttura non centrosimmetrica:

- 2 materiali a singolo compartmento depositati in 1 unità sola



scaturamente a y



CoOx/CoOx



TeOx/TeOx

La caratterizzazione della deposizione è fatta con molte tecniche:

- Rapporto di trasferimento
- Spettroscopia UV e visibile
- Microbilancia di cristalli di quarzo
- Diffrazione a raggi x o elettroni

$$\tau = \left( \frac{A_L}{A_S} \right) \cdot 100 = 1 \text{ (ideale)}$$

area monolayer rimossa dal liquido  
area substrato da rivestire

x valutare uniformità del film, misurando l'assorbimento di strati monolayer  
 $\theta \gg 10 \rightarrow$  x interferenze

x misurare l'estensione del trasferimento  
 dispositivo che oscilla a 10MHz caricato col monolayer  $\downarrow$  la f  
 (500Hz/monolayer) senza interferenze

≠ tecniche x avere film sottili su un substrato solido

- evaporazione del solente
- sputtering
- SAM  $\Rightarrow$  self assembled monolayer
- elettrodeposizione

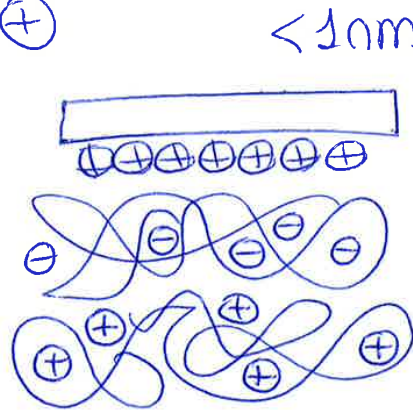
## SVANTAGGI:

- LB:**  $\left\{ \begin{array}{l} \text{strumentazione costosa} \\ \text{poche biomolecole (solo artificiali) e instabili} \\ \text{TANTO TEMPO DI FABBRICAZIONE} \\ \text{(molto difficile fare molti strati)} \end{array} \right.$
- SAM:**  $\left\{ \begin{array}{l} \text{natura di monostato} \\ \text{numero limitato di substrati} \\ \text{poca stabilità in condizioni ambiente o fisiologiche} \\ \text{+ x ricerca che non x scopi commerciali} \end{array} \right.$   $\left\{ \begin{array}{l} \text{TANTI SU MET. OZIU} \\ \text{SILANI SU SILICIO} \end{array} \right.$

## FILM LAYER-BY-LAYER (LBI)

SUBSTRATO con carica  $\oplus$

+  
 polianione  $\ominus$   
 +  
 lavaggio  
 +  
 policatione  $\oplus$   
 +  
 lavaggio



SIPONANO  
 etero  
**FILM MULTILAYER**  
 da  
 - materiali polielettroliti  
 - nanoparticelle inorganiche  
 - UPDI  
 - ceramiche  
 - biomolecole con carica spaziale al PH

- VANTAGGI:**  $\left\{ \begin{array}{l} \text{controllo proprietà} \\ \text{energia forma e taglia del substrato} \\ \text{amico dell'ambiente (soluzioni acquose)} \\ \text{T ambiente, poco costo} \\ \text{"auto caricamento" rispetto SAM / biomolecole} \\ \text{+ facile, veloce e stabile di LB} \\ \text{flessibile e versatile} \\ \text{TANTI substrati / tante specie cariche / TANTI} \\ \text{Tante interazioni} \\ \text{Tante applicazioni biologiche:} \end{array} \right.$

## ★ BIOSENSORI

Nei strati si incorporano biomolecole usate come biosensori (enzimi, proteine, immunosensori, DNA, ...)

- Esempio x Pacwaxel da monitorare (vs cancro) immunosensore con trasduzione piezoelettrica

Su cristallo piezo di quarzo nel LBI si immobilizza lo specifico anticorpo  $\rightarrow$  l'interazione farmaco/anticorpo



## ★ Adesione di Proteine e cellule

xc sono sensibili sia alla topografia che alle caratteristiche chimiche dell'ambiente circostante

## ★ IMPLANT COATINGS

Riparazione di vasi sanguigni mediante nanorivestimenti



L'intima è anti trombogena → moto impo!

• endotele danneggiato è rivestito di un rivestimento di HA = acido ialuronico e CH per fare LBL

• Stent + farmaci x inibire la proliferazione delle c. muscolari usce tramite rivestimenti farmaci

• Stent + superficie biocompatibile / emocompatibile con PEI / EPARINA su acciaio inox, si vede l'angolo di contatto che cambia in modo alternato

## SA = STRUTTURE SELF-STANDING

= BASATI SU PEPTIDI-ARTIFICIALI

STRUTTURA {

- CODA IDROFOBA
- LINKER = SEQUENZA DI COLLEGAMENTO
- SPACER = SPAZIATORE
- TESTA IDROFILA

si auto assemblano in micelle monolayers Bistram nanofibre ...

↓ sistemi biomimetici

ECM sintetica

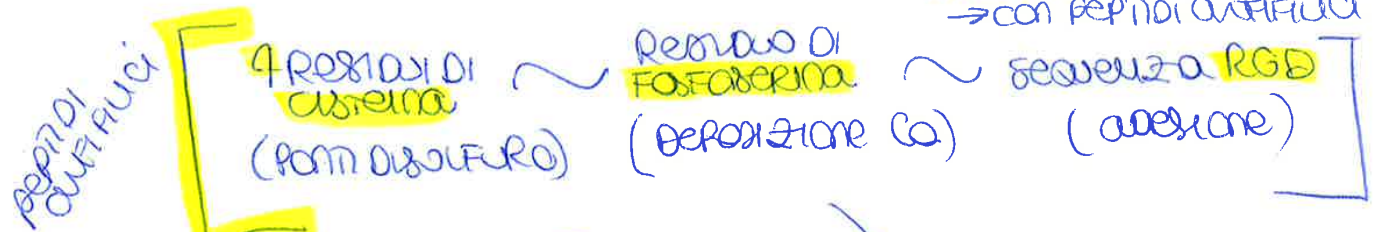
si mimano 2 aspetti dell'ECM

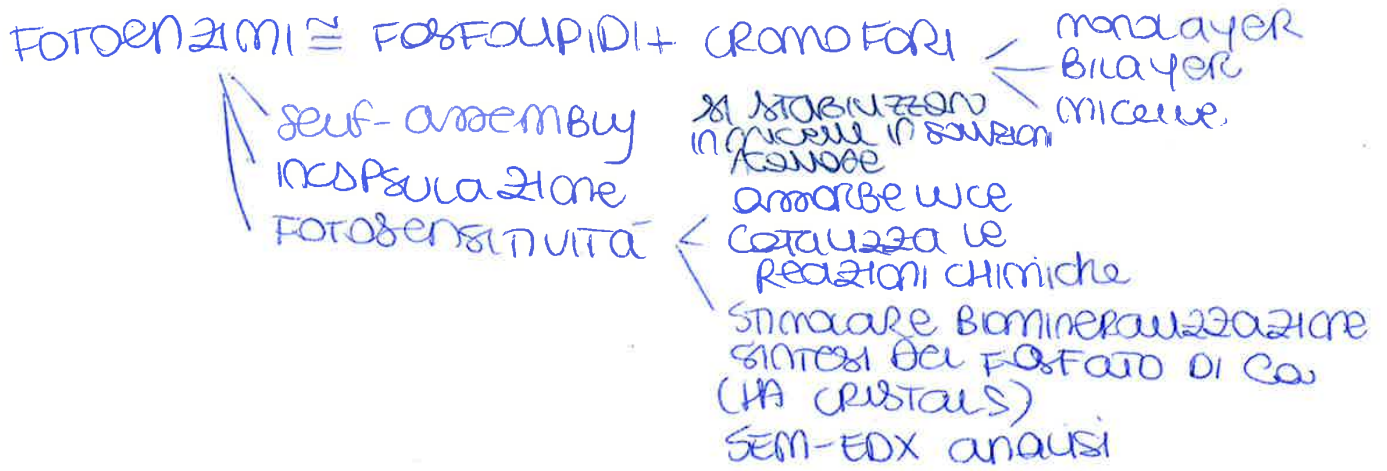
Funzionale

→ funzionalizza specifica x dirigere risposte ed

Strutturale intrinseca

→ con peptidi artificiali



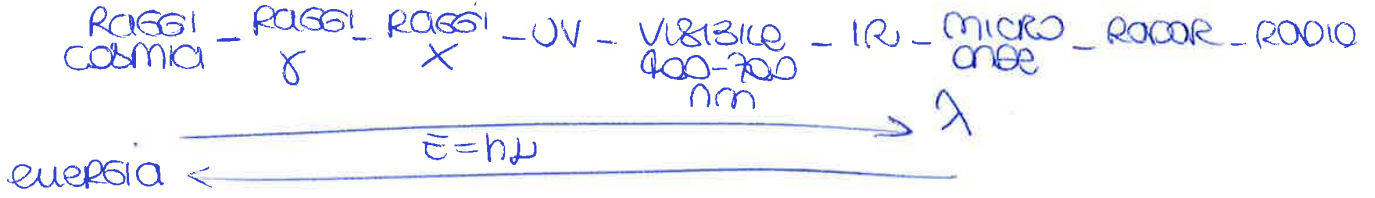


FOTOENZIMI SONO COPOLIMERI GRAMMATICI  
COMPRESI DA FOSFOLIPIDI (CARATTERISTICHE  
AMFIFILICHE) E CROMOFORI E UNITÀ ZWITTERIONICHE

# SPETTROSCOPIA

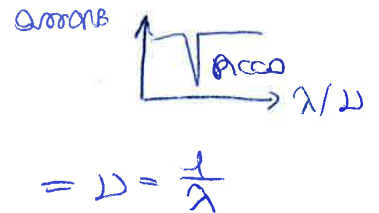
I metodi spettroscopici servono x analizzare la funzionalizzazione alla nanoscala effettuata  
 → sono metodi di immagine

Lo spettro elettromagnetico:



La spettroscopia dà informazioni sulle proprietà STRUTTURALI dei corpi, grazie allo studio dell'interazione della materia con l'energia elettromagnetica → si utilizza la banda 200/2000 nm (UV-VISIBILE-IR)

Raggi UV = Promuovono su  $e^-$   
 Raggi IR = eccitano vibrazioni molecolari

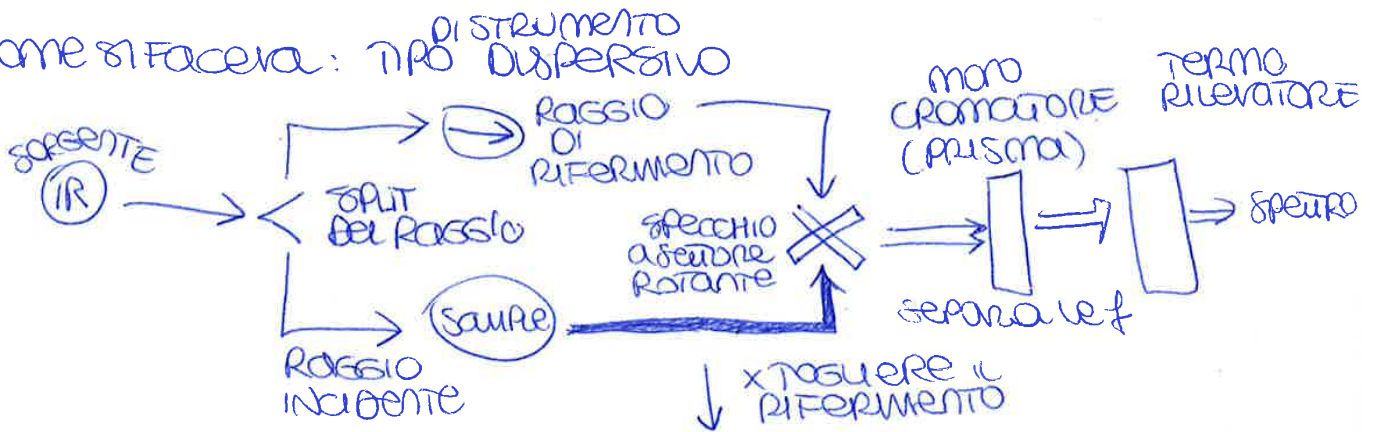


## SPETTROSCOPIA IR

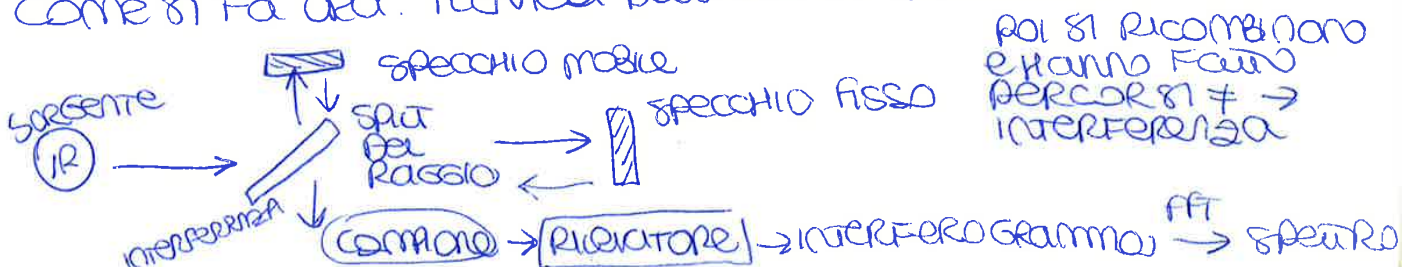
esempio: spettro IR etano  
 Picco CH → stretch = ossigeno, legami chimici e si allungano

