



*centroappunti.it*

**CORSO LUIGI EINAUDI, 55/B - TORINO**

**Appunti universitari**

**Tesi di laurea**

**Cartoleria e cancelleria**

**Stampa file e fotocopie**

**Print on demand**

**Rilegature**

**NUMERO: 2469A**

**ANNO: 2020**

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

**STUDENTE: Niccolò Maggio**

**MATERIA: Bionanotecnologie - Teoria ed esercizi - Prof. G. 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.**

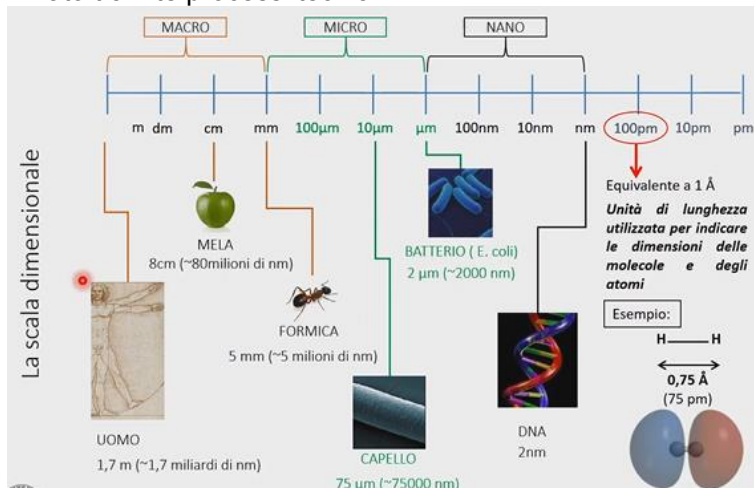
**ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.  
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.**

## BIONANOTECCNOLOGIE - INDICE

<i>Introduzione</i> .....	3
<i>Polimeri e materiali polimerici</i> .....	5
<i>Reazioni e processi di polimerizzazione</i> .....	12
<i>Proprietà meccaniche dei polimeri</i> .....	16
<i>Tecniche di micro e nanofabbricazione:</i>	
<i>Top down</i> .....	20
- <i>Tecniche litografiche</i>	
o <i>Litografia tradizionale</i> .....	20
o <i>Litografia raggi x</i> .....	29
o <i>Litografia a fascio di elettroni</i> .....	32
o <i>Litografia a fascio di ioni (fib)</i> .....	33
o <i>Focused ion beam chemical vapor deposition</i> .....	35
o <i>Nanoimprint lithography (nil)</i> .....	36
o <i>Soft lithography</i> .....	37
o <i>Scanning proximal probe lithography</i> .....	41
<i>Bottom up</i> .....	43
- <i>Scanning proximal probes lithography</i> .....	43
- <i>Nanolitografia dip-pen (dpn)</i> .....	44
- <i>Nanofabbricazione ibrida in natura</i> .....	46
- <i>Nanofabbricazione virus – assistita</i> .....	47
<i>Electrospinning</i> .....	51
<i>Nanostrutture di carbonio</i> .....	59
- <i>Fullerene</i> .....	59
- <i>Nanotubi di carbonio</i> .....	60
- <i>Grafene</i> .....	65
<i>Modifiche superficiali – adesione cellulare</i> .....	65
<i>Collagene</i> .....	66
<i>Elastina</i> .....	67
<i>Adesione cellulare</i> .....	67
<i>Meccanismi di adesione cellulare:</i>	
- <i>Interazioni cellule-ecm</i> .....	68
- <i>Interazioni cellula-superficie</i> .....	69
- <i>Interazioni biomateriale e tessuti</i> .....	73
<i>Sistemi biologici micro-elettromeccanici (biomems)</i> .....	77
- <i>Tecnica pcr</i> .....	77
- <i>Elettroforesi</i> .....	81
- <i>Southern blotting</i> .....	82
- <i>Tecnica lcr</i> .....	83
- <i>Biomems: metodi di rilevazione</i> .....	84
<i>Microarrays</i> .....	88
<i>Nanomedicina</i> .....	95
<i>Nanomedicina nel trattamento dei tumori</i> .....	96
<i>Nanoparticelle inorganiche per diagnosi e imaging</i> .....	97
- <i>Quantum dots</i> .....	97
- <i>Nanoparticelle metalliche-magnetiche</i> .....	105
- <i>Nanoparticelle metalliche-nanoparticelle d'oro</i> .....	108
- <i>Nanobarcodes</i> .....	111
<i>Nanoparticelle polimeriche</i> .....	113
- <i>Derivate da polimeri preformati sintetici</i> .....	113
- <i>Derivate da polimeri preformati naturali</i> .....	117
- <i>Derivate da particelle lipidiche</i> .....	118
- <i>Derivate da monomeri</i> .....	119

## BIONANOTECNOLOGIE

In generale, con **nanotecnologie** si intende la capacità di osservare, misurare e manipolare la materia su scala atomica e molecolare. In particolare, si fa riferimento al nanometro (nm) e quindi si fa riferimento a tutti i materiali e le strutture di dimensioni comprese tra 0,1 e 100 nm ottenuti in modo mirato tramite processi tecnici.



I termini **nanoscienze** e **nanotecnologie** indicano la capacità di studiare, assemblare, manipolare e caratterizzare la materia a livello di dimensioni compresi tra 100 e 1 nanometro. Ciò significa operare a livello molecolare dal momento che 1 nanometro (nm) è un milionesimo di millimetro e corrisponde all'incirca a 10 volte la grandezza dell'atomo dell'idrogeno. Le dimensioni di una piccola molecola sono intorno a 1 nm e quelle di una proteina a 10 nm.

Nanoscienze: costituiscono il punto di incontro di discipline diverse che vanno dalla fisica quantistica, alla chimica supramolecolare, dalla scienza dei materiali, alla biologia molecolare e rappresentano una realtà ormai affermata nel mondo della ricerca. Nanotecnologie: sono ancora nella fase iniziale del loro sviluppo e puntano a sfruttare e ad applicare i metodi delle nanoscienze per la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni a livello molecolare. In questo modo si ottengono prodotti con caratteristiche grandemente migliorate o del tutto nuove in quanto le proprietà e il comportamento non tradizionali della materia a livello nanometrico offrono l'opportunità per strutture e dispositivi che si operano in maniera radicalmente diversa rispetto a quelli con dimensioni macro.

Le nanotecnologie sono divise in due macro-famiglie:

- **Top-down:** Riduzione delle dimensioni con metodi fisici delle strutture verso livelli nano.
- **Bottom-up:** Partendo da piccoli componenti, normalmente molecole, si cerca di controllare/indirizzare l'assemblaggio utilizzandoli come "building blocks" per realizzare nanostrutture, sia di tipo inorganico che organico/biologico.

Un esempio di Top-down è il nanobicchiere fatto di carbonio con raggio dei nm, oppure FIB (Focused Ion Beam), tecnologia che usa il raggio ionico focalizzato in vari ambiti.

Altre nanotecnologie usate in natura sono per esempio l'effetto loto, capacità dei fiori di loto di mantenersi pulito autonomamente facendo scivolare le gocce d'acqua senza trattenerle.



I nanocompositi: sono materiali nei quali una delle due fasi ha almeno una sua dimensione che rientra nell'ordine di grandezza dei nanometri.

- Nanoparticelle che si comportano come nano-ossidanti artificiali che hanno proprietà autorigeneranti. Ripuliscono la cellula dai radicali liberi e diminuiscono lo stress ossidativo. Applicazioni per malattia degenerative e altre patologie. Sono biocompatibili e autorigeneranti e quindi basta una singola somministrazione per studiarne gli effetti.
- Substrati intelligenti che guidino la differenziazione delle cellule coltivate sugli stessi substrati.

## POLIMERI E MATERIALI POLIMERICI

I polimeri, dal greco letteralmente “molte parti”, sono sostanze organiche o inorganiche, naturali o sintetiche composte da un gran numero di unità ripetitive di identica natura chimica, dette, secondo la nomenclatura IUPAC, unità ripetenti costituzionali (CRU, Constitutional Repeating Unit) o più comunemente unità monomeriche, unite tra loro da legami chimici a formare strutture lineari, ramificate o reticolate.

Il fatto che ci sia varietà nella struttura chimica dei polimeri, permette loro svariati settori applicativi.

I polimeri – naturali e sintetici – sono costituiti da molecole di grosse dimensioni (“macromolecole”), formate da numerosissime unità strutturali, tra loro concatenate e da uno stretto numero di gruppi terminali, limitanti il concatenamento:

**ABBA**

**A:** gruppo terminale

**B:** unità strutturale (monomero)

Le unità B sono legate tra loro e alle unità terminali da legami covalenti (spesso C-C). La maggiore parte dei polimeri è di natura organica; pochi sono inorganici; esistono anche polimeri di natura mista, detti anche ibridi.

In funzione della lunghezza della catena posso definire:

**POLIMERI:** macromolecole ad altissimo peso molecolare (alto grado di polimerizzazione).

**OLIGOMERI:** macromolecole con peso molecolare relativamente grande ma molto inferiore al caso precedente (basso grado di polimerizzazione) (<10 unità strutturali)

Ulteriormente i polimeri si dividono in:

- 1) BASSI POLIMERI (10-100 unità strutturali)
- 2) MEDI POLIMERI (100-1000 unità strutturali)
- 3) ALTI POLIMERI (>1000 unità strutturali)

In base ai monomeri utilizzati si dividono in:

1) **OMOPOLIMERI:** ottenuti per polimerizzazione di un unico monomero:

-BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB-

2) **COPOLIMERI:** ottenuti per polimerizzazione, generalmente simultanea, di due o più monomeri differenti, che produce molecole con composizione mista.

-BBBBAAAAAAAAABBABBBAAAAAAAAABB-

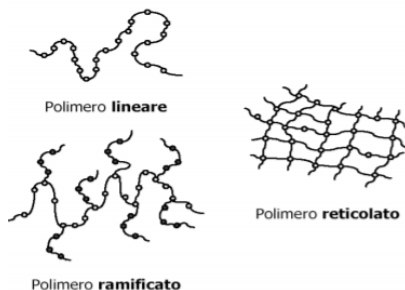
Nei copolimeri posso avere diverse configurazioni a seconda della distribuzione

Alternata: -ABABABAB-

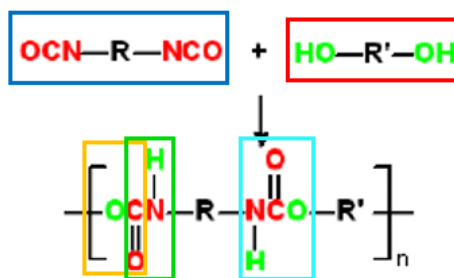
Statistico lineare o Random: se A e B sono casuali

A blocchi: del tipo -AAA-BB-A-BB (notare che il numero all'interno di ogni blocco può cambiare)

Ad innesto o Aggraffata (graft): se la catena principale è di un monomero e le ramificazioni di un altro monomero.