→ si sono costruite mappe di correlazione  
 $\lambda, \nu \leftrightarrow$  legami/gruppo funzionale  
 in base al picco di assorbimento

Come si faceva: TIPO DISPERSIVO



Come si fa ora: Tecnica basata su interferometria



Le 2 bande tipiche dell'ammide sono

- NH deformazione  $\delta$
- C=O stretching

## MICROSCOPIA IR

Si effettua la microscopia a scansione, effettuando lo spettro di ogni punto in cui il campione è suddiviso, grazie ad un microscopio su una punta sotto la sorgente = identificazione chimica di particelle etc  
 = si ottengono mappe a colori ≠ che identificano perciò delle disomogeneità e la distribuzione chimica.

(Nxm) spettri + mappe a contrasto } **CHEMICAL IMAGING IR**

mappe di rapporto tra specie chimiche  
 poi associate a mappe di specie note

essendo tutti si correlano ma loro e si estrae un valore caratteristico = area di assorbimento totale (A. sovrata)

## CHEMICAL IMAGING

- Usate:
- industria farmaceutica x analisi dei difetti
  - analisi dei rivestimenti degli stent = non devono essere disomogenei
    - pu → • funzionalizzazione con RGD
    - • assunta facoltà (farmaco)

- ✓ verificare legame di proteina su superficie acido polimerico ATR-IR
- ✓ deposizione strati alternati LBL su acciaio ATR-IR

## SPETTROSCOPIA ELETTRONICA DAI INFORMAZIONI INTERCARI

Complementare alla SRI

Si colpisce il campione con un fascio di  $e^-$  = radiazione non emergente che provoca 2 fasi

- F. eccitazione: interazione con  $e^-$  + interni
- F. Rilasciamento: occupazione delle valenze create con emissione di energia

di seconda del raggio usato

RAGGI X → ESCA / XPS  
 RAGGI UV → PES  
 elettroni → AUGER

SPETTROSCOPIA FOTOELETTRONICA a RAGGI X  
 SPETTROSCOPIA ELETTRONICA X ANALISI CHIMICA

# ★ EPXS

spettroscopia dei raggi X a sonda elettronica

## ★ SEM-EDXA

accoppiamo spettroscopia con SEM o ESEM

ex: PVA - albumina  
immagine eterogenea  
spettro nelle parti disomogenee

ex: deposizione di HA su superficie rivestita con fotopolimero

- si ottengono
  - immagini da e<sup>-</sup> diffusi
  - analisi energetica di ost e<sup>-</sup>

determinazione formula di struttura di una molecola a 1000 pm

identificazione sostanze sconosciute

analisi in tracce di sostanze

# SPETTROMETRIA DI MASSA

Molecole

ionizzazione con fascio e<sup>-</sup>

instabili si frammentano secondo la struttura chimica

si separano su ioni in funzione del loro rapporto massa/carica

spettro di massa



ionizzazione

volatilizzazione

= usci di molioli nuovo spazio

CHIMICAZIONE

analizzatore

soltamente magnetico + rivelatore

## ★ metodi di ionizzazione

- da impatto: con fascio di e<sup>-</sup> ↓

↓ energia (14 eV) → ionizzazione (SOFT) → determinare peso molecolare

↑ energia (80 eV) → ionizza + frammentazione secondo struttura chimica → struttura molecolare

- di campo: x sostanze poco volatili  
(SOFT) ↑ campo elettrico  
si estrae un e<sup>-</sup> → ione

- chimica: e<sup>-</sup> ionizza CH<sub>4</sub> → ioni su campione → ioni (SOFT)

- Plasma: campione in plasma → ioni

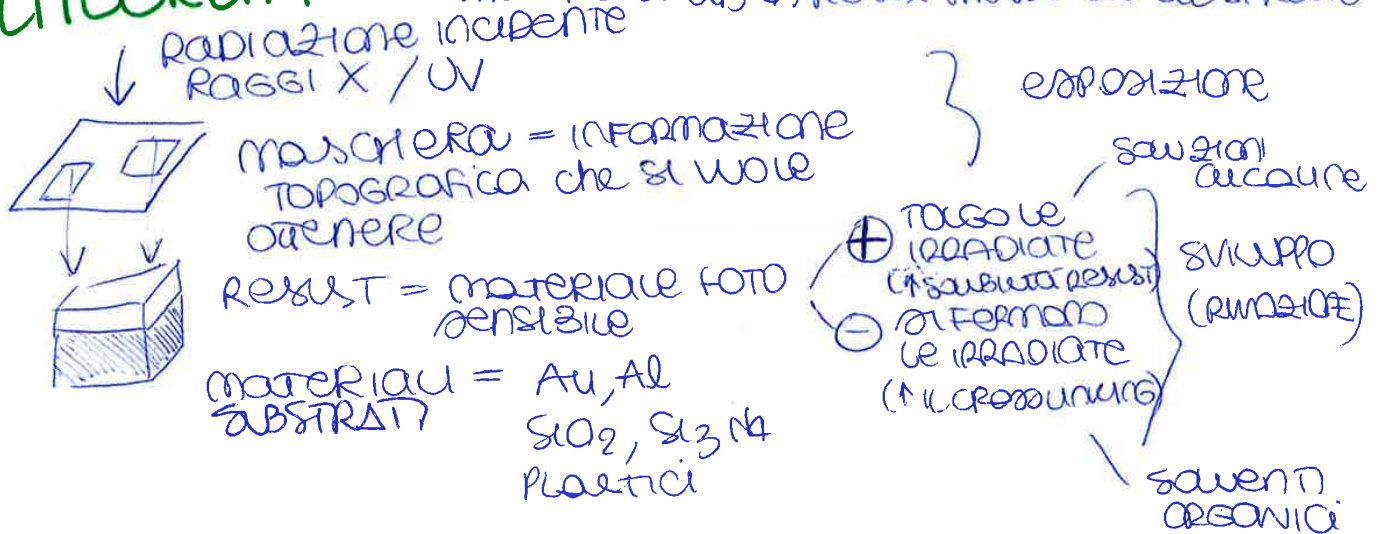
# MICRO E NANOFABBRICAZIONE

2 approcci:

- TOP-DOWN = si scolpisce da un blocco di materiale "bulk" - LITOGRAFIA / SOFT / ETCHING
- BOTTOM-UP = assemblaggio da nano blocchi
  - ↳ deposizione nano poweri
  - ↳ deposizione su substrati
  - ↳ manipolazione atomica

## TECNOLOGIE TOP-DOWN

**LITOGRAFIE** = si trasferisce il disegno voluto da una maschera ad un resist mezzo sul substrato



litografia a contatto ↑ RIS, ↑ DURATA  
metodi di esposizione a proiezione (lente) ↑ RIS  
in proiezione ↓ RIS

## ★ TRADIZIONALE

- 1) lavatura wafer Si
  - 2) stesura resist uniforme mentre gira (spinner) (calcolo spessore)
  - 3) SOFTBACKING = togliere solvente nel resist
  - 4) copertura con maschera
  - 5) esposizione x impressionare
  - 6) sviluppo = rimozione resist solubile
  - 7) cottura o POSTBAKING = ↑ resistenza foto resist
- poi eventualmente < deposizione  
etching

per avere risoluzioni migliori e scendere alla nanoscala si cambia il fascio

↳ E-BEAM = fascio di e<sup>-</sup>  
↳ RAGGI X / UV estremo

★ MICRO-MOLDING = deposizione di materiale elastomerico su master che permette di realizzare pattern polimerici

3 riempimenti dello stampo:

- simple casting: deposizione - vuoto spinto - eccesso rimossa - forno x evaporare solvente
- tecnica MICROFLUIDICA DINAMICA: stampo su substrato - inserisco + vuoto - forno x capillarità
- SPIN-COATING: deposizione - spalmaggio x riempire i canali - rimozione eccesso e solvente

★ MICRO-REPLICA MOLDING

c'è un passaggio intermedio x invertire la geometria. dallo stampo in PDMS, si deposita materiale elastomerico sopra x ottenere il negativo del master. (pretrattamento chimico x separare gli stampi)

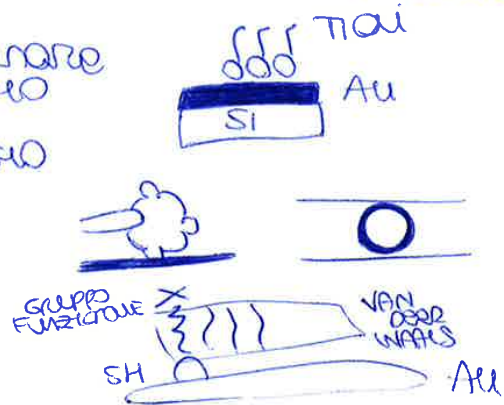
★ MICRO-CONTACT PRINTING

lo stampo è usato come timbro x stampare su un'opposta superficie.

- stampaggio su superficie piana
- stampo rotante x stampaggio su superficie grandi
- stampo piana x stampaggio su superficie non piana

si creano percorsi bidirezionali su cui coltivare le cellule

Resumo:



## ★ DIP-PEN NANOUTOGRAFIA (come l'imaging)

La punta piramidale di un microscopio a forza atomica (AFM) è rivestita con una pellicola di molecole di TIOU }  
 x avere una certa umidità si usa una piccola goccia SH  
 d'H<sub>2</sub>O che condensa tra la punta e il substrato d'oro così  
 i TIOU migrano sulla superficie e formano un monostato  
 autoassemblato

- si ottengono pattern a geometria ben nota
- anche substrati non piani ma nanostrutturati già

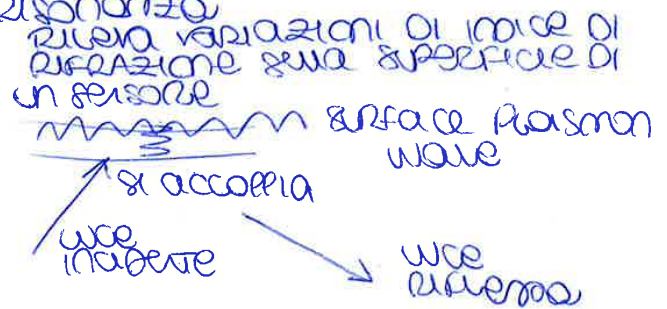
Pen array < passive  
 active

Tagua pattern dipende da  $\leftarrow$   $\frac{\text{condiz. ambiente}}{\text{umidità}}$

I TIOU possono legarsi a DNA funzionalizzato con acceammine

usata anche x screening oncologico: i peptidi sono marcati con anticorpi ≠ affini al marker tumorale presente on sua superficie

- punta con anticorpi e si funzionalizza la superficie
- punta con campione biologico: se ci sono TM interagiscono con gli anticorpi
- si rileva la superficie (profilo)
- rilevazione ottica → risonanza
- affinità molecolare



- creare pattern in cui si autoassemblano strati ≠ (PEG-1AN/fibronectina)  
 - RING MICRO PATTERNING

## ★ NANO FABBRICAZIONE BRIDA IN NATURA

si usano connettori biologici x fabbricare superfici di materiale inorganico  $\leftarrow$  proteine / anticorpi  
 acidi nucleici

• prima bisogna selezionare i peptidi che interagiscono con la materia inorganica =

- libreria di DNA
- inseriti in plasmidi di fagi/batteri
- producono DNA in proteine
- legano ≠ i substrati
- vedo il migliore e estraggo il DNA

• gli acidi nucleici possono funzionalizzare con ≠ forme i materiali

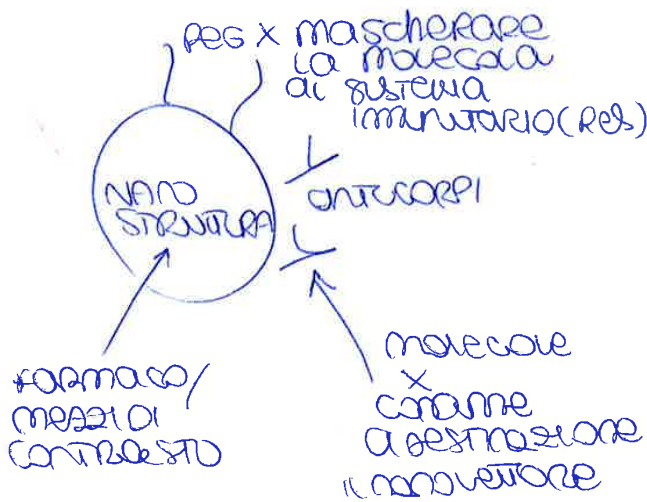
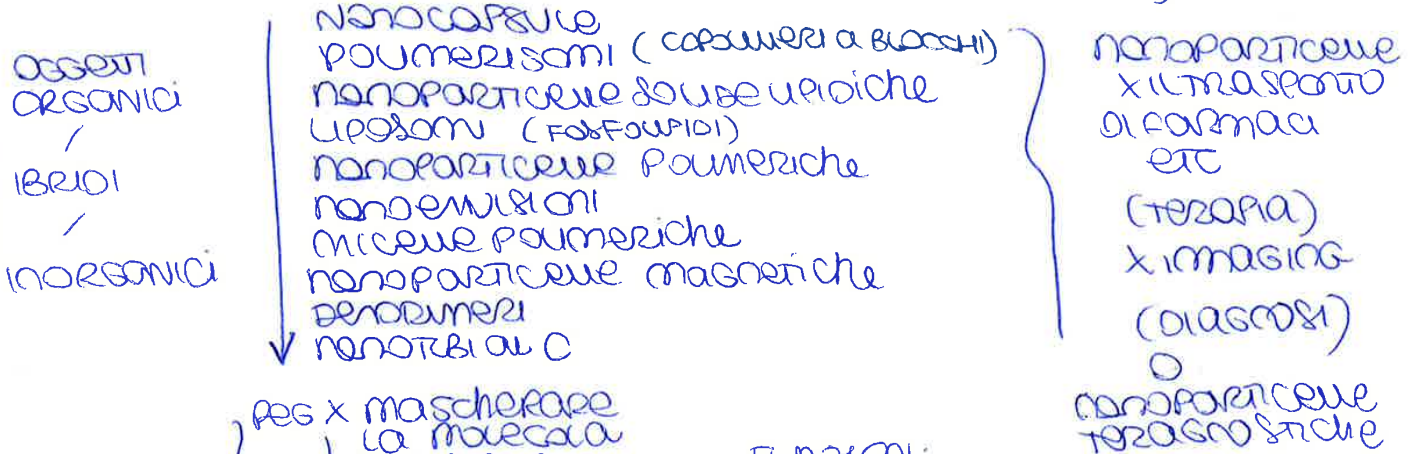


# CAPITOLO 4

## NANOMEDICINA x TERAPIA e DIAGNOSTICA

= sfruttamento di materiali nano-strutturati x terapia e diagnosi

• nanoscala : 1nm - 1000 nm ( anticorpi - virus )



FUNZIONI:

- DRUG SCREENING
- GENE DELIVERY
- DIAGNOSI
- DRUG DELIVERY
- IMAGING
- DIAGNOSI / MONITORAGGIO
- TERAPIA LOCALIZZATA

### ★ SVILUPPO DI UN FARMACO

Dalla scoperta di una molecola → solo poche diventano, dopo la formulazione, un farmaco attivo, secondo la

### REGOLA DEL 5 DI LIPINSKI

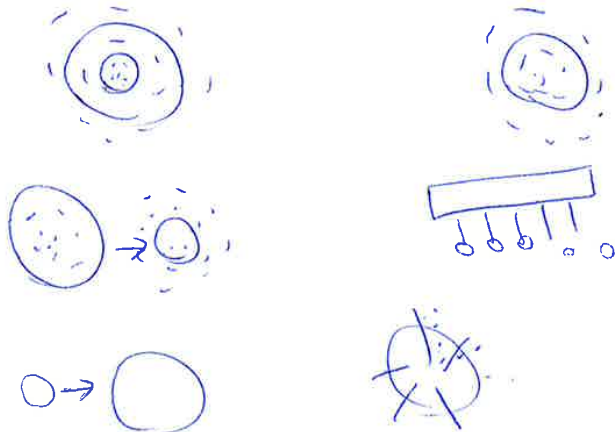
x determinare se una molecola ha le giuste proprietà  
x diventare farmaco

- 1) max 5 atomi di N o O protonati (donatori)
- 2) max 10 atomi di N o O non protonati (accettori)
- 3) PM < 500 Da
- 4) coefficiente di partizione in miscela etanolo/H<sub>2</sub>O < 5

→ queste difficoltà possono essere superate con le nanotecnologie

cioè grazie alle nanotecnologie molti farmaci senza le giuste proprietà possono essere recuperati

IL RILASCIO DEL FARMACO AVVIENE SOLTANTAMENTE X DIFFUSIONE, SEGUENDO LA LEGGE DI FICK, PERÒ SE  $\uparrow [F]$  ALL' ESTERNO, IL RILASCIO  $\downarrow$ .  
 PER OMMARE, SI DIFFONDE IN  $\neq$  MODI; CAMBIANDO IL MATERIALE



DIFFUSIONE  
 (IL MATERIALE NON AGISCE CON L' ESTERNO)

MATERIALE BIODEGRADABILE = DEGRADAZIONE PER ENZIMA (RILASCIO INTENSIVO)

RIGONFIAMENTO DI IDROGEL  
 assorbono  $H_2O$   
 $\uparrow$  LA MESH DEL POLIMERO  
 IL FARMACO DIFFONDE  
 ROTTURA DELLA MATTICE GRAZIE A SEGNALI ESTERNI

LA PRODUZIONE AVVIENE X

- POLIMERIZZAZIONE CON INCAPSULAMENTO DI FARMACO IN POLIMERO (DA MONOMERI)
- PRECIPITAZIONE DEL POLIMERO (GIÀ PREFORMATO)

A PARTIRE DA

- POLIACRILATI STABILI
- POLIAMMIDI
- PAL DEGRADABILE
- GELATINA NATURALE

### ★ PREPARAZIONE DI MICROSFERE

- $\uparrow [FARMACO]$
- STABILITÀ
- CONTROLLATA DISPERSIONE
- RILASCIO CONTROLLATO
- BUONA SINTERIA
- BIODEGRADABILITÀ
- SUSCETTIBILITÀ A MODIFICHE CHIMICHE

PROPRIETÀ

### ① EVAPORAZIONE LENTA DEL SOLVENTE

SOLUZIONE POLIMERICA = FARMACO DISSOLTO / SOSPESO / EMULSIONATO IN UNA SOLUZIONE DI POLIMERO + FARMACO

↓  
 EMULSIONE = EMULSIONE IN UNA SOLUZIONE ACQUOSA CON TENSIOATTIVO

↓  
 EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE ORGANICO (POLIMERO) + AGITAZIONE  
 MICROPARTICELLE

FARMACI IDROFILI → EMULSIONE SINGOLA O/W

FARMACI IDROFILI → Doppia emulsione w/o/w  
 SOLUZIONE ACQUOSA + FARMACO + IN POLIMERO + IN ACQUA

L'erosione avviene in 2 modi

- Di massa x polimeri idrofili (LOWTO PM O PEROVA DI MASSA)
- Di superficie x polimeri idrofobici

⚠ L'erosione dei tessuti esteri è caratterizzata dagli acidi (La massa si può degradare se si forma un ambiente interno a basso pH)

### ★ Preparazione nanovettori

Polymerizzazione di precipitazione

= si ↑ il solvente porogeno x impedire la formazione di un blocco solido e produrre direttamente microsferule di polimero

### ★ Preparazione nanoparticelle

2 approcci

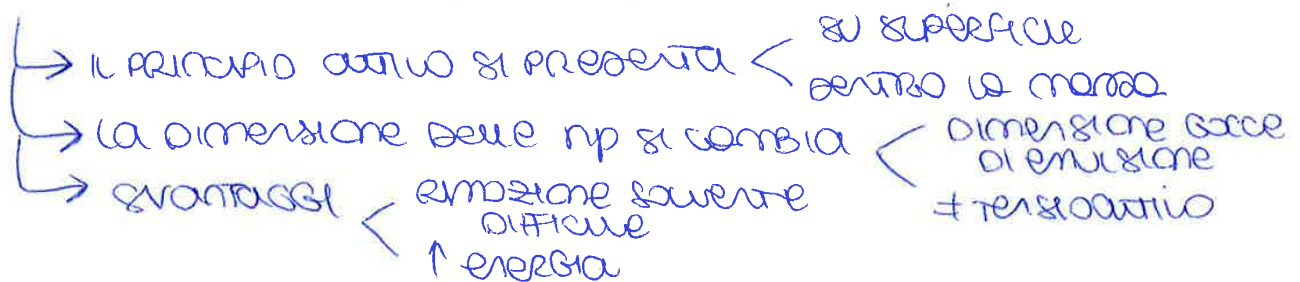
TOP DOWN = macinazione meccanica di materiale grezzo non si controlla bene la costruzione delle dimensioni

BOTTOM UP = ossidazione in un apparato solvente attraverso passaggi di precipitazione o condensazione o sintesi → diverso ruolo delle sostanze introdotte

⚠ è un problema utilizzare un solvente

### ① Emulsione - evaporazione (GLA, NST)

- 2 soluzioni immiscibili < farmaco + polimero in solvente fase acquosa + tensioattivo (emulsionante)
- si agitano assieme sotto forte agitazione così si forma l'emulsione
- si estrae il solvente dalla fase acquosa x avere la dispersione solida
- si raccolgono e lavano le sfere



### ② Emulsione - diffusione (PGA, PA, PL)

Come prima ma dopo aver formato l'emulsione si assume H<sub>2</sub>O x indurre la completa diffusione del solvente nella fase acquosa omogenea

Poi si rimuove il solvente x ottimizzare

I solventi sono accettati dal punto di vista tossicologico

→ SAUTING-OUT (VARIANTE)



# CAPITOLO 4

## NANOPARTICELLE PER DIAGNOSTICA

→ MATERIALI INORGANICI  
(ORGANICI USATI X TERAPIA)