Di-isocianato (blu) e diolo (rosso) sono i due monomeri di partenza che reagiscono fra loro con un legame detto uretanico (azzurro) (-NH-(CO)-O-). Il legame uretanico è un misto tra il legame estere (arancione) e il legame ammidico (verde).

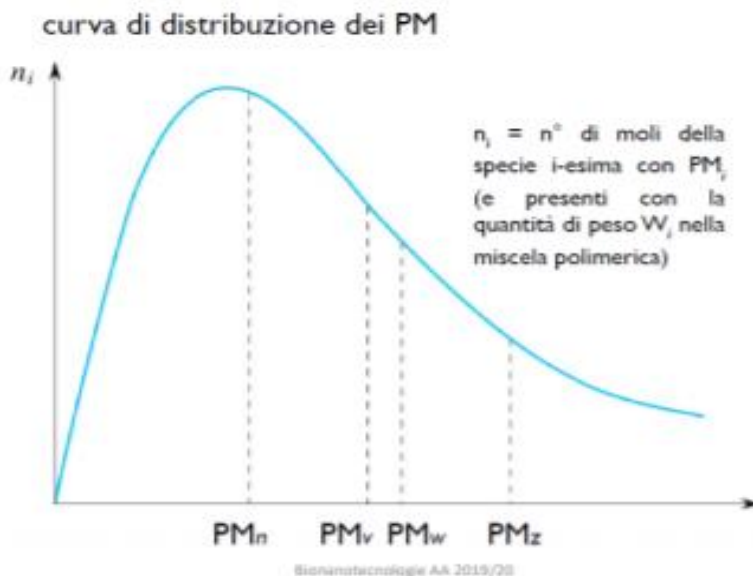


La variabilità degli atomi che ci sono all'interno di questi legami può far variare le proprietà.

Per quanto riguarda la dimensione delle macromolecole, un polimero è definito POLIDISPERSO, se la grandezza delle molecole non è unitaria, è sempre differente.

Si definisce invece MONODISPERSO un polimero teorico costituito da molecole di uguale grandezza.

Un polimero è caratterizzato da una distribuzione dei suoi pesi molecolari, come si può osservare nel grafico seguente:



### PESO MOLECOLARE MEDIO

- **PESO MOLECOLARE MEDIO NUMERALE ( $M_n$ ):** media ponderata rispetto al numero delle moli

$$\langle M \rangle_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum w_i}{\sum \frac{w_i}{M_i}} = \overline{M}_n$$

- **PESO MOLECOLARE MEDIO PONDERALE ( $M_w$ ):** media rispetto alla quantità in peso delle specie

$$\langle M \rangle_w = \frac{\sum N_i \cdot M_i^2}{\sum N_i \cdot M_i} = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{\sum w_i} = \overline{M}_w$$

Il peso molecolare medio numerale è la media rispetto il numero di moli. Per ciascun punto, l'ascissa per ordinata, divisa il numero di ascisse.

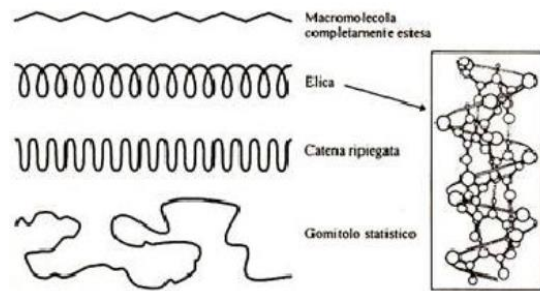
Il peso molecolare medio ponderale serve a dare un indice di polidispersità, di quanto è schiacciata/allargata la curva, quanto differiscono tra loro le catene polimeriche all'interno del campione (grammi/moli).

## STRUTTURA DEI POLIMERI

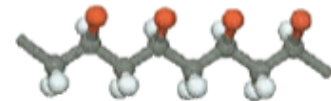
Individuiamo 3 aspetti strutturali principali dei polimeri:

1. Costituzione: successione degli atomi o legami di una macromolecola. Come gli atomi sono legati tra loro nella catena polimerica.
2. Conformazione (3D): disposizione delle diverse categorie macromolecolari per rotazioni lungo gli assi del legame singolo covalente.
3. Configurazione (3D): disposizione nello spazio dei gruppi laterali. (i legami sono fissi, non possono ruotare).

La conformazione indica la disposizione che possono assumere le diverse catene macromolecolari per rotazione lungo gli assi del singolo legame covalente.



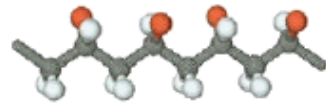
La configurazione indica la disposizione spaziale di atomi o gruppi molecolari laterali legati ad atomi di carbonio, ovvero alla catena primaria. Per osservare la configurazione del polimero ipotizzo di "congelare" il polimero nella conformazione estesa. Si possono individuare così tre possibili configurazioni



Polimero isotattico

1) Isotattica: quando un polimero - nella conformazione zig-zag - se visualizzato lungo i legami della catena principale, presenta i sostituenti nello stesso ordine sterico (dalla stessa parte).

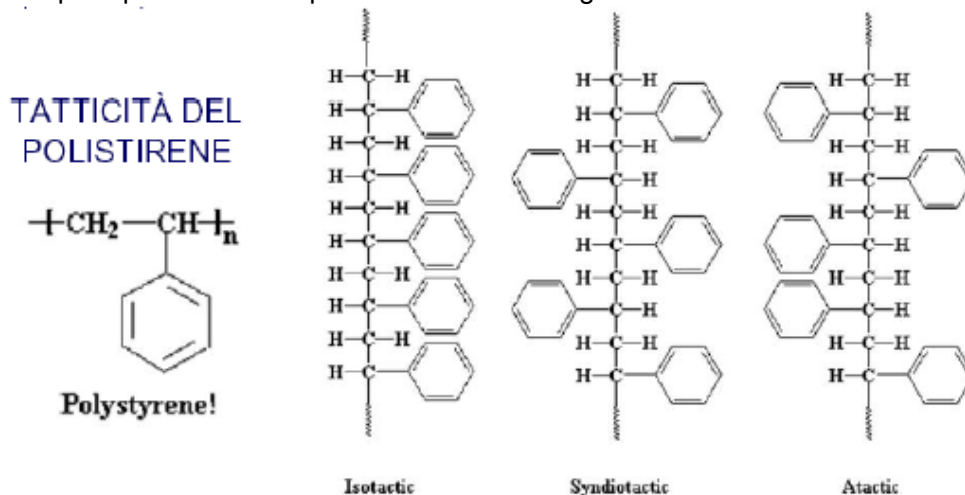
2) Sindiotattica: i sostituenti presentano un arrangiamento alternato (dietro, avanti)



Polimero sindiotattico

3) Atattica: la stereochimica è random

Ne è un esempio il polistirene che può esistere in 3 configurazioni differenti:



Le due temperature dipendono dalla struttura molecolare del polimero. Di seguito le caratteristiche che aumentano o diminuiscono la temperatura di transizione vetrosa Tg:

Cresce con:

- Presenza di gruppi pendenti ingombranti
- Presenza di gruppi rigidi in catena come 1,4-fenilene
- Simmetria di catena
- Gruppi polari
- Cross-linking (reticolazioni)

Decresce con:

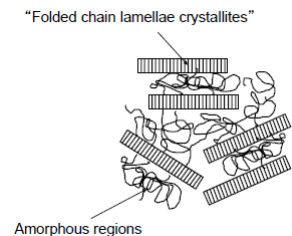
- Presenza di additivi (plasticizzanti), sostanze a basso peso molecolare
- Presenza di gruppi pendenti flessibili legati alla catena principale
- Gruppi non polari
- Dissimmetria delle strutture

In generale, per i polimeri termoplastici si può definire il **grado di cristallinità**, valore che è funzione della regolarità strutturale (termodinamica) e della flessibilità delle catene (cinetica). Esso cresce al diminuire della velocità di raffreddamento.

Polimero	Grado di cristallinità
PET	60%
PTFE	88%
Nylon-6,6	50%

(PTFE = TEFLON)

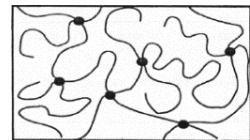
In immagine, le parti amorfe in forma random coil e le parti cristalline a catena ripiegata.



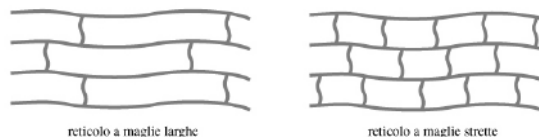
## POLIMERI RETICOLATI

Sono caratterizzati da legami primari (pallini neri in figura) tra catena e catena:

- Non sono termolabili
- Limitano gli scorrimenti viscosi
- Creano impedimenti nella mobilità dei segmenti di catena compresi tra i ponti di reticolazione
- Comportamento diverso a seconda della densità delle reticolazioni e della flessibilità delle catene comprese tra i ponti di reticolazione
- Sono amorfi, per via dei vincoli che impediscono la composizione cristallina e con Tg che può arrivare ad essere superiore alla T decomposizione nel caso di polimeri altamente reticolati e con aenti con gruppi ingombranti
- Stabilità di forma fino a T elevate: il limite termico di impiego è legato alla stabilità termica.
- Non sono solubili in solvente



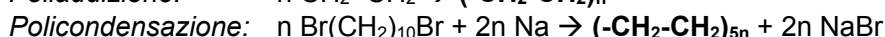
Possono avere reticoli a maglie larghe o maglie strette (quindi non un singolo punto, ma brevi catene)



1. I reticoli si possono ottenere a partire da monomeri che vengono fatti polimerizzare in uno stampo, ottenendo un polimero reticolato (**polimero termoindurente**). Esempi: resine fenolo-formaldeide, resine poliestere insature, resine epossidiche, etc.
2. Si possono ottenere da polimeri termoplastici dotati di gruppi laterali reattivi, utilizzando e aggiungendo un reagente per reticolare (detto **reticolante o crosslinker**). Questo tipo di processo si effettua ad esempio per aumentare la stabilità di polimeri naturali solubili in acqua ottenendo network insolubili.



Lo stesso polimero può essere ottenuto per reazione di poliaddizione e policondensazione, vediamo un esempio:



Malgrado l'equivalenza dei due polimeri da un punto di vista chimico, le proprietà sono diverse: ad es. il peso molecolare dei polimeri ottenuti con poliaddizione è maggiore.