- ANTI QUANTICI (quantum dots) → CONDUTTORI  
→ MAGNETICI
- NANOPART. METALLICHE
- MOLECULAR BEACONS
- NANOBARCODES (codici a barre)
- NANOSPHERE

RICHIESTE

- Chimica semplice
- Proprietà ottiche regolabili x ≠ risposte
- Segnale forte e specifico
- Biocompatibilità
- Multiple applicazioni
- Sono concetto di TARGETING x un rilascio controllato
- Passivo: azione del sistema immunitario e fegato / milza / midollo osseo
- Attivo: RIVESTIMENTI FUNZIONALI
  - ← TENSIOATTIVI
  - ← PEG
  - ← COPOLIMERI
  - ← OLIGOSACCARIDI
  - ← ANTICORPI

## ANTI QUANTICI

- CRISTALLI SEMICONDUCTORI DI NM
  - e<sup>-</sup> CONFINATI e con livelli energetici discreti
  - Si comportano come CROMOFORI ORGANICI = ASSORBONO ENERGIA e la RILASCIANO a ≠ λ, e ≠ energie che dipendono dalle DIMENSIONI della particella → ↓ Ø, ↑ ΔV TRA banda di conduzione e banda di valenza
  - Possono essere funzionalizzati
  - INTERNO MATERIALE x IMAGING
  - STRUTTURA
    - Core = nucleo ← colorato fluorescente magnetico
    - Core-shell ← STABILIZZO BIORICONSUMENTO RECEPTORE P. OTTICHE
- 1 PARTICELLA ≠ COLORI
- Sono di Se o S con Zn, Pb, Cd (Tossici)
- TOPO = TERAPIA
- + possibile parte esterna ORGANICA su cui si possono legare grazie a PEGU SPACER (LINKER = PEG, ...) che conferiscono DIREZIONALITÀ DEL USUO

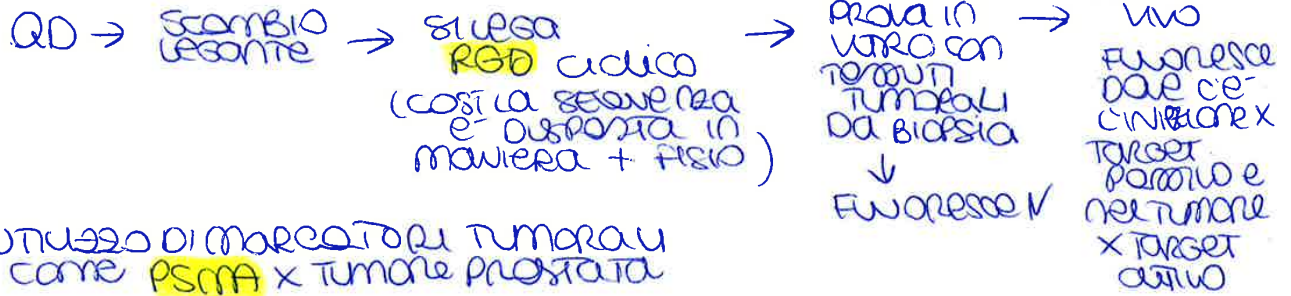
- TANTISSIME applicazioni
- SPACER di eccitazione dall'UV al IR
- ↑ Dimensione, ↑ Banda di valenza, ↓ GAP, ↓ energia del fotone  
↑ λ del fotone, → Rosso (viceversa al B/W)

## APPLICAZIONE:

### ★ TARGET DEL CANCRO

- Si legano ai QD sequenze di DNA associate alla malattia oppure

- si legano a specifiche sequenze peptidiche



- utilizzo di marcatori tumorali come PSMA x tumore prostata

(il targeting paraffino si vede se c'è PEG x EPR)

- si legano a specifici anticorpi

## FRET = FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER

Donatore fluoroforo emette radiazione se eccitato da un'onda luminosa esterna

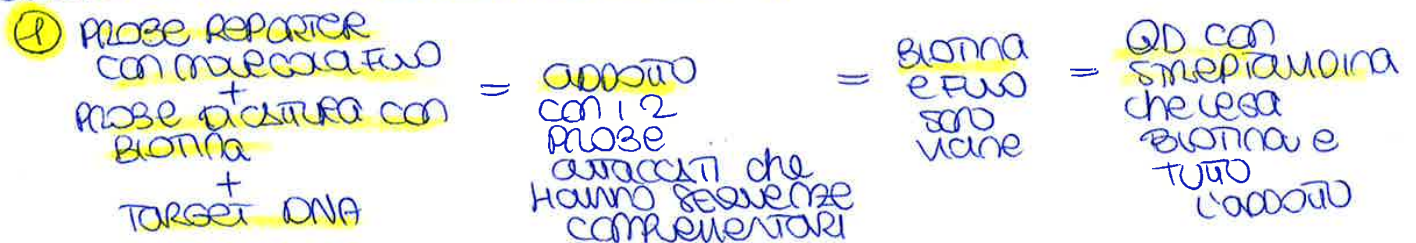
↓  
L'accettore assorbe la radiazione emessa, se si trova ad una distanza minore di 5 nm dal donatore

↓  
L'accettore riemette a sua volta a una  $\lambda \neq$ ,

per cui in base a  $\lambda$  si capisce la distanza tra i 2 gruppi

↓  
in casi particolari fa quenching e non emette, ma spegne

## APPLICAZIONI: RIVELAZIONE DI DNA TARGET



→ se si eccita QD il donatore QD riemette se c'è la clonina cioè il target DNA essa assorbe e riemette a  $\neq \lambda$

in più il sistema è flessibile

## TRIAL DI IMAGING = USPIO VS PET

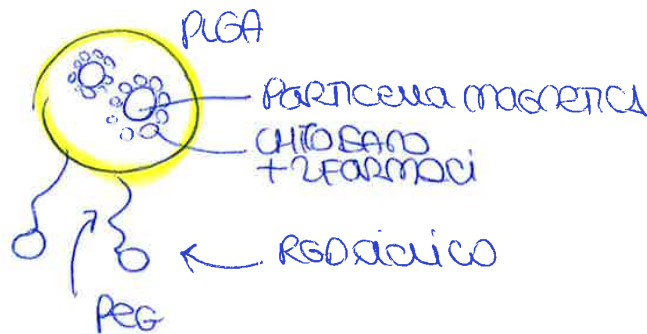
su 80 pazienti che dovevano essere sottoposti a intervento  
 L'MRI dimostra alcuni falsi negativi uniti con PET nella  
 individuazione del nodulo con metaliodi  
 non si spesse il magnetismo perché negli organi malati  
 non c'è sufficiente contrasto unificato

anche queste particelle possono essere funzionalizzate  
 per individuare selettivamente i siti specifici

- peptidi specifici
- anticorpi
- streptavidina
- PEG

e si incorporano anche  
 farmaci, cioè - sono  
 particelle caricate x  
 avere anche terapia  
 insieme all' imaging

esempio di combinazione targeting attivo + guida magnetica



si applica il  
 campo  
 magnetico  
 x condurre  
 la particella  
 nel tumore

100m x  
 particelle  
 ultrasuoni  
 che  
 consentono  
 del magn  
 e sono  
 sciolte  
 poi dal  
 campo  
 magnetico

=  
 membrana ultrasuoni  
 termoresistente

sono anche fatte entrare nel tumore e  
 poi fatte esplodere / o ruotare in modo  
 che attraversano le cellule tumorali

## NANOPARTICELLE D'AU

esistono molte tecniche per realizzare / anche usate x terapia  
 non è tossico, 10 nm

2 sintesi ← sintesi da forze gas  
 processi sol-gel = sale + riducente  
 soluzione di atomi metallici  
 poi si stabilizza il tutto con  
 tensioattivi ( composti organici)

generano molta energia se irradiate con luce visibile  
 ma è difficile far arrivare la luce al tumore perché il corpo  
 umano è opaco → si usa x melanomi / cancro alla pelle  
 già x diagnosi che x terapia fototermale (la rimozione avviene  
 poi x processo di aumento del tessuto epiteliale)

VANTAGGI: FORTE risposta  
 immune di photobleaching  
 luce polarizzata  
 cambiamenti di colore

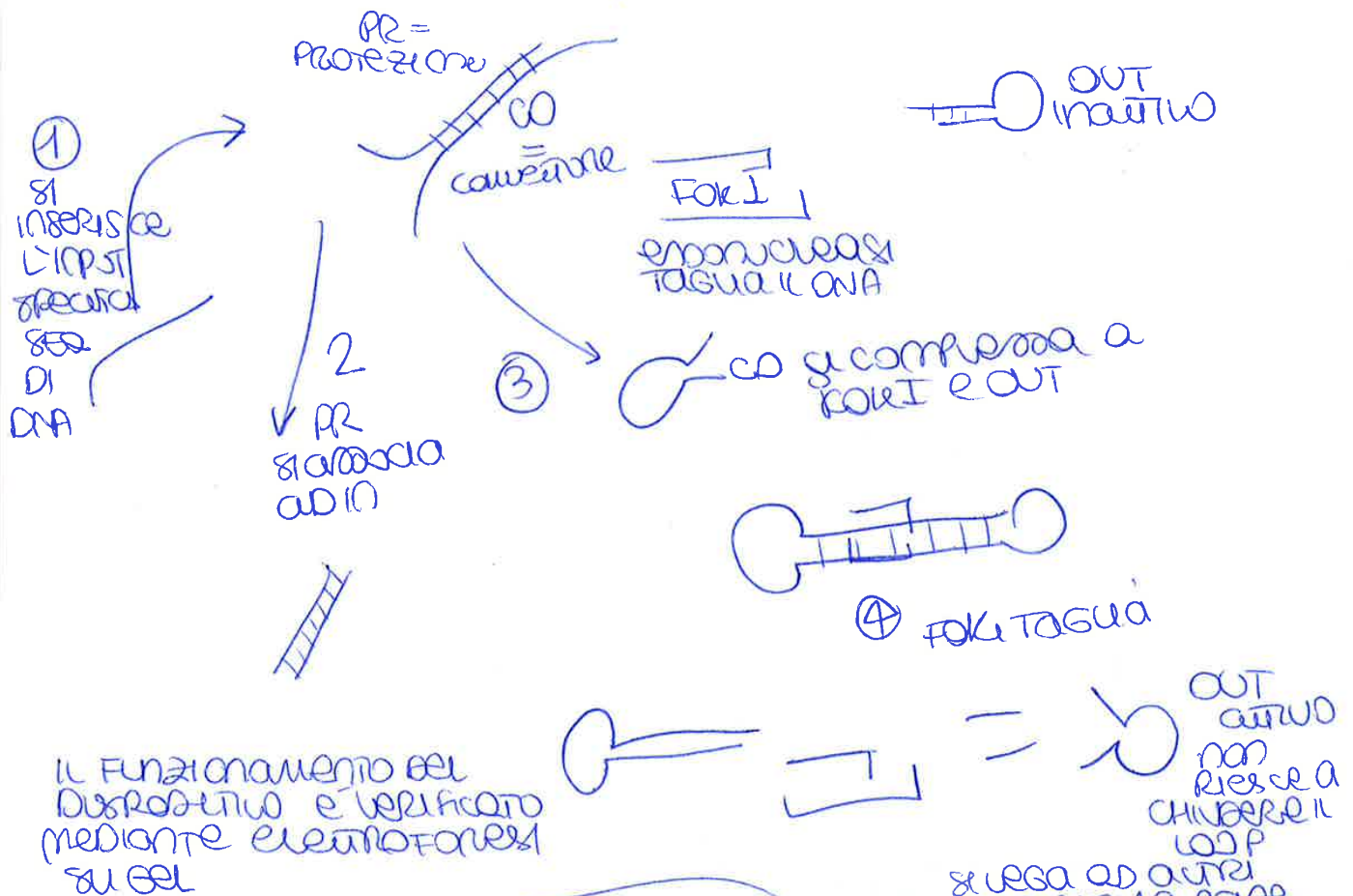
PROBLEMI: Dimensioni < QD  
 biocompatibili ma  
 non biodegradabili

## RLS DIFFRAZIONE DI RISONANZA DELLA LUCE

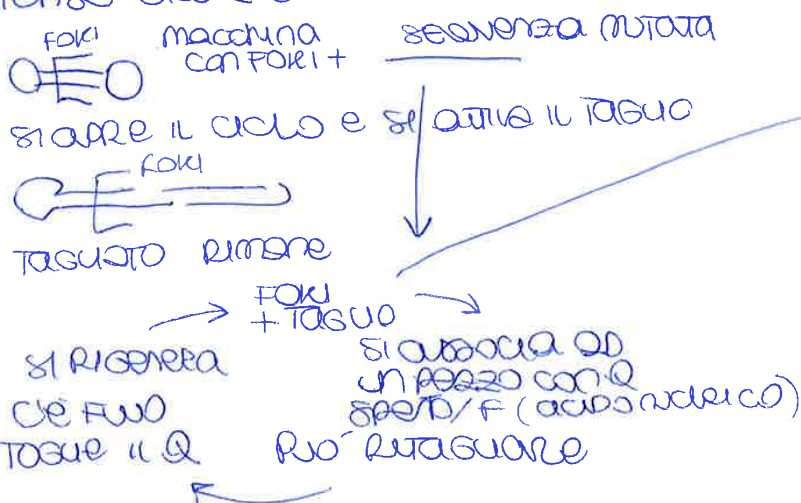
usa Au o Ag che diffondono luce bianca x generare luce  
 colorata monocromatica che appare con un'intensa FWD

## APPLICAZIONE IN SISTEMI DI RILEVAMENTO - TRASPORTO

SI REALIZZA UN'INTERAZIONE IN GRADO DI RILASCIARE UNA PROTEINA GRAZIE AD UN APTAMERO ( SEQUENZA DI DNA IN GRADO DI LEGARE SELETTIVAMENTE A PROTEINE ) = TRASUTTORE A DNA



USATI x RILEVARE SE NE MUTAZIONI E IN GRADO DI DARE UN SEGNALE MOLTO INTENSO GRAZIE AD UN CICLO REPLICANTE



alternativa aus PCR

ricorronce il carburante e lo TAGUA FORMANDO  $\text{Q} \text{ F} \text{ F}$  e un'altra macchina che riconosce di nuovo il carburante e RILASCIARE

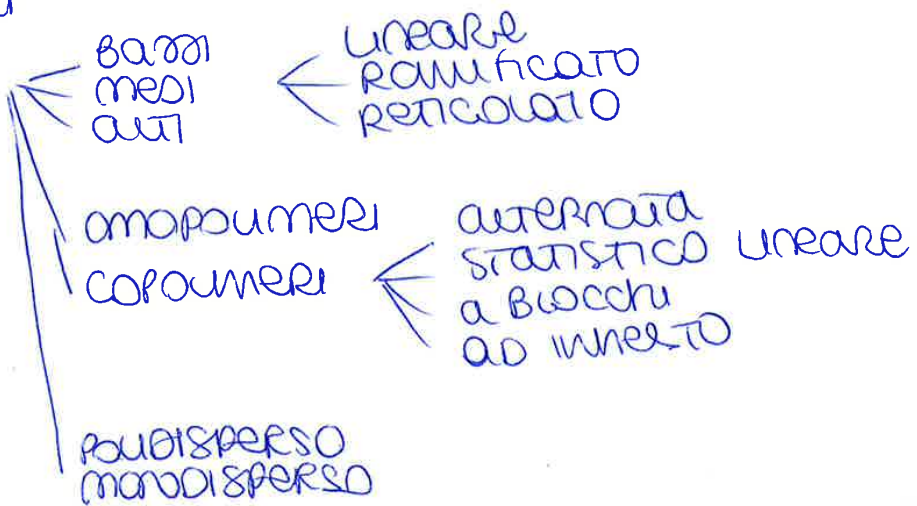
si rigenera continuamente l'entrata = istantanea e si forma il catalizzatore autoreplicante

SI RIESCE ANCHE A MISURARE e attraversando la rotura catalitica ciclica del carburante x creare il prodotto fluorescente



# POLIMERI

OLIGOMERI  
POLIMERI



$$\bar{M}_n = \frac{\sum w_i}{\sum \frac{w_i}{M_i}}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i}$$

$\bar{M}_0 = \text{Formula}$

$N \cdot M_0 = W$  — peso in g  
 $\bar{M}$  — peso molecolare  
 numero mol

$\alpha = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$   
 peso molecolare medio ponderale  
 peso molecolare medio numerale  
 GRADO DI POLIDISPERSITA'  
 $\alpha \rightarrow 1$

GRADO DI POLIMERIZZAZIONE MEDIO NUMERALE  $X_n = \frac{\bar{M}_n}{M_0}$

GRADO DI POLIMERIZZAZIONE MEDIO PONDERALE  $X_w = \frac{\bar{M}_w}{M_0}$

CONSTITUZIONE = successione  
 CONFORMAZIONE (3D) = rotazione atomi di C  
 CONFIGURAZIONE (3D) = GRUPPI LATERALI DEL C CHIRALE

estere  
 eucal  
 catena ripiegata  
 GOMITOLI STOCENDE  
 ISOTATTICI  
 SINDIOTATTICI  
 ATATTICI

\* TERMOPLASTICI  
 si trasforma il polimero in manufatto finale grazie al riscaldamento e si può ripetere questo procedimento in varie

\* RETICOLATI (AMORFI)  
 FORMAZIONE E RETICOLAZIONE INSIEME NON SI PUÒ PIÙ LAVORARE A CALDO DOPO LA FORMAZIONE XK SI BENEFITTI

AMORFI  $T_g$   
 SEMICRISTALLINI  $T_g - T_m$   
 VETROSO / AMORFO  
 VETROSO / CRIST / AMORFO / CRIST / FUSO

TERMOINDURENTI DA TERMOPLASTICI

\* ELASTOMERICI  
 TERMOPLASTICI (SOFT-HARD)  
 DEBOLMENTE RETICOLATI

# P. MECCANICHE



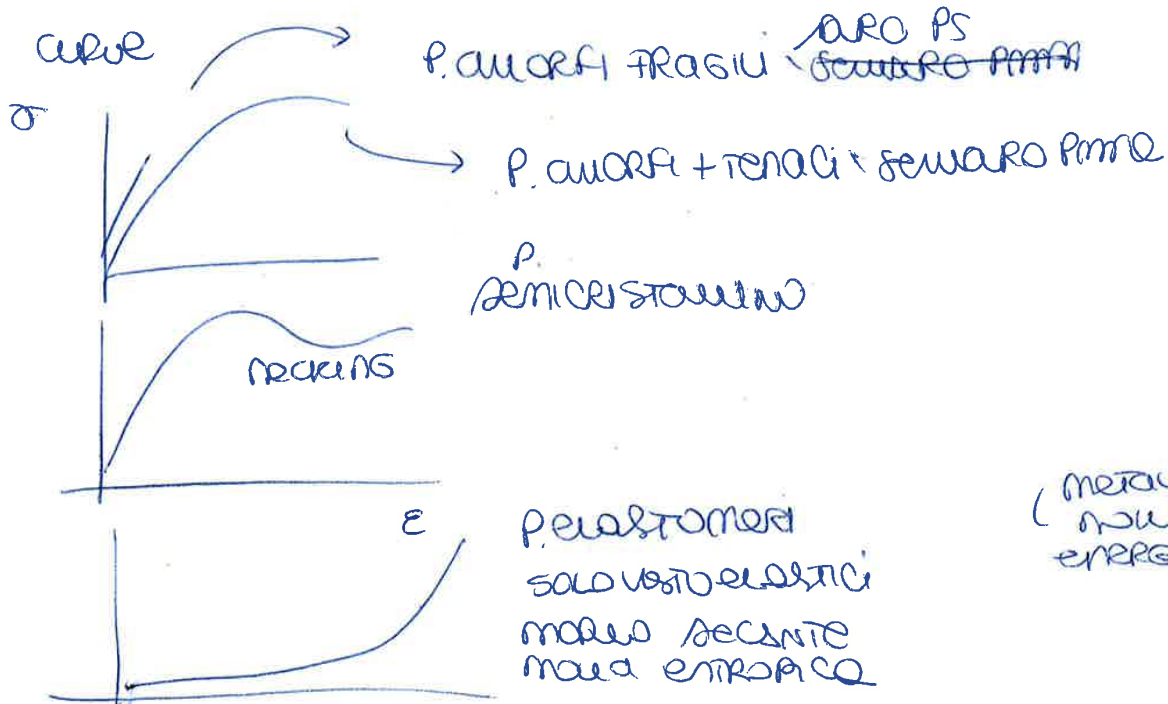
- Polimeri caratteristiche proporzionali a
- Velocità applicazione carico
  - T
  - morfologia
  - PM
- 

Polimeri con comportamento viscoelastico

$\sigma = \mu \frac{d\epsilon}{dt}$  (NEWTON)  $\uparrow T \downarrow V = \frac{d\epsilon}{dt}$   
 $\sigma = E\epsilon$  (HOOKE)  $\downarrow T \uparrow V$

$$E_T = E_I + E_{VW} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) + \frac{kt}{\eta}$$

el. v. elas
v. plasti



# CAPITOLO 2 Domande esame

## • DEFINIZIONE DI BIOMEMS ( BIOLOGICAL MICRO-ELECTRO-MECHANICAL SYSTEMS )

SISTEMI O DISPOSITIVI, REALIZZATI UTILIZZANDO TECNICHE ISPIRATE ALLA FABBRICAZIONE SU MICRO E NANO-Scala che sono usate per lavorazione, TRASPORTO, manipolazione, analisi o costruzione di entità chimiche o biologiche

## • DNA: STRUTTURA, REPLICAZIONE, FUSIONE

acido nucleico contenente le informazioni genetiche costituito da nucleotidi (zucchero - gruppo fosforico + base) = doppia catena antiparallela e orientata si replica grazie alla DNA polimerasi che si attacca ai primer ibridizzati ad una singola catena di DNA si denatura e fonde ad una  $T_m$  (50% ibridizzato al complementare) secondo un andamento a sigmoide

## • PCR = tecnica x replicare velocemente delle molecole

IL PRINCIPIO: ciclo di 3 fasi ripetuto + volte

- Denaturazione  $\uparrow T$
- Ibridazione dei primer  $\downarrow T$
- Sintesi

## • tecniche di separazione = elettroforesi su gel

usata x la separazione di biomolecole, convescono filtrazione x dimensione/peso molecolare grazie al gel e filtrazione x carica grazie ad un campo elettrico applicato = le molecole esposte alla ddp applicata ma 2 elettrodi si muovono in direzione dell'elettrodo di carica opposta

## • tecniche di rilevazione = IDENTIFICARE SEQUENZE DI DNA in miscele complesse

Southern blotting : rilevare DNA

Western blotting : rilevare proteine

Northern blotting : rilevare RNA


## • VARIANTI PCR

- Real-time : avviene la rilevazione mentre la reazione si sta svolgendo grazie al molecular beacon ed alla fluorescenza

• Biomems & Bionems (le molecole)

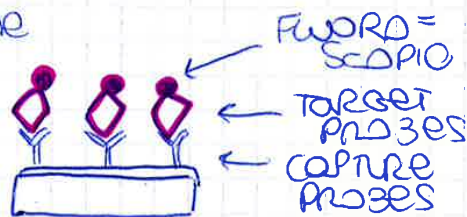
- la denaturazione del DNA in soluzione è accoppiata a fenomeni di ... **↑ assorbimento** nella diminuzione della viscosità della soluzione e aumento dell'arricchimento a 260nm
- per la preparazione di nanotubi di Si la tecnica più comune è ... la **creatura termindotta da vapori partendo da precursori solidi**
- la RT (Reverse-T) - PCR utilizza come substrato ... **il cDNA** ottenuto dalla trascrizione inversa dell' mRNA

• Biomems & Bionems (i dispositivi)

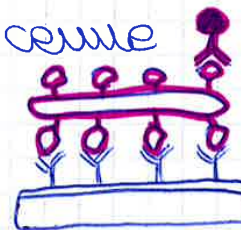
A partire da 

si completi con 2 disegni schematici, l'illustrazione del principio di rilevamento, sulla superficie di chip di

• Proteine



• cellule



L'analisi deve essere marcata

• Biomems & Bionems

- la **LCR** è una variante della PCR in cui lo scopo è amplificare il **probe** anziché il **TARGET-DNA** ✓
- il **WESTERN BLOTTING** è una tecnica che permette la identificazione di sequenze di DNA → **proteine** X
- il **WESTERN BLOTTING** utilizza **anticorpi** ✓
- la tecnica di **CVD** di sintesi di **NANOTUBI DI C** è una variante della tecnica ad arco elettrico per quanto riguarda la tecnica di vaporizzazione del carbonio X  
 non è una variante non parte da grafite non vaporizza il carbonio
- la resistenza meccanica alla trazione è dovuta alla forza dei legami **C-C** 70 in un nanotubo ✓
- la **tecnica elettrica** × la preparazione di **array** ✓ sfrutta l'ibridazione dei **capture probes** immobilizzati con **DNA target fluorescenti**

◦ SiNW

nanowires di silicio

- elementi automaticamente cristallini
- prodotti per
  - meccanismo VLS dove i costituenti in forma gassosa precipitano attraverso un catalizzatore usando Si di un substrato solido
  - crescita terminata da vapori partendo da precursori solidi.