Dato che il peso molecolare di un polimero dipende dal meccanismo della reazione che porta alla sua crescita o che la arrestano, è molto più appropriata una classificazione sulla base del meccanismo di reazione (detta anche classificazione di Flory).

Per quanto riguarda i processi di polimerizzazione secondo il meccanismo

### PROCESSI DI CRESCITA A STADI

Processo dovuto a reazioni casuali di due molecole che possono essere monomeri ( $n=1$ ), oligomeri ( $n$  piccolo) o polimeri, attraverso l'interazione e la reattività tra i gruppi funzionali, la cui reattività non dipende, praticamente, dal peso molecolare (assunzione di Flory).

Le catene polimeriche restano attive durante l'intero processo di polimerizzazione, quindi per tutto il tempo necessario a consumare completamente le specie monomeriche; Le reazioni di inizio e di propagazione avvengono con velocità confrontabili; La macromolecola si forma in un tempo relativamente lungo; Il grado di polimerizzazione aumenta nel tempo.

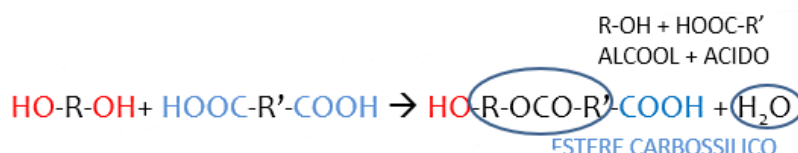


#### **Reazioni collaterali**

- Impurezza monofunzionali
- Formazione di composti ciclici dovuta a condensazione intra o intermolecolare dei gruppi funzionali reattivi

La polimerizzazione a stadi si realizza per condensazione intermolecolare o addizione di gruppi reattivi

#### **ESEMPIO: formazione di un dimero bifunzionale da due monomeri bifunzionali**



La reazione procede con formazione di trimeri, tetrameri, etc. attraverso reazioni che hanno la stessa velocità e meccanismo (esterificazione): formazione di una miscela di molecole reattive a vari pesi molecolari.

Nei processi di polimerizzazione a stadi devo avere per forza due gruppi funzionali complementari in grado di reagire tra loro. Tali monomeri possono essere bifunzionali o plurifunzionali:

- di tipo A-A (in realtà per esteso A-R-A e B-R'-B in cui A agisce solo con B e viceversa)
- di tipo A-B (in realtà del tipo A-R-B, in cui la funzionalità terminale A reagisce solo con la funzionalità terminale B e viceversa)

Nel caso di poliesteri: A gruppo acido B gruppo alcolico.

Tutte le molecole presenti nel mezzo di reazione, che siano monomeri, oligomeri, polimeri ecc. hanno la stessa probabilità di reagire durante l'intero processo di polimerizzazione.

In particolare, il meccanismo di crescita a catena si basa su 4 eventi principali:

**Meccanismo della polimerizzazione**

1. **Inizio:** generazione del sito attivo sul monomero
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

A seconda del sito attivo utilizzato nella crescita polimerica avrò

Tipo di polimerizzazione	Centro attivo
Anionica	Carbanione
Cationica	Carbocatione
Radicalica	Radicale

Qui ho stesse specie che subiscono reazioni diverse.

Idealmente il processo termina quando termina il monomero. In alcuni casi vi sono reazioni indesiderate che impediscano la terminazione o trasferimento.

Solitamente sono soggetti a polimerizzazione a catena i **monomeri insaturi**, che hanno un doppio legame ( $CH_2=CR_1R_2$  o  $CH_2=CHR$ ) (con 2 gruppi sostituenti  $R_1$  e  $R_2$  si parla di monomero vinilideno, con un solo gruppo R si parla di monomero vinilico).

La formazione di una specie attiva (radicale o ione) permette di aggiungere monomeri in sequenza rapidissima (frazioni di secondo)

Questo tipo di crescita richiede generalmente la presenza di un iniziatore per far partire la reazione (l'iniziatore può essere un composto chimico, o anche semplicemente l'azione di una radiazione o della temperatura)

Nel caso di  $CH_2=CHR$ , con R un sostituito del tipo:

1. Sostituito elettrodonatore (alcossi, fenil) → meccanismo cationico
2. Sostituenti accettori di elettroni ( $-CN$ ,  $-COOR$ ,  $-CONH_2$ ) → meccanismo anionico
3. Specie attiva stabilizzata per risonanza → meccanismo radicalico

**CONFRONTO TRA I DUE MECCANISMI A STADI E A CATENA**

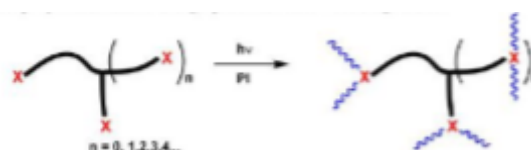
- Le reazioni a catena sono molto più veloci e il peso molecolare sale rapidamente; nelle reazioni a stadi il peso molecolare si mantiene basso fino ad una conversione prossima al 100% e cresce con il tempo di polimerizzazione.
- Nelle reazioni a catena all'inizio si possono avere catene già terminate e alla fine può rimanere del monomero che non ha reagito.
- Il peso molecolare dei polimeri ottenuti nel processo 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 indifferentemente; nelle reazioni a catena c'è una catena polimerica in crescita per attacco di una nuova unità monomerica.

**FOTOPOLIMERIZZAZIONE**

Fotopolimero: è una qualunque specie della famiglia dei polimeri che, se sottoposto ad interazione diretta o indiretta con la luce, altera o ne cambia le sue proprietà fisiche e chimiche.

Tipi di fotopolimeri:

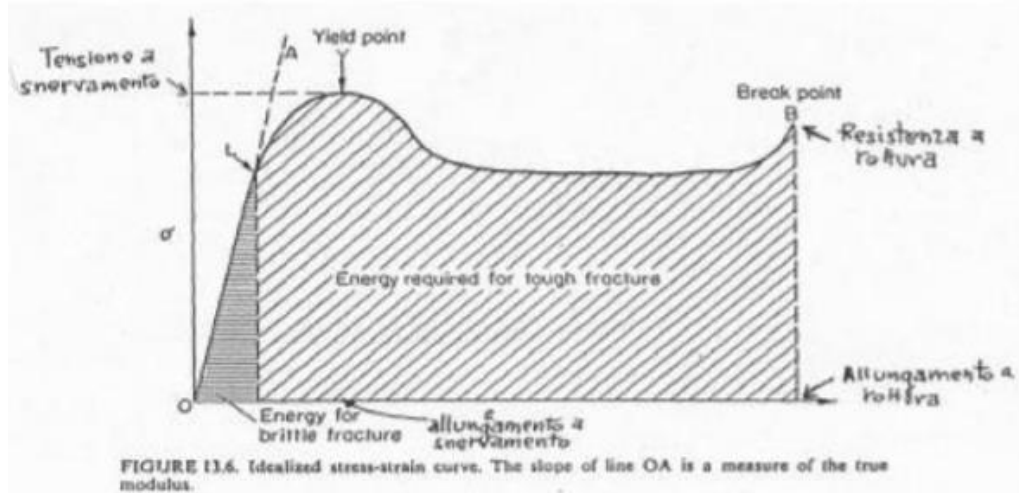
- Monomeri o oligomeri a basso peso molecolare con un gruppo terminale funzionale X, se irradiati, subiscono una polimerizzazione a catena (radicalica, cationica, ionica) e formano



Vi è una porzione iniziale in cui il materiale è *deformato elasticamente*, poi incomincia ad avere un certo ritardo nell'allungamento in funzione dello sforzo applicato, quindi ha un andamento *non lineare* fino ad un punto detto *punto di cedevolezza (Yield point)*. Da lì in poi la curva cambia e rimane praticamente costante fino ad arrivare al *punto di rottura (Break point)*.

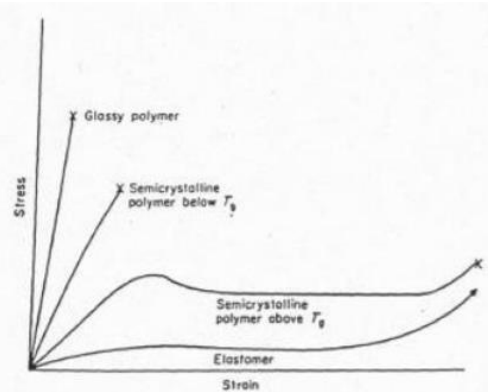
I punti tipici sono quindi: lo yield point e il break point.

Le aree sottese alla curva sono rispettivamente l'energia richiesta per la *frattura fragile* e per la *frattura tenace*.



In ascissa avrò l'allungamento percentuale  $\epsilon$  e in ordinata lo sforzo  $\sigma$ . Come si può notare all'inizio l'andamento risulta essere lineare, il che implica sforzo proporzionale all'allungamento (viene rispettata la **legge di Hooke**  $\sigma = E \cdot \epsilon$ ). A un certo punto si devia dalla linearità crescendo fino a raggiungere un picco detto Yield Point a cui corrisponde un valore di  $\sigma$  detto **tensione di snervamento** e un valore di  $\epsilon$  detto **allungamento a snervamento**. Oltre lo yield point il provino si deforma senza opporre molta resistenza fino al punto di rottura (break point).

Ovviamente queste curve cambiano al variare del polimero e al variare della temperatura, come si può vedere nella figura a lato. Ad esempio, per un materiale vetroso, se ci trovassimo al di sotto di  $T_g$ , questo si comporterebbe come un solido raggiungendo la frattura rapidamente senza quasi snervamento (glossy polymer); al di sopra di  $T_g$  invece, la parte amorfa scorrerebbe plasticamente e avrei snervamento. Lo stesso per i semicristallini, anch'esso sempre materiale rigido e fragile. Differentemente invece, gli elastomeri sono caratterizzati da curve sforzo-deformazione in cui a bassi sforzi si notano allungamenti elevati, caratteristica tipica di questi materiali. (Gli elastomeri hanno una memoria di forma dovuta ai punti di reticolazione).



In generale, le prove a trazione servono:

1. Nella progettazione di parti soggette a carichi brevi o intermittenti (differentemente dai metalli che vengono studiati generalmente per carichi a lungo termine);
2. Nella selezione dei materiali: permettono una stima della rigidità di un polimero rapportata a quella di altri.

## MODELLO DI DEFORMAZIONE DEI POLIMERI IN FUNZIONE DEL TEMPO DI APPLICAZIONE DEL CARICO

### Cenni: VISCOELASTICITA' DEI POLIMERI

Deviazione sia dalla Legge di Hooke sia dalla Legge di Newton:

1. La deformazione o velocità di deformazione possono non essere direttamente proporzionali allo sforzo
2. Lo sforzo può dipendere sia dalla deformazione che dalla velocità di deformazione (come pure da derivate superiori della deformazione rispetto al tempo): si parla di comportamento viscoelastico.

Nell'equazione si riporta la dipendenza dal tempo dell'allungamento totale che un provino può avere. La deformazione è data dalla somma di tre componenti:

- la deformazione elastica istantanea ( $\epsilon_I$ )
- deformazione viscoelastica che dipende dal tempo di applicazione  $t$  e dal tempo di ritardo  $\zeta$ .
- la parte che determina il comportamento viscoelastico che non risulta recuperabile.

$$\epsilon_T = \epsilon_I + \epsilon_{VE\infty} [1 - \exp(-t/\zeta)] + kt/\eta$$

Def viscoelastica, che dipende dal tempo di applicazione del carico  
(IN GENERE SIGNIFICATIVA A T PROSSIME O MAGGIORI DELLA  $T_g$ )

Def viscoplastica  
(PER ALTE TEMPERATURE ED ALTI TEMPI DI APPLICAZIONE DEL CARICO)

Def elastica istantanea

Ovviamente bisogna tenere conto di possibili semplificazioni. Se infatti analizzassimo gli elastomeri, allora il termine relativo alle deformazioni puramente elastiche  $\epsilon_I$  sarebbe trascurabile rispetto a quelle viscoelastiche. Inoltre, il termine viscoplastico sarebbe nullo, da cui si otterrebbe che:

$$\epsilon_T = \cancel{\epsilon_I} + \epsilon_{VE\infty} [1 - \exp(-t/\zeta)] + \cancel{kt/\eta}$$

### Prova di Creep

È una prova sulla cedevolezza del materiale. Si misura applicando un carico costante al provino e si osserva nel tempo la variazione dell'allungamento. Quello che osservo in genere è il seguente grafico:

- Regione a: deformazione elastica.
- Regione b: deformazione elastica ritardata o viscoelastica di tipo plastico fino al punto c.
- Regione c: a questo punto rimuovo lo stress/carico e quindi il mio materiale recupera subito il pezzo CD (che risulta essere uguale ad AO). E recupera tutto tranne  $c'$  che non viene recuperato.

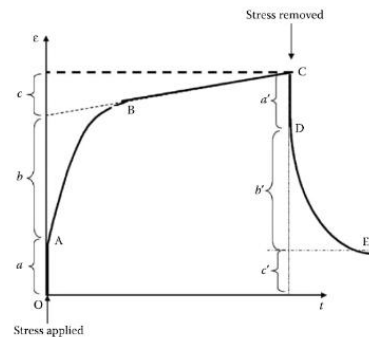
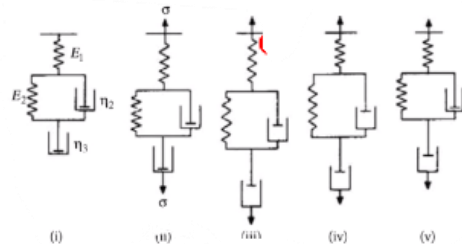
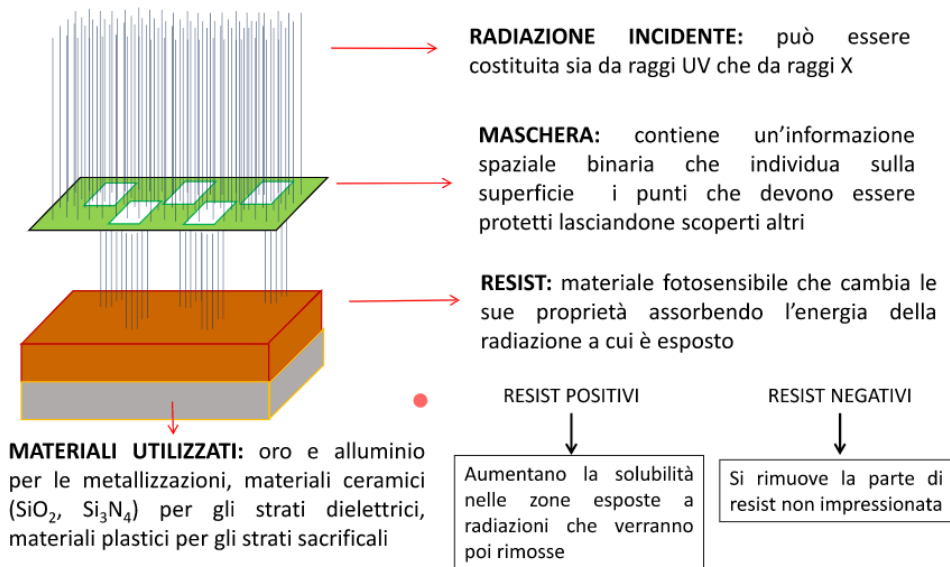


FIGURE 13.13 Schematic representation of a creep curve: a, initial elastic response; b, region of creep; c, irrecoverable viscous flow. This curve can be represented by the four-element model shown in Figure 13.14.

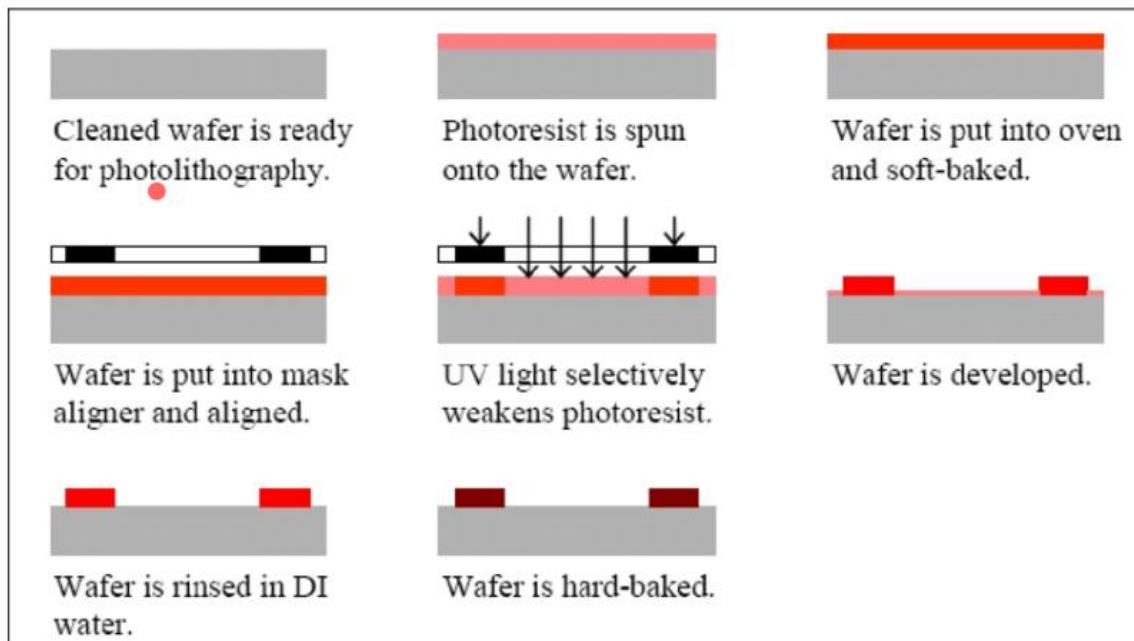
Facendo riferimento al modello con molle e smorzatori, quando applico  $\sigma$ :

- (i) Non ho allungamento. Nullo.
- (ii) passaggio da O ad A e l'inizio da A a B, dove ho l'immediato allungamento di  $E_1$  e invece ho un allungamento viscoelastico dovuto alla molla  $E_2$  ritardata dall'elemento  $\eta_2$ .
- (iii) Tutto allungato. Rimuovo lo sforzo.
- (iv) La molla  $E_1$  ritorna quindi sono nei tratti da C ad D.
- (v) Ritorna  $E_2$  e  $\eta_2$  (ritorno viscoelastico). Corrisponde al punto E.





Gli step completi del processo sono schematizzati di seguito e analizzati passo-passo successivamente:



**1. LUCIDATURA DEL WAFER DI SILICIO PER TOGLIERE IMPUREZZE SUPERFICIALI:**

La pulizia del wafer è un aspetto fondamentale per la riuscita del processo per togliere impurezze tipiche che riducono la qualità del prodotto finale, come ad esempio:

- Residui di solventi
- Macchie
- Polveri

La presenza di impurezze:

- Riduce l'adesione del resist
- Produce inclusioni nello strato di ossido
- Introduce difetti di forma
- Riduce la qualità del prodotto finale.

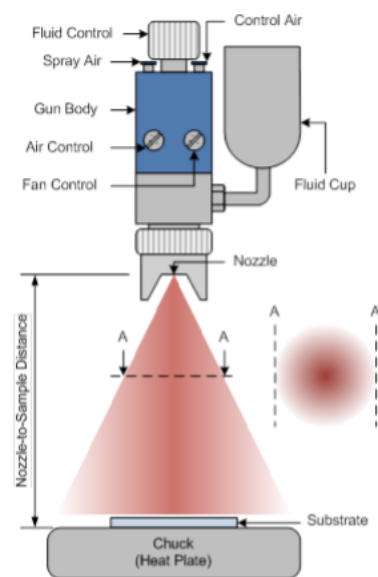
Per ridurre il rischio di contaminazioni, questi processi vengono eseguiti in camera bianca (clean room) in condizioni di temperatura, umidità, e pressione controllata.