◦ NCT

metodi di preparazione

arco elettrico vaporizzazione laser forno solare CVD	}	grafite sorgente gassosa
---	---	-----------------------------

proprietà di conduzione (vettore chirale) dipende dalla geometria

↑  
vettore chirale

ARMCHAIR → (n, n) → STRUTTI METALLICI  
 ZIGZAG → (n, m) → STRUTTI SEMICONDUCTORICI

= direzione di avvolgimento della grafite in rapporto all'asse del tubo

funzionalizzazione

◦ Definizione di Device Microfluidico e Utilità

◦ Microarrays

realizzazione elettrica

- si schematizza e si spiega la procedura sperimentale che permette di effettuare l'ibridazione genomica comparativa tra 2 popolazioni cellulari A e B x mezzo della tecnica del microarrays



2 popolazioni cellulari



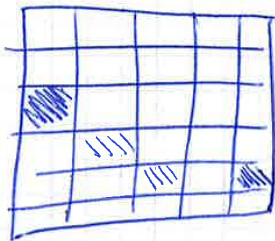
estrazione del mRNA e formazione di cDNA con trascrittasi inversa



marcatura del DNA



Deposizione del campione sul array  
ibridazione del DNA sul microarrays



Rilevazione di  $\neq$  intensità di fluorescenza emessa a seconda del fenomeno ibridizzato

L'immagine ottenuta mostra le sequenze ibridate

- singoli elementi di sequenze note di DNA posti a livello di uno specifico sito sulla superficie di un chip = CAPTURE PROBES
- Dispositivi che trasportano, erodano, combinano e/o separano fluidi a livello microscopico = MEMS MICROFLUIDICI
- tecnica x ottenere array in cui si irradia con la luce ad una determinata lunghezza d'onda una parte del substrato (tramite maschera) x de-proteggere in modo selettivo siti di legame su cui possono essere costruite a piacere sequenze nucleotidiche = TECNICA OTTICA
- I MWNT sono nanotubi formati da + SWNT concentrici. possono essere presenti nei LESAMI tra le varie pareti
- il modulo di Young di un NT può raggiungere i 4TPa e  $\sigma_s$  è circa 220GPa (100 volte + dell'acciaio)

## INTERAZIONI

- Cell-Cell:

cadherine (acina)  
integrine

- Cell-ECM:

integrine

segnali fino al  
Nucleo: TRAMITE  
CITOSCHELETRO o  
X CASCATTA ENZIMATICA

## Adesione e SPREADING cellulare: concetti di base dei meccanismi molecolari

Adesione:

- actina (cell)
- vinculina (cell)
- integrina <sup>TAUNA</sup> (cell)
- ECM (fibronectina) (LAMININA)

molecole di adesione

- cadherina
- immunoglobuline
- selectina
- integrine

attivazione PKC  
si associa alla  
membrana,  
fosforila MARCKS

meso substrati inaffini

SPREADING:

attivazione del  
CITOSCHELETRO e  
FORMAZIONE DI  
PROTRUSIONI

inattivazione PKC  
DEFOSFORILAZIONE  
DIPOLARIS che  
RITORNA ALLA  
MEMBRANA BASE  
CROSS-LINK  
L'ACTINA

## Cella - Biomateriale: concetti base

Sviluppo: BIOINERTI → BIOATTIVI e BIOCORROSI → SPECIFICA RISPOSTA BIOMIMETICI

STRATEGIE DI SUPERFICIE

approccio concettuale  
FUNZIONALIZZAZIONE (BWL/SUP)  
FUNZ con NANOTECNOLOGIE

▲ adesione proteina che cambia orient/ conformaz  
▲ effetto Vroman

● IL DOMINIO CITOPLASMATICO DELLE CADHERINE INTERAGISCE CON I FILAMENTI DI ACTINA DEL CITOSCHELETRO TRAMITE PROTEINE DI CONNESSIONE INTRACELLULARI ✓

● GLI ELEMENTI DEL CITOSCHELETRO ASSOCIATI AI CONTATTI FOCALI SONO I FILAMENTI DI ACTINA ✓

● LA LAMININA È CONTENUTA NEL CITOPLASMA

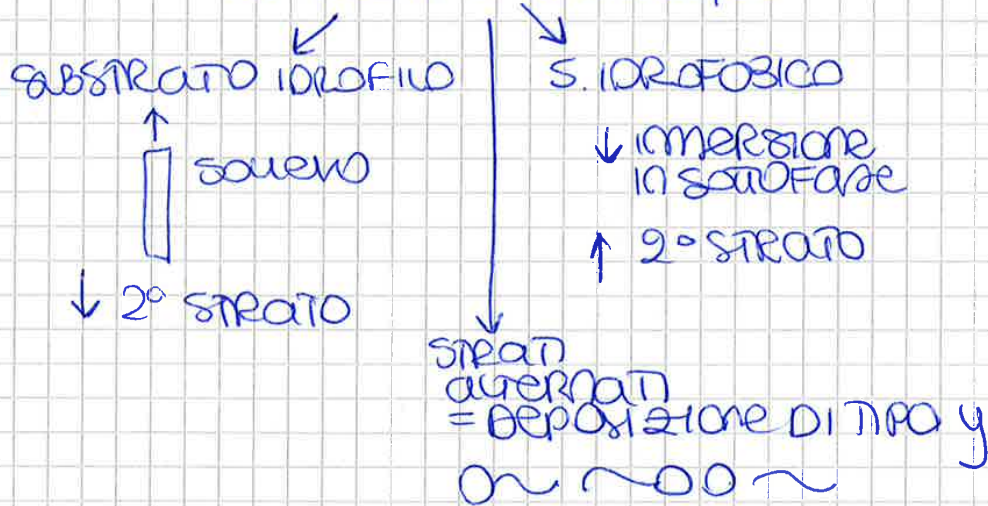
ECM

F

VANTAGGI: controllo spessore e architettura  
 Deposizione omogenea  
 multistrati (ma difficile)  
 tanti materiali

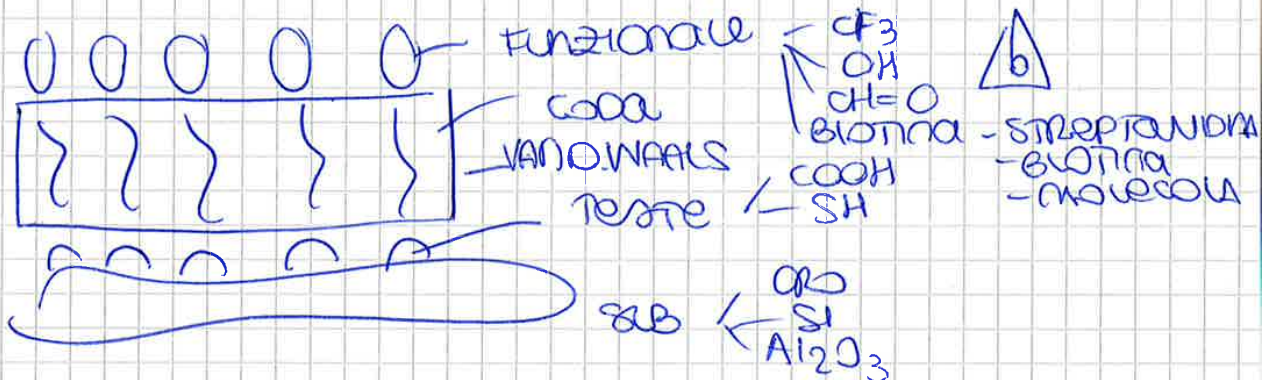
Svantaggi: strumenti costosi  
 Solo anfifiliche  
 ↑ t

Formazione: surfattanti disciolti in solvente volatile  
 posizionati su superficie  
 evapora solvente  
 Formazione monolayer



## 2) SAM

x deposizione di un film sottile su substrato solido  
 Au condizionale su oro = surfattante su opportuno sub



VANTAGGI: permettono l'immobilizzazione di  
 proteine e cellule

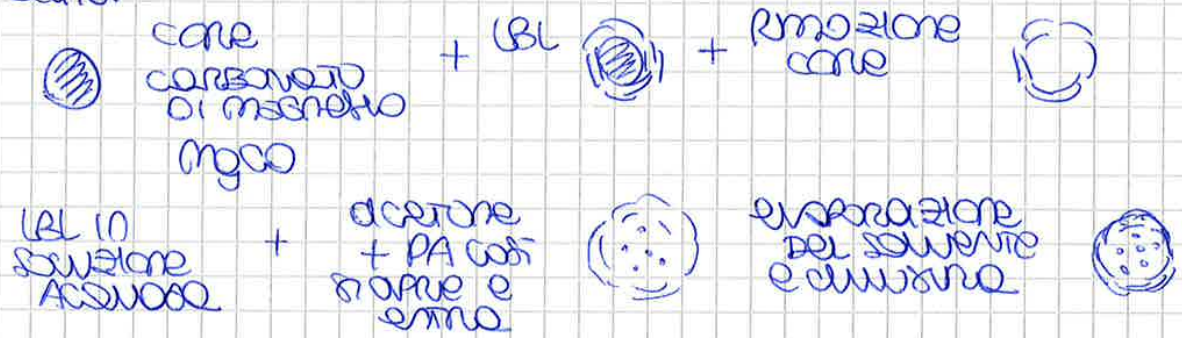
Svantaggi: monolayer  
 pochi substrati  
 poco stabili in condizioni fisiol.