- Tecnica veloce e facile da implementare (si usa spesso)
- Parametri che influiscono sullo spessore del resist sono quantità di resist da depositare, quantità e tipo di solvente, velocità e tempo di rotazione
- Il resist deposto deve essere di spessore uniforme e chimicamente isotropico
- Se si applica troppo resist si aumenta il rischio di difetti di bordo
- Troppo poco resist può causare una copertura non uniforme
- La tecnica è poco precisa:
  - Difetti di bordo (dovuti all'accumulo di resist ai lati)
  - Spreco di materiale (tossicità/smaltimento/protezione)

A causa dei difetti di tale tecnica, esistono delle tecniche alternative:

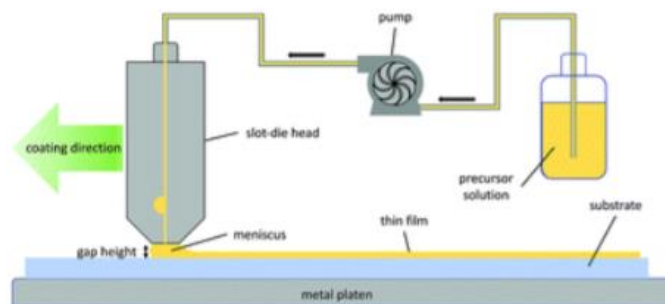
### SPRAY COATING

- Il substrato da rivestire passa sotto un getto di resist.
- Il resist viene spruzzato da un ugello a ultrasuoni, che crea particelle di resist di dimensioni micrometriche
- L'ugello deve essere tenuto vicino al substrato per evitare fenomeni di over-spray (5 cm)
- Permette di ottenere rivestimenti uniformi anche su superfici non uniformi e di medio spessore (non più di 20  $\mu\text{m}$ )
- Non soffre dei problemi legati agli effetti di bordo
- Il resist deposto presenta meno stress (rispetto al resist deposto per spin coating)
- Si spreca meno materiale
- Una variante di questa tecnica è l'*electrostatic spraying* in cui le gocce di resist vengono caricate, applicando un potenziale di circa 20 kV tra ugello e substrato. Le gocce cariche si respingono tra loro, ottenendo uno spray con gocce più piccole e un coating con minori difetti



### MENISCUS COATING (si usa spesso con superfici più grandi)

- La soluzione di fotoresist (precursor) è pompata da un applicatore tubolare poroso (pori 10  $\mu\text{m}$ )
- Si stabilisce un flusso laminare attorno al tubo
- Il substrato viene portato a contatto con il tubo e movimentato orizzontalmente e il menisco della soluzione aderisce al substrato, rivestendolo
- Ridotte perdite di materiale
- Rivestimento su grandi aree
- Non si creano effetti di bordo



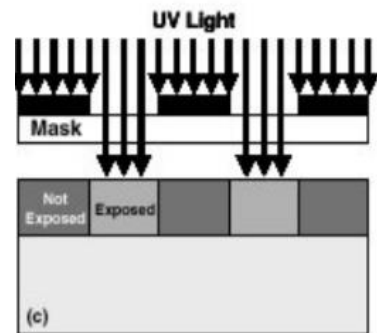


3. **SOFT BAKING:** Dopo aver depositato il resist sul substrato, la fase successiva è quella di soft baking.

- È un trattamento termico 90-100 °C per 20 min in forno (a convezione) o 75-85°C per 1- 3 min sottovuoto su piastra riscaldata
- Serve per eliminare il solvente presente nel resist, favorire l'adesione del resist al substrato, e allentare le tensioni residue dai processi di deposizione.
- Lo spessore del resist si riduce del 10-25% durante questo processo
- Da questo processo dipende la risoluzione finale della geometria.
- Differenze tra le due tecniche di soft baking:
  - In forno il resist viene trattato partendo dalla superficie -> la superficie può seccarsi formando uno spessore resistente all'evaporazione del solvente dagli strati sottostanti -> Importante controllare temperatura e tempi
  - In sottovuoto e su piastra, la temperatura è fornita dal basso, quindi il riscaldamento del resist procede dal basso verso la superficie, in modo più uniforme.

4. **ESPOSIZIONE:**

Il substrato rivestito dal resist viene esposto alla radiazione per impressionare il resist. In questa fase, al substrato viene sovrapposta (a contatto, in prossimità, o per proiezione) una maschera, che deve prima essere opportunamente allineata al substrato stesso. In fotolitografia la tipica radiazione è UV estremo (10-70 nm), UV profondo (150-300 nm), UV vicino (350-500 nm). Per lunghezze d'onda corte è richiesta una maggiore sensibilità del resist. Nel caso in cui si eseguano più processi litografici sullo stesso substrato (pattern complessi – geometrie 3D), il corretto allineamento delle maschere diventa fondamentale



Le maschere per esposizione

La maschera (fotomaschera) è uno stampo utilizzato ripetutamente per trasferire un pattern desiderato su un wafer ricoperto di foto-resist. La maschera contiene regioni UV-trasparenti (in vetro o quarzo) e un pattern metallico in grado di assorbire la radiazione UV (es. un layer di cromo di circa 800 Å) che così non attraversano la maschera. Infatti, il pattern assorbente non permette il passaggio dei raggi UV, quindi, la porzione di resist sotto il pattern assorbente non verrà esposta.

La dose (o energia della radiazione incidente necessaria per sviluppare il resist) (J/cm<sup>2</sup>) si ottiene moltiplicando l'intensità della luce incidente per il tempo di esposizione.

Polarità della maschera

*Clear field mask (maschera negativa):* il pattern è assorbente e il resto è trasparente



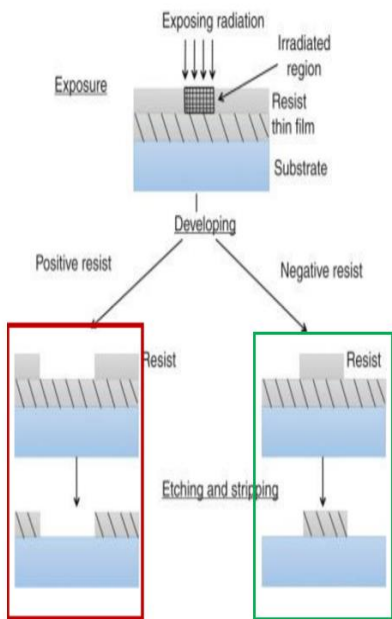
*Dark field mask (maschera positiva):* il pattern è trasparente e il resto è assorbente



Il pattern viene creato sulla maschera utilizzando tecniche di litografia a fascio di elettroni (e-beam).

Per un'alta risoluzione, si utilizza senza maschere.

Il fotoresist utilizzato può essere di due tipi:

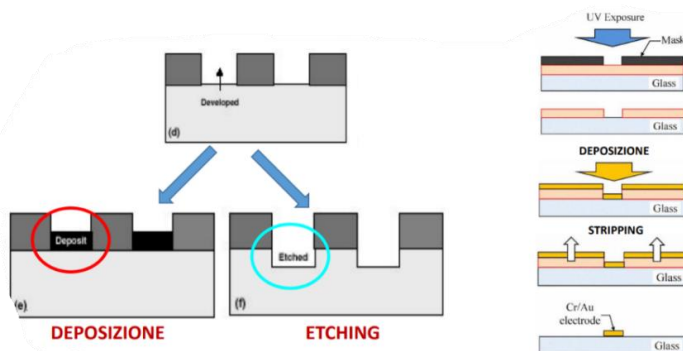


**FOTORESIST POSITIVO (a sinistra):** • La resina di base è inerte rispetto alla luce e resistente ai processi di attacco • Il componente fotosensibile non è inizialmente solubile nella soluzione di sviluppo, tuttavia la solubilità aumenta di 100 volte una volta esposto alla radiazione • La soluzione di sviluppo scioglie la parte di resist che è stata esposta. La restante parte non reagisce con la soluzione di sviluppo e rimane invariata • Il fotoresist positivo è quello che dà maggiore risoluzione • Lo sviluppo avviene per mezzo di soluzioni alcaline (es. NaOH or KOH)

**FOTORESIST NEGATIVO (a destra):** • L'esposizione con a luce ultravioletta induce cross-linking del resist • Si ha quindi la formazione di legami trasversali tra catene polimeriche • Come per il fotoresist positivo, esiste una dose minima (mJ/cm<sup>2</sup>) a cui questo fenomeno avviene. • La struttura esposta non è più solubile nella soluzione di sviluppo. • La soluzione di sviluppo non scioglie la frazione esposta, ma può parzialmente essere assorbita, causando rigonfiamenti e perdita di risoluzione. • Lo sviluppo avviene per mezzo di solventi organici

5. **SVILUPPO:** rimozione del resist solubile dopo l'esposizione. Temperatura e agitazione del bagno sono i parametri di controllo. Lo sviluppo può avvenire con processi «wet» o «dry».
  - Wet development: Può avvenire immergendo il resist nella soluzione liquida di sviluppo o spruzzando la soluzione di sviluppo sul resist.
  - Dry development: Non utilizza solventi, ma trattamenti al plasma o in fase vapore
6. **DESCUMMING:** Passaggio successivo, è un blando trattamento a plasma di ossigeno per rimuovere il resist residuo che potrebbe essere rimasto dopo il passaggio precedente
7. **POSTBAKING (Hard Baking):**
  - Elimina totalmente il solvente residuo
  - Aumenta la durezza del resist
  - Migliora la qualità del resist sviluppato in termini di resistenza agli attacchi chimici e fisici che verranno fatti in seguito.
  - Si effettua normalmente a circa 120°C per 20 min
  - Causa una certa perdita di spessore del resist e può introdurre tensioni residue.

Arrivati a questo punto il wafer ottenuto presenta il fotoresist depositato secondo il pattern desiderato (positivo o negativo). Il resist protegge la superficie del wafer durante i processi successivi di DEPOSIZIONE (in cui si deposita materiale nelle zone non esposte al resist) o ETCHING (in cui si elimina materiale nelle zone non esposte al resist). Il resist viene poi eliminato (STRIPPING) alla fine con opportuni solventi/metodi che non alterano la superficie del wafer trattata in precedenza.

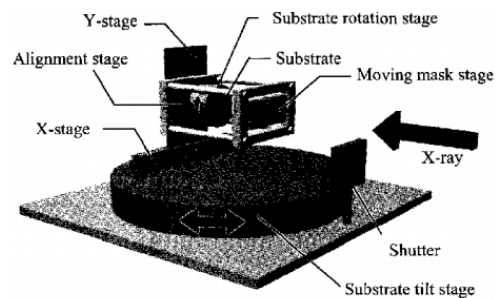




## LITOGRAFIA A RAGGI X

Usa raggi X per trasferire pattern a un resist sensibile ai raggi stessi. Anche qui ho una sorgente a raggi X e un sistema di movimentazione lungo varie direzioni che conterrà maschera e substrato.