• Strategie usate per ↑ l'idrofobicità

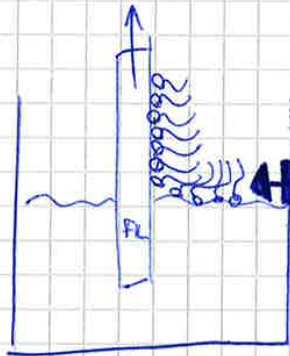
- LBL di polistirene solfato / gelatina
  - Film LB di Colagene
  - Rivestimento SAM di esadecanale  $\rightarrow$  SH
  - Rivestimento SAM con teste omiarilate
- $\text{CH}_3$   
 $\left\{ \begin{array}{l} \text{(FIL)} \\ \text{(FIL)} \\ \checkmark \text{(FIL)} \end{array} \right.$

• Descrivere la procedura di realizzazione di nano capsule mediante la tecnica LBL e il metodo di incapsulamento in eme di principi attivi

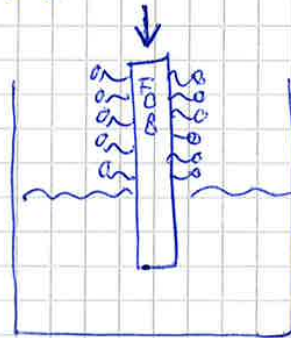


• Si schematizza con 2 disegni la deposizione LB su substrato idrofilico e idrofobico

1° strato estraendo



1° strato immergendo in sottofase

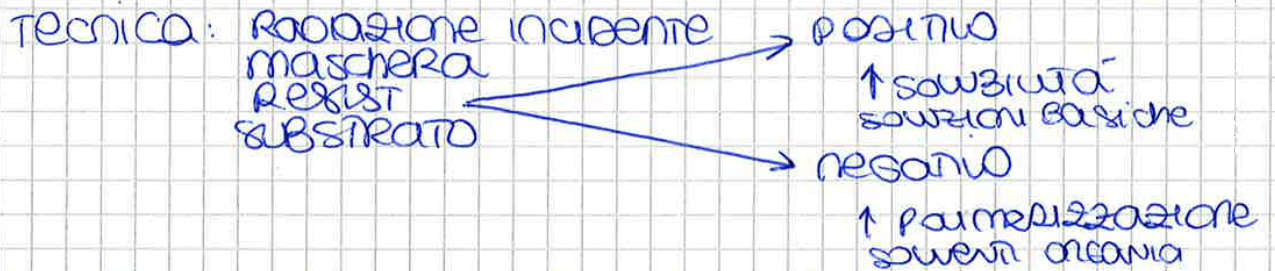


◦ TECNOLOGIE BOTTOM UP e TOP DOWN

- TD: le nanostrutture sono scolpite da un blocco di materiale 'BULK'  
(litografia / UTO SOFT / BALL MILLING / FIB / BULK MICRO)
- BU: le nanostrutture sono assemblate da nanoblocchi  
(COMPACTAZIONE POWERS, DEPOSITAZIONE CHIMICA, ASSEMBLAGGIO)

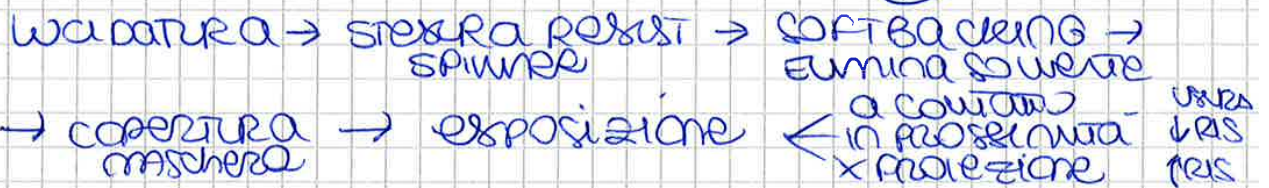
◦ TECNICHE LITOGRAFICHE e DERIVAZIONI

(ASPETTI TECNOLOGICI FONDAMENTALI MATERIALI, APPLICAZIONI, UNITI, RISOLUZIONE)



MATERIALI:  $SiO_2$ , Au, Al, Plastici

1) LITOGRAFIA TRADIZIONALE (RAGGI UV) (MAX 100nm)



→ SVILUPPO → COPRA O POST BACKING  
+ DEPOSITAZIONE O ETCHING

2) UTO E-BEAM a fascio di  $e^-$  (x ↑ RISOLUZIONI)  
RES 10 nm

lento, univazione spaziale

3) UGA = LITOGRAFIA A RAGGI X + EVAPORAZIONE P + STAMPO DI P  
RESIST IN PMMA, SUBSTRATO IN Si  
MASCHERA OPACA AI RAGGI X  
COSTA, ↑ t  
RESIST SPESSE > 1μm

Di Ni  
BAGNO  
X  
RESIST

DI P  
P  
RASSIA

## • TECNOLOGIE BOTTOM-UP - BUILDING BLOCKS + SOM

### 1) FIB

fascio di GAS composto da metallo-organici che sotto il raggio FIB perdono la parte volatile e si depositano (x il raggio rimuove i leganti) amoceri

### 2) DIP - pen nanofabbricai

punta di un microscopio a forza atomica (AFM) ricoperta di TIO<sub>2</sub> che migra sulla superficie di Au quando una goccia d'acqua condensa sulla punta

- anche x funzionalizzare zone non piane
- inchiostro con multiple-DNA
- penna marcata con anticorpi per campione si beve se interagisce con antigeni bloccati sul substrato grazie a ← superficie passiva  
DNA -  
AFFINITA' MOLECOLARE

### 3) Nanofabbricazione ibrida in natura (proteine e acidi nucleici)

prima selezione delle molecole che interagiscono col materiale inorganico vedendo come ≠ virus con specifici DNA interagiscono col substrato

#### • VIRUS ASSISTITA

- usati x crescita di nanocristalli o nanofili
- gabbie proteiche virali & knotate di acidi nucleici ed usate x la crescita di cristalli all'interno
- usati x costruire cristalli liquidi (in fase usata si organizzano in maniera ordinata)
- // ma fabbricati in films o fibre

le famiglie virali devono esprimere i peptidi specifici x la crescita dei cristalli

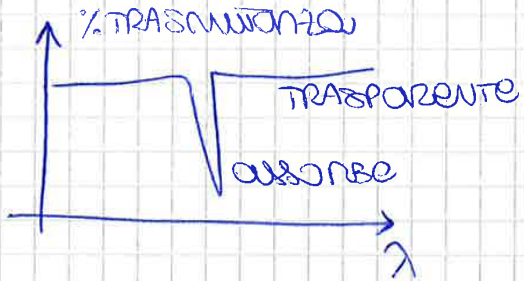
ans

#### • Proteina assistita

- si sfrutta il legame antigene-anticorpo
- Particelle inorganiche con anticorpi +
  - molecole connettori
  - antigene / antigene
  - antigene / ≠ antigene
- non si può togliere la proteina sendo - cristallo

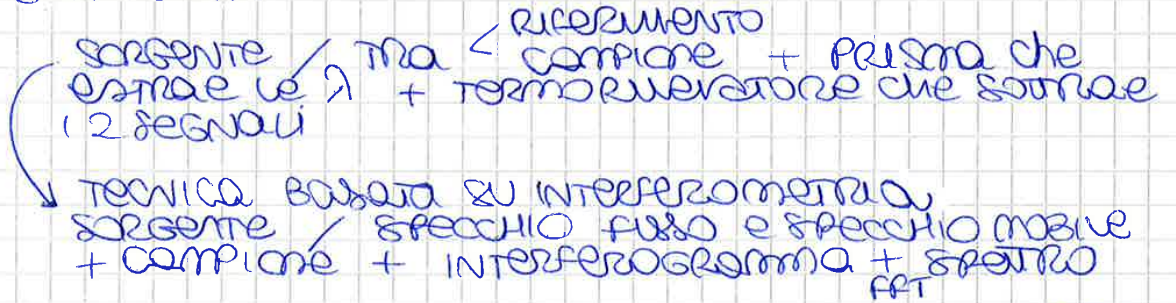
④ SPETTROSCOPIA IR (ASSORBIMENTO) (INFO MOLECOLARI)

- • IR • INFO SUI GRUPPI FUNZIONALI PRESENTI
- STUDIO LEGAMI CHIMICI / IDENTIFICAZIONE DI MATERIALI
- FOTONI ASSORBITI DA MOLECOLE → STATO VIBRAZIONALE ECCITATO

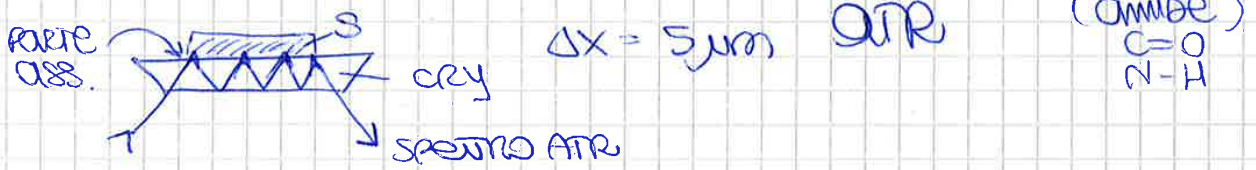


OGNI PICCO ≠ modo DI VIBRARE

- correlazione con tavole:  $\lambda \leftrightarrow$  GRUPPO FUNZIONALE
- DISPOSITIVO



- APPLICAZIONE ALL'ANALISI DELLE SUPERFICI (ad es. x servizio univ. di Pavia)
- TRASMISSIONE
- RIFLESSIONE SPECULARE (specchio)
- RIFLESSIONE DIFFUSA (Rugosa)
- ATR = RIFLESSIONE TOTALE ATTENUATA



- • MICROSCOPIA x DETERMINARE SOSTANZE E VISUALIZZARE LA DISTRIBUZIONE / OMOGENEITÀ MINICRISTALLI SU UNA PUNTA CHE SPAZZA IL CAMPIONE (INFO MORFOLOGICHE)
- • CHEMICAL IMAGING  
 Spettri + mappe di colore } Ostrazione chimica dei componenti omogeneità / dis  
 Spettro di ogni punto + correlazione + scala di colori + associazione alle mappe strettamente
- ANALISI DI FETI IN INDUSTRIA FARMACEUTICA  
 CARATTERIZZAZIONE RIVESTIMENTI STENT  
 X IL FARMACO DEVE ESSERE OMOGENEO

• EPXS spettroscopia Raggi X a sonda elettronica  
determinare composizione elementare

• SEM - EDXA  
micro + spettroscopia

### ③ Spettrometria di massa

identificazione sostanze sconosciute

campione  
ionizzazione → struttura chimica  
separazione massa/carica

≠ ionizzazioni

- impatto  
campione impatta con  $e^-$  ↓  
producendo miscela di ioni  
< 14eV → solo ioni X PM  
> 80eV → frammentazione X  
capire struttura molecolare

- DI campo (SOFT)  
X prodotti poco volatili,  
metodi sintonico e dottoelettrica  
↑ campo elettrico, poi lo  
ione si allontana

- chimica (SOFT)  
si ionizza X impatto con che  
forma ioni che usano il campione  
(BASIC) → ionizz. integra

- Plasma  
campione iniezione di plasma  
con Argon ad elevata pressione  
Migliore sensibilità

### • SIMS

caratterizz. di superfici

si bombardano il campione  
con ioni primari e si  
analizzano gli ioni secondari  
prodotti

tecnica distruttiva  
statico: teflon  
dinamico: acciaio ricoperto da Ti

≠ analizzatori  
rivelatori/separatore

- campo elettrico OSC  
SWEEPPOLO  
4 barre con correnti di  
segno opposto = CE FUEL +  
CE OSC → ioni si muovono  
con risonanze sinusoidali  
solo su con m attraversanti  
(X cambiare m, si cambia f)  
- campo magnetico statico  
esso cambia la traiettoria  
in un curva di raggio  $r_{HeV} = \frac{mv}{eB}$   
così  $m/e = \frac{132^2}{2V}$ , Herson statico,  
si varia V X dove ≠ m/e

- tempo di volo (TOF)  
la velocità usata dipende  
dalla massa  $v = \sqrt{2eV/m}$   
Data la lunghezza m  
dell'analizzatore, si ha un  
≠ TOF =  $k\sqrt{m/e}$  (5-20ns)

proteine e AN

• MALDI-TOF X molecole  
non volatili  
campione + matrice bombardati  
e il campione ionizza, poi si  
accelerano su ioni X studiare  
con TOF  
distribuzione PM medio  
 $\Delta m = \frac{PM_{max}}{PM_{medio}}$   
 $n = \frac{PM_{medio}}{\Delta m}$