- I raggi X hanno una lunghezza d'onda minore (4-50 Å) rispetto ai raggi UV (2000-4000 Å).
- Gli effetti di diffrazione sono quindi ridotti e la risoluzione è maggiore.
- Si può lavorare in prossimità (senza usare maschere a contatto).
- Non utilizza elettroni o ioni (particelle cariche), quindi sono richiesti sistemi di generazione di vuoto meno performanti.
- È una tecnica di riproduzione 1x: l'immagine nella maschera è l'esatta riproduzione del pattern (stessa scala).
- Richiede maschere ad alta precisione



Esistono 3 sorgenti principali di raggi x:

- Tubi radiogeni
- Laser plasma
- Sincrotroni (più comuni in micro-nano fabbricazione)

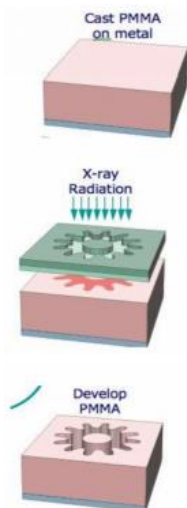
## CARATTERISTICHE IDEALI RESIST

Un buon resist per la litografia a raggi X dovrebbe:

- Possedere elevata sensibilità ai raggi X
- Garantire elevata risoluzione
- Essere resistente all'etching (chimico/ionico e plasma)
- Avere stabilità termica ( $T > 140^{\circ}\text{C}$ )

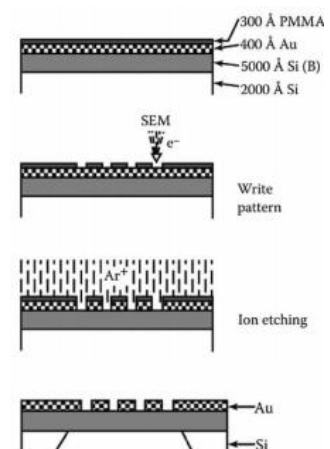
Al momento non esiste un materiale che garantisca tutti questi requisiti: il materiale più utilizzato è il polimetilmetacrilato (PMMA). Il PMMA ha bassa sensibilità ai raggi X: per aumentarne la sensibilità si possono includere elementi a elevato numero atomico.

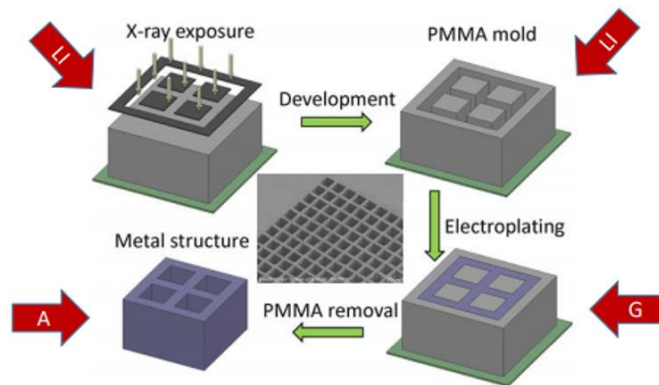
Si possono anche usare resist a base di poli(lattidi) usati soprattutto per la tecnica LIGA. Generalmente i resist NEGATIVI per litografia raggi X hanno maggiore sensibilità rispetto a quelli positivi.



## FABBRICAZIONE DELLE MASCHERE

1. Un sottile strato di oro (assorbente) viene depositato su un wafer di silicio (trasparente) e coperto poi con uno strato di resist (PMMA).
2. Sul resist viene disegnato il pattern (negativo) della maschera (mediante fascio elettronico)
3. Il resist non sviluppato viene rimosso
4. Lo strato d'oro non protetto dal resist viene eliminato tramite etching ionico
5. Il resist sviluppato viene rimosso (stripping)



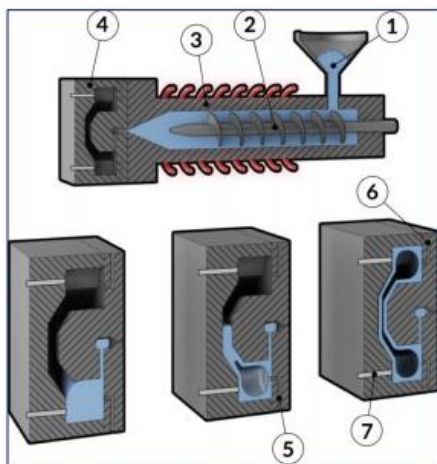
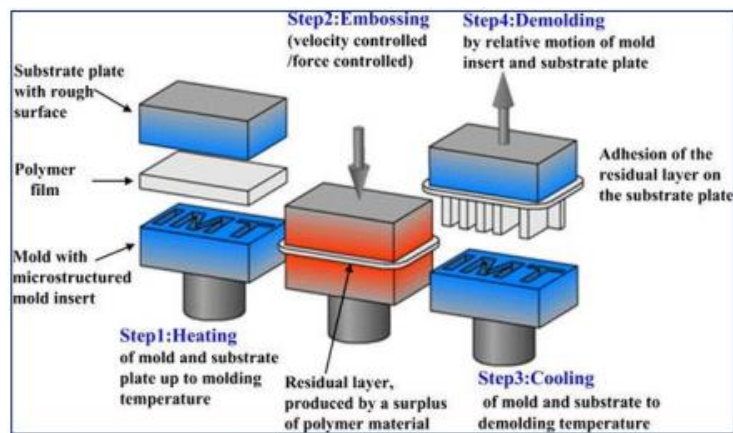


Hot embossing & Injection molding sono processi termici in cui un polimero viene scaldato oltre il suo punto di rammollimento, in modo che possa assumere la forma dello stampo.

In particolare:

**HOT EMBOSsing**

- Step 1: Si scalda il piatto fino alla temperatura di molding.
- Step 2: fase di embossing, trasferisco la geometria
- Step 3: raffreddamento dello stampo
- Step 4: demolding, rimuovo lo stampo



**INJECTION MOLDING**

Il fluido polimerico è spinto da una vite all'interno di uno stampo con un ugello, prendendone la forma quando si raffredda. Si può insufflare aria all'interno o si può aspirare per ottenere adesione alle pareti dello stampo.

**VANTAGGI:**

- Elimina i problemi di diffrazione legati all'uso delle maschere
- Preciso controllo dell'energia trasferita al substrato
- Alte risoluzioni (alcuni nm)
- Meno difetti
- Tecnica flessibile.

**SVANTAGGI:**

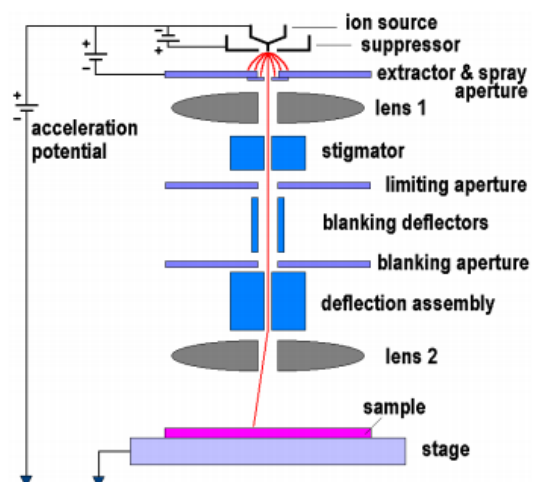
- Lentezza della procedura (circa 5 wafer/ora) - Costosa e complicata
- Problemi di scattering (difficoltà nella focalizzazione del fascio elettronico)
- Necessità di lavorare in vuoto
- Generazione di elettroni secondari.

**LITOGRAFIA A FASCIO DI IONI (FIB)**

- È una tecnica litografica che utilizza un fascio di ioni ad alta energia
- L'energia degli ioni incidenti può variare tra qualche keV fino a decine di MeV
- Richiede la generazione di vuoto per generare e focalizzare il fascio
- Non richiede l'uso di maschere (il fascio ionico può essere guidato da un software)
- Può essere utilizzata per disegnare direttamente (direct write) il pattern su uno strato di resist o per scavare il substrato senza necessità di resist (ion etching)
- Tra tutte le tecniche litografiche è quella che permette di raggiungere la maggior risoluzione
- Gli ioni hanno lunghezze d'onda più piccole, perciò i fenomeni di diffrazione sono quasi nulli e i fenomeni di scattering molto meno importanti rispetto alla litografia con fascio elettronico.
- Il resist può essere il PMMA o altri materiali in grado di assorbire ioni.
- L'applicazione più importante di questa tecnica è nella riparazione di maschere per litografia realizzate mediante altre tecniche.
- Per la generazione di ioni si utilizzano tipicamente sorgenti a metallo liquido
- I metalli più comunemente usati come sorgente di ioni sono: Gallio, Indio e Oro.
- Utilizzando leghe metalliche si possono anche utilizzare materiali dopanti, quali Boro, Fosforo, Silicio e Berillio.
- Gli ioni sono molto più reattivi degli elettroni e quindi il loro impatto contro la superficie può essere sfruttato per modificare la superficie stessa.
- È possibile impiantare ioni sulla superficie del substrato (nano-deposizione)
- È possibile incidere il substrato (milling o nano-machining)

**FUNZIONAMENTO**

- Il metallo liquido (es. Ga) migra lungo un substrato a forma di siringa all'interno del quale c'è un solenoide usato per il riscaldamento ed è anch'esso una riserva di Gallio.
- Applicando una differenza di potenziale il metallo forma un getto a cono (cono di Taylor - Gilbert). Il diametro del fascio generato può raggiungere i 50 nm
- Il diametro del fascio focalizzato sul campione può scendere fino a 4-8 nm)
- I legami tra atomi si rompono e gli atomi vengono ionizzati in modo uniforme



Gli strumenti FIB possono essere sfruttati anche per la microfabbricazione o l'imaging alla micro- e nano-scala.

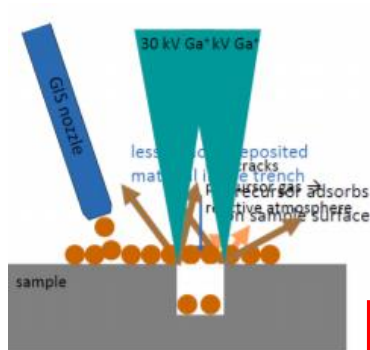
Il FIB per la sua capacità di sputtering può essere utile per modificare materiali e lavorarli su scala micro e nano metrica.

**FOCUSED ION BEAM CHEMICAL VAPOR DEPOSITION (FIB-CVD)**

Con il FIB-CVD si può aggiungere un elemento, una sorgente come il gas, che può servire come deposito di materiale tipo platino o carbonio, TEOS, etching aumentato usando fluoruro di xeno, per la rimozione di materiale dalla superficie oppure per depositare ioni. Si può usare in entrambe le modalità, sia top down che bottom up.

Le specie colpite con il raggio ionico possono reagire con il gas, oppure se presente materiale volatile, il raggio ionico fa sì che si separino le molecole e che il materiale tipo platino/carbonio si depositi.

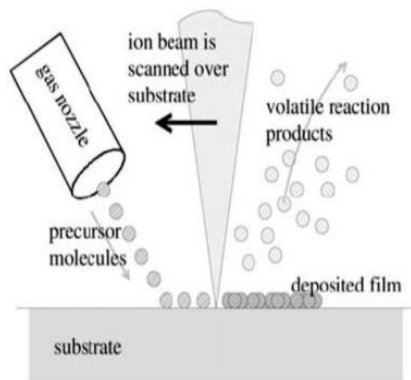
*GIS nozzle: sistema di iniezione del gas.*



- Enhanced milling (etching)**
- impinging Ga<sup>+</sup> knocks out atoms and ions from sample
  - redeposition is prevented by chemical reaction with the adsorbed gas  
→ formation of volatile species
  - etching gases that react only with certain species  
→ selective milling

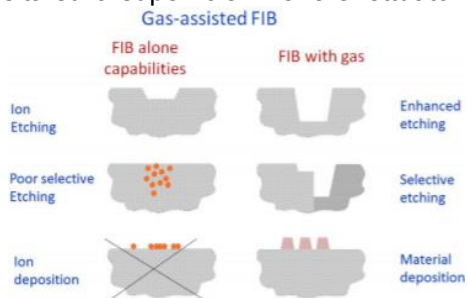
- Examples of etching gases**
- XeF<sub>2</sub> → enhanced Si and insulator milling
  - I<sub>2</sub> → enhanced metal milling
  - H<sub>2</sub>O → enhanced carbon (polymers, ...) milling

Con il gas ho un maggior effetto di etching, inoltre posso lavorare in maniera differente su materiali diversi, oppure posso anche avere deposizione di materiale, cosa non possibile nel FIB poiché non ho deposito di ioni.



**Deposizione di vapore chimico:** ho il raggio ionico e l'emettitore di gas con molecole di precursore che, incontrando il fascio ionico, vengono decomposte: i prodotti volatili si allontanano e un film di materiale si deposita sulla superficie. Viene effettuato in maniera controllata per creare pattern specifici.

Nell'immagine a destra si possono notare possibili risultati diversi usando FIB semplice o FIB-CVD (with gas)



**MICROMACHINING FIB + SEM:** esiste la possibilità di accoppiare un sistema di microscopia elettronica SEM (*Scanning Electron Microscope*) (cioè un raggio focalizzato di elettroni) al raggio ionico FIB per controllare il processo. Incorporando FIB e SEM in una singola macchina, possiamo usare i due sinergicamente per svolgere compiti oltre i limiti di entrambi i sistemi individuali.

In un sistema a due raggi vengono inseriti il raggio ionico e il fascio elettronico in posizioni fisse e vengono fatti convergere i loro punti focali nel «punto di coincidenza». Il campione può essere ripreso in tempo reale con il SEM, mentre il FIB si occupa della lavorazione o del deposito di materiale. Ciò consente una maggiore precisione durante la creazione di sezioni trasversali. L'imaging SEM non danneggia il campione, mentre il FIB comporta inevitabilmente danni da sputtering.

**Differenze fisiche:** gli ioni sono più grandi degli elettroni quindi ho due raggi diversi. La massa dello ione è 100mila volte maggiore, la velocità invece è molto minore. Il raggio ionico tende a penetrare strati maggiori di materiale. Si possono generare elettroni secondari per creare l'immagine che penetrano in profondità minore.

**Nanomanipolatori (ad es. nanotweezers):** oggetti accoppiabili al sistema di fabbricazione per avere una semplice lavorazione tipo le "tweezers" per la fabbricazione di nanostrutture.

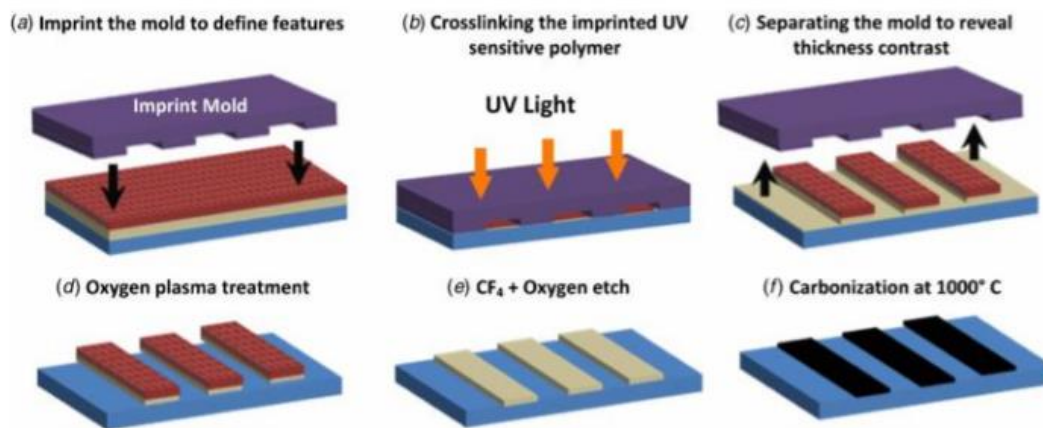


## **NANOIMPRINTING – STEP AND FLASH LITHOGRAPHY (SFIL)**

È una versione della NIL sviluppata dall'università del Texas (Austin) nel 1998.

Si basa sul nanoimprinting UV-assistito. Come funziona?

- a) Si usa uno stampo trasparente (tipicamente in silice, NON silicio) da applicare sopra uno strato di resist fotosensibile.
- b) Il resist assume la forma dello stampo e viene poi esposto ai raggi UV attraverso lo stampo stesso (sviluppo). Questo permette la polimerizzazione della resina.
- c) Alla rimozione dello stampo il resist non esposto viene lavato via. Troverò il pattern generato.
- d) La superficie può essere modificata come nel caso precedente (lift-off dopo deposizione di strato metallico oppure etching). Trattamento con plasma di ossigeno. Viene rimosso il substrato su cui non è presente il resist.
- e) Secondo etching selettivo per rimuovere il resist residuo polimerizzato dall'UV lasciando il substrato
- f) Carbonizzazione a 1000 °C che trasforma questo substrato in strisce di carbonio al fine di avere strati conduttori, in questo caso, sulla superficie.



## **LITOGRAFIA A DUE FOTONI (detta anche tecnica del DIRECT LASER WRITING)**

Permette di realizzare strutture complesse non ottenibili con la litografia tradizionale (strutture con geometrie complesse per le quali è necessaria un'elevata risoluzione spaziale).

Nella litografia tradizionale, la risoluzione è limitata dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente. Nella litografia a due fotoni, la fotopolimerizzazione avviene in un volume più piccolo rispetto al punto focale del raggio laser.

In particolare, la fotopolimerizzazione avviene solo nelle zone in cui l'intensità della radiazione incidente è sufficientemente elevata da produrre l'assorbimento di due fotoni. La litografia a due fotoni sfrutta materiali fotosensibili che assorbirebbero a una lunghezza d'onda doppia rispetto a quella incidente, pertanto permette una maggiore profondità di penetrazione nel materiale; viene definita una tecnica «intrinsecamente 3D» perché posso lavorare all'interno del materiale senza doverlo scavare. È possibile ottenere strutture con una risoluzione spaziale anche sotto i 120 nm.

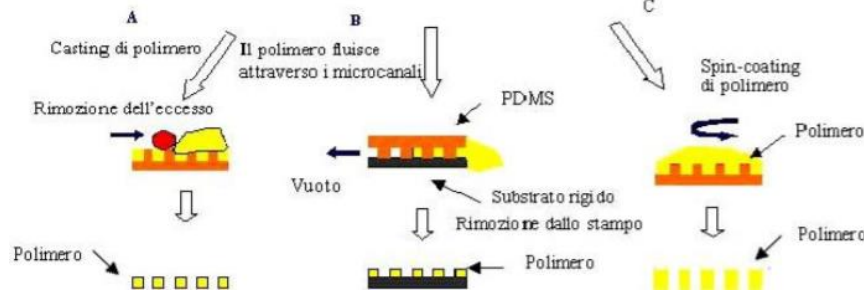
## **SOFT LITHOGRAPHY**

È un metodo di micro-fabbricazione meno costosa che utilizza uno stampo iniziale fatto di materiale flessibile (tipicamente polidimetilsilossano – PDMS (silicone)).

Il master di PDMS è ottenuto a partire dalle tecniche litografiche viste finora. È utilizzato come stampo dal quale ricavare una copia nel materiale più opportuno.

La tecnica trova applicazioni in microfluidica (organ-on-chip) e BIOMEMs.

1) **MICROMOLDING:** Procedura standard di deposizione di materiale elastomerico sul master che permette di realizzare pattern polimerici. Il riempimento dello stampo può avvenire in tre modi:

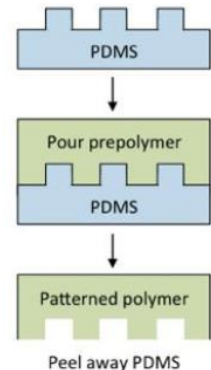


A) **CARTING DI POLIMERO:** La soluzione polimerica è colata sullo stampo e lo permea in seguito all'applicazione di un vuoto spinto. L'eccesso di polimero viene rimosso. Lo stampo viene posto in forno a bassa temperatura per permettere l'evaporazione del solvente in eccesso. Il pattern polimerico può essere rimosso dallo stampo facilmente.

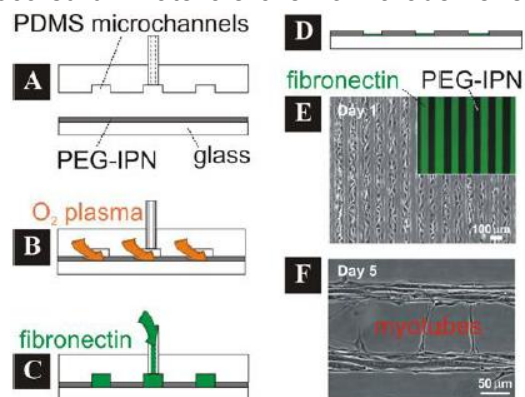
B) **TECNICA MICROFLUIDODINAMICA:** Lo stampo di PDMS viene fatto aderire su un substrato (es. vetro) e ad una sua estremità viene posta la soluzione polimerica. Dall'altra parte dello stampo viene applicato un vuoto in modo da riempire i micro-canali. Il sistema è posto in forno per favorire l'evaporazione del solvente in eccesso. Il pattern è ricavato asportando semplicemente lo stampo.

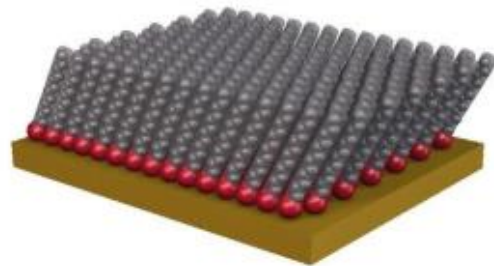
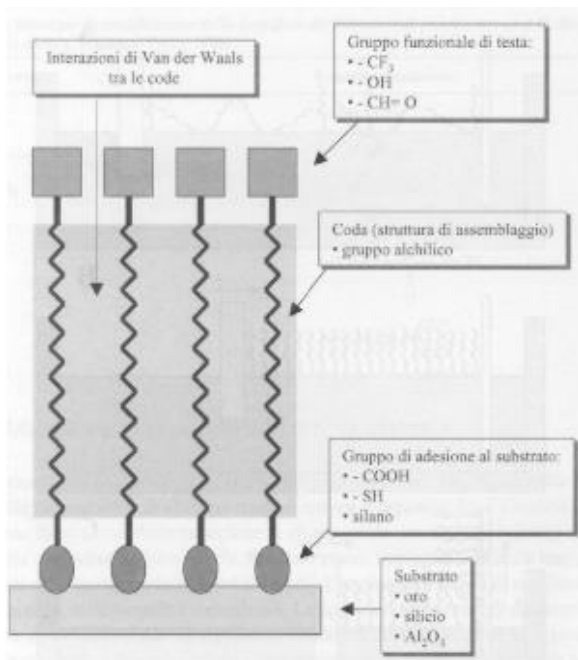
C) **SPIN – COATING:** La soluzione polimerica è deposta sullo stampo e poi “spinnata” in modo da riempire i micro-canali presenti. Rimozione del polimero in eccesso e del solvente. La struttura una volta secca può essere rimossa dallo stampo. Questa tecnica utilizza la forza centrifuga di rotazione dello stampo per favorire l'adesione del polimero e permette di ottenere strutture con spessore variabile in funzione della velocità di rotazione.

2) **MICRO-REPLICA MOLDING:** Si vuol realizzare un prodotto in materiale elastomerico che è il negativo dello stampo, a sua volta elastomerico (PDMS), ottenuto con il processo di Soft Lithography. Il primo passo consiste nell'effettuare una deposizione di materiale elastomerico sul master di PDMS. Per consentire poi una corretta separazione dei due stampi è necessario effettuare un pre-trattamento chimico superficiale temporaneo che eviti il processo di reticolazione all'interfaccia



Di seguito un esempio di questa tecnica, usata per orientare culture cellulari: ho uno stampo siliconico ottenuto con le tecniche viste prima che colloco su un materiale che non fa aderire le cellule (per esempio in un vetrino). Sul vetrino è depositato PoliEtilenGlicole (PEG) che è un materiale idrofilico, pertanto le cellule non sono favorite all'adesione. Faccio trattamento al plasma che colpirà solo regioni del PEG che sono al di sotto dei canali dello stampo. Ho una modifica chimica per cui la fibronectina (contenuta nella matrice extracellulare) aderisce a queste zone e quindi creo dei pattern con delle strisce di fibronectina intervallate con il PEG: le cellule aderiscono solo dove c'è la fibronectina. Inoltre, orientate in questo modo, si favorisce l'organizzazione cellulare verso strutture più complesse, come la formazione di tessuti.





Un **monostrato auto-assemblato** o **SAM** (*Self-Assembled Monolayer*), è uno strato organizzato di molecole anfifiliche in cui una delle estremità della molecola, il "gruppo di testa" (*head group*), mostra una speciale affinità per un substrato. I SAM sono costituiti anche da una coda (*tail*) a cui può essere legato un gruppo funzionale nella parte finale

È un processo spontaneo. Gli atomi di zolfo formeranno uno strato sull'oro, il cui spessore dipende dal numero (n) di gruppi metilene nella catena alchilica. Le caratteristiche di superficie possono essere modificate cambiando il gruppo di testa (X). Le code invece, cioè le catene alchiliche (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, si estenderanno dalla superficie in una configurazione trans.

In media sono inclinati di circa 30° rispetto alla perpendicolare alla superficie, allo scopo di massimizzare le interazioni di Van der Waals tra gruppi metilene adiacenti.

*master= prodotto della UV litografia  
stampo= replica del master litografico in silicone*

### **SCANNING PROXIMAL PROBE LITHOGRAPHY (di tipo TOP-DOWN)**

Queste 3 tecniche utilizzano sonde (probe) alla nanoscala posizionate nell'immediata vicinanza della superficie del materiale:

1. Probe di prossimità (***scanning tunneling microscope – STM***) la cui punta genera un campo elettrico (o una corrente) in prossimità della superficie, in modo da indurre modifiche nella regione sotto la punta della sonda.
2. Metodi meccanici (***scanning (o atomic) force microscope – SPM/AFM***) in cui la punta del probe graffia, deforma termicamente, o trasferisce materiale sulla superficie.
3. Metodi ottici in cui la punta del probe espone un resist solo nella zona toccata (si parla di ***near field scanning optimal microscope***) mediante una radiazione luminosa.

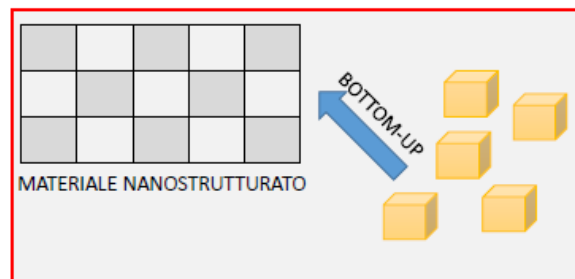
Vediamo nel dettaglio i primi due:

AFM NANOLITOGRAPHY (scratch lithography): Il cantilever può essere utilizzato per imprimere pattern sulla superficie. Si possono ottenere spessori di 20 nm e profondità anche di 2 nm. La rottura della punta del cantilever è uno dei principali problemi di questa tecnica. Per prolungare la durata si modifica la punta del cantilever attraverso l'impianto di un nanotubo di carbonio (estremamente piccolo e resistente). In alternativa si possono usare punte AFM che vengono riscaldate e provocano la fusione del materiale a contatto.

AFM NANOLITOGRAPHY: Il cantilever può essere anche utilizzato per indurre la formazione di strati di ossido sulla superficie secondo pattern nano-strutturati. In genere si lavora in atmosfera umida imponendo un potenziale alla punta. L'acqua tra la punta del cantilever e la superficie si dissocia causando la formazione di sottili strati ossidati superficiali in rilievo. Questi strati possono costituire da protezione per successivi processi di etching, oppure formare loro stessi un pattern in rilievo.

## **NANOFABBRICAZIONE - TECNICHE BOTTOM UP**

- Focused Ion Beam (FIB)
- DIP-PEN nano litografia (DPN)
- Nanofabbricazione virus-assistita
- Nanofabbricazione proteina-assistita
- Nanofabbricazione DNA-assistita



### **SCANNING PROXIMAL PROBES LITHOGRAPHY (di tipo BOTTOM-UP)**

I probe di prossimità possono essere anche utilizzati come tecnica di fabbricazione Bottom-up (non solo Top Down). Il campo elettrico generato in prossimità della superficie è molto forte e può essere utilizzato per manipolare o spostare atomi, come detto precedentemente. I processi di manipolazione di atomi possono essere classificati come:

- Processi paralleli (movimento di atomi lungo la superficie – sliding)
- Processi perpendicolari (l'atomo è trasferito dalla superficie alla punta del probe o viceversa)

La risoluzione teorica di questi processi è dell'ordine di un singolo atomo. La risoluzione ottenibile è dell'ordine dei 100 Å (10 nm)

I tempi necessari per spostare e posizionare gli atomi sono estremamente lunghi (Negli anni 80, gli scienziati dell'IBM impiegarono circa 1 settimana per scrivere il logo con microscopio STM, posizionando atomi di Xenon su una superficie di Nickel).

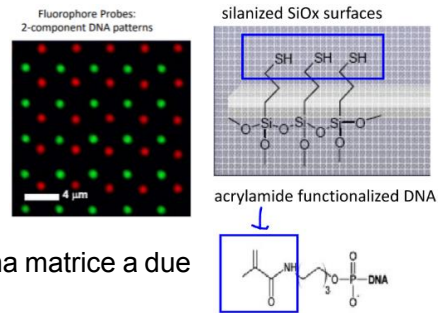


### **Inchiostri a DNA multiplo a scrittura diretta**

Immaginiamo di avere un inchiostro di DNA in grado di legarsi tramite ponte SH alla superficie di silice ossidata.

Scopo: Patterning diretto di inchiostri a DNA multiplo mediante DPN.

Si ottiene un'immagine combinata di epifluorescenza rosso-verde di due diverse sequenze marcate con fluoroforo (Oregon Green 488-X e Texas Red-X) ibridati contemporaneamente a una matrice a due sequenze depositata su un substrato SiOx mediante DPN.



### **Applicazione: Nanolitografia DIP-PEN per screening oncologico**

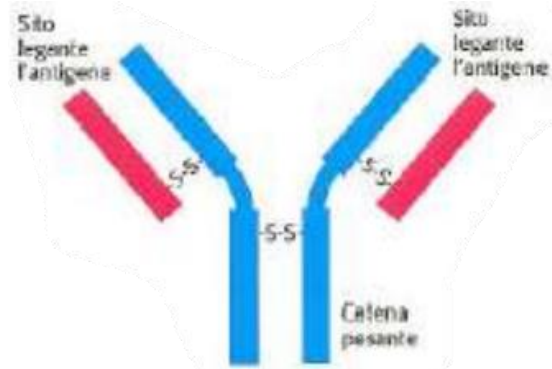
In oncologia i marker tumorali sono sostanze riscontrabili nel sangue, nell'urina o nei tessuti cellulari che presentano un aumento significativo della loro concentrazione in alcuni tipi di neoplasia. Esistono diversi marker tumorali. Altri marker, biomarcatori, consentono di predire la capacità di risposta dei tessuti tumorali alle terapie a bersaglio molecolare. I markers tumorali possono essere prodotti direttamente da cellule tumorali o non tumorali in risposta alla presenza di un tumore. Attualmente, l'uso principale dei marker tumorali è la valutazione della risposta del cancro al trattamento e la verifica della recidiva. Gli scienziati continuano a studiare questi usi dei marker tumorali e il loro potenziale ruolo nella diagnosi precoce e nella diagnosi del cancro.

#### Come posso costruire una misura di marker tumori sperabilmente con alte sensibilità?

Dovrò immobilizzare degli anticorpi su una superficie che hanno come antigene i marcatori tumorali.

Ricordiamo come interagiscono anticorpo e antigene:

L'anticorpo è una proteina con struttura quaternaria a forma di Y composta da 4 catene polipeptidiche tenute insieme da ponti solfuro ottenuti per ossidazione dei gruppi tiolici dell'amminoacido cisteina.



Gli antigeni sono delle sostanze estranee. Quando un anticorpo va a contatto con l'antigene, viene riconosciuto in una particolare zona detta "epitopo".

In linea di principio si possono creare anticorpi monoclonali specifici a un antigene: in particolare si prende una cultura cellulare