# CAPITOLO 4

• RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI (elementi di progettazione di una nanoparticella a multi funz. x il rilascio di farmaco)

importanza, come si realizza, materiali, vettori, cenni sulla farmacocinetica

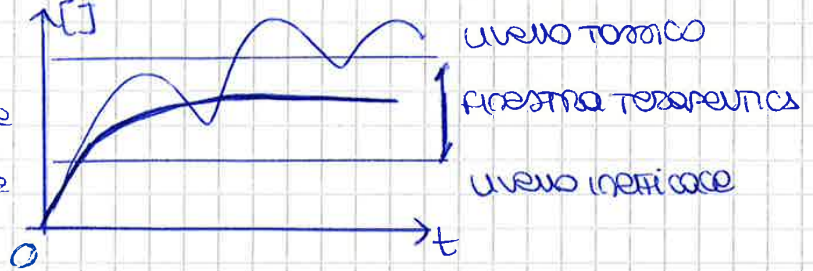
importanti x la tossicità, le dosi, il tempo di rilascio  
 riduzione della concentrazione del principio attivo  
 targeting specifico di tessuti e organi  
 rilascio controllato  
 stabilizzazione del principio attivo  
 controllo nello spazio e nel tempo

UNITÀ SU  
 EFFETTI INDESIDERABILI  
 RAZI MIRIAMO  
 OCCORRENZA DI AUTO  
 DEL FARMACO  
 NEL TESSUTO MALATO

## farmacocinetica

4 processi di base

- assorbimento → <sup>gato</sup> sangue
- distribuzione → cell
- metabolismo → attese
- escrezione → per urinare



VEVORI microcapsula (guscio)  
 microsfera (matrice)

MATERIAU polimeri { poliammid idrogeni uposomi  
 PDLA  
 gelatina

come polimerizzazione  
 precipitazione

per sfere: evaporazione lenta solvente  
 reticolazione in sospensione  
 coacervazione

per nanoparticelle: polimerizzazione di precipitazione  
 approccio top down: macinazione  
 approccio bottom up: precipitazione  
 emulsione - evaporazione  
 emulsione - diffusione  
 precip. x spostamento di solvente

per liposomi: multi → idratazione film sottile  
 idratazione in presenza del solvente  
 uni ← sonicazione  
 frammentazione x sforzo di taglio  
 ammissione di un detergente  
 evaporazione in fase inversa

Sequere l'ingrediente per

- 1) Limitare la captazione della nanoparticella da parte del RES
- 2) aumentare la fagocitosi mediata da recettore
- 3) ottenere un targeting attivo di una cellula tumorale
- 4) massimizzare il rilascio di farmaco all'interno della cellula
- 5) incapsulare un farmaco idrofobico
- 6) preparare una particella polimerosomale

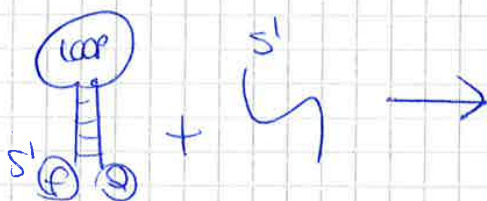
- x
- a) unkee biodegradabile "PH sensitive"
  - b) PEG
  - c) copolimero a blocchi
  - d) aptamero
  - e) liposoma
  - f) cell-penetrating peptide

4. Formule

competa

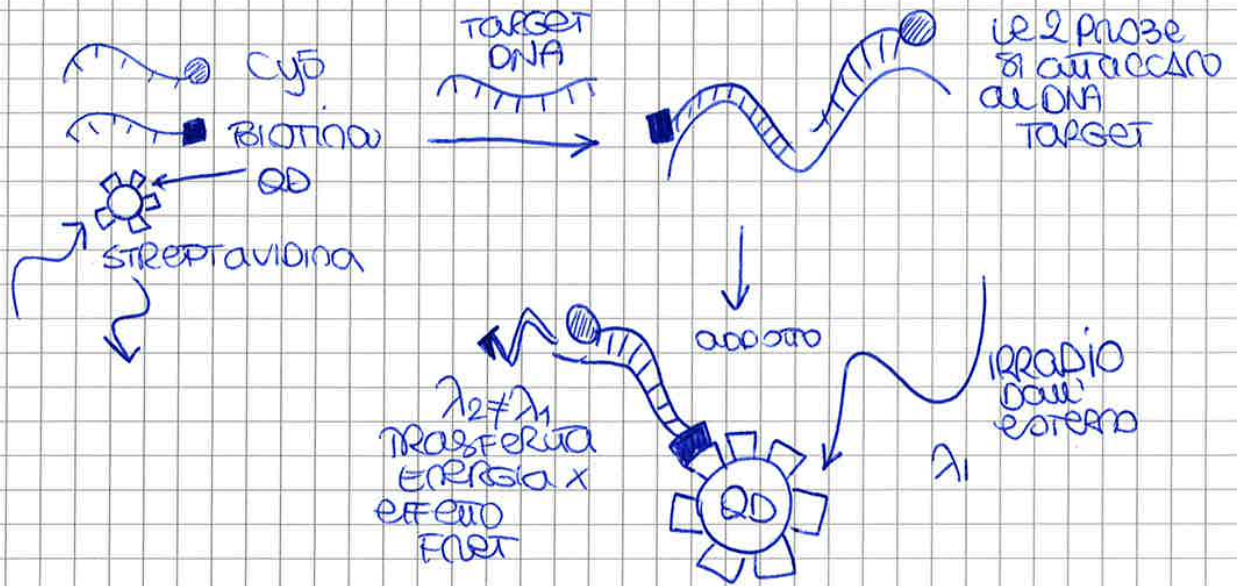
- 1) I QDs hanno ampi spettri di eccitazione da UV al rosso che possono essere regolati in dipendenza delle loro dimensioni e composizione
- 2) I metodi per la solubilizzazione e funzionalizzazione dei QD sono \_\_\_\_\_
- 3) I 3 principali vantaggi dei QD rispetto ai cromofori organici sono \_\_\_\_\_

definire i 2 nanosistemi in figura e completare con due altri il meccanismo di riconoscimento del target, quale dei 2 metodi e f vantaggio e xi?



## ESERCIZI

- ① completare lo schema che rappresenta un metodo per il rilevamento di una sequenza target di DNA sfruttando l'effetto FRET



Se il QD si forma e si ha il target } → emissione λ di fluorescenza X effetto FRET

antidoti } → emissione λ QD

- ② si associa unicamente la molecola o gruppo funzionale (numero) con la nanoparticella (lettera)

- 1 fosfolipide
- 2 folato
- 3 PEG
- 4 linker biodegradabile
- 5 Acido folico (o folato - co-sucosio)
- 6 Gruppo amminico

- a NP a controllo passivo
- b NA funzionalizzabile
- c NA x trasporto di farmaco idrofobico
- d ANTIBODY DRUG CONJUGATE
- e NP a controllo attivo
- f. LIPOSOMA

1f 2e 3a 4d 5c 6b

capsule

si lega il farmaco all'anticorpo non c'è la NP vesicle che viene degradata



Università di Torino - Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica - Compito 1 (2013)

**Bionanotecnologie 03KCBMV (6 CFU)**

Nome e Cognome: **LUCA CARNEVALI**

Matricola: **193415** e-mail:

**SCRIVERE UTILIZZANDO SOLO LO SPAZIO SUL FOGLIO**, eventuali fogli aggiuntivi non verranno considerati al fine della valutazione.

**PER L'AUTOVALUTAZIONE, OGNI DOMANDA VALE 3 PUNTI DIVISI EQUAMENTE NELLE SOTTODOMANDE. È necessario totalizzare almeno 1 punto nelle domande di Chimica Organica.**

**1. Chimica Organica**

**(a)** Si scriva la formula e si determini il numero di ossidazioni di ogni C per i seguenti composti: (a) etanolo (b) colchicina (c) etanolammina

NO

**(b)** Scrivere le formule di struttura dei seguenti composti:

a. benzaldeide b. 4-metilpentanale c. 3-metil-2-pentanone d. 2-butanale e. 4-metil-3-penten-2-one f. metilcobaltochetone

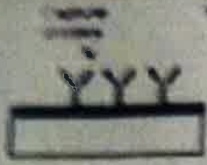
NO

**Biomems e BioNems (le molecole)** completare le seguenti affermazioni:

- La denaturazione del DNA in soluzione è accoppiata ai fenomeni di
- Per la preparazione di nanofili di silicio la tecnica più comune è
- La RT (reverse transcriptase)-PCR utilizza come substrato

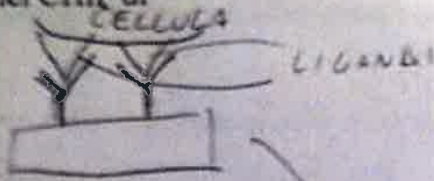
**Biomems e BioNems (i dispositivi):**

a partire da



si completi, con 2 disegni schematici, l'illustrazione del principio di rilevamento, sulla superficie del CHIP di

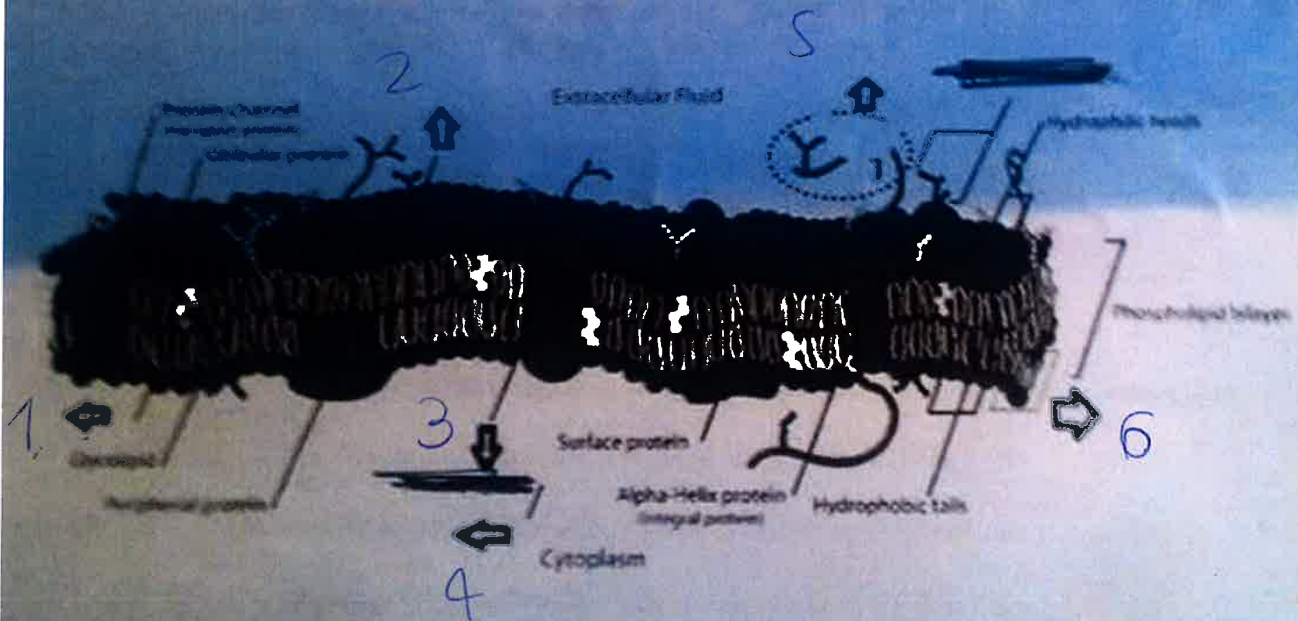
a) proteine



b) cellule

### Adesione Cellulare:

Si identificano nella figura sottostante gli elementi indicati dalle frecce (linee) relative a molecole coinvolte nella comunicazione ed adesione cellulare



5. Materiali Polimerici: indicare se la frase è vera o falsa. Per la frase falsa, scrivere la corrispondente vera (la negazione della frase non sarà accettata come risposta corretta).

- 1) Gli idrogel termosensibili sono a base di copolimeri anfifilici (vale a dire copolimeri che presentano segmenti idrofilici e idrofobici in catena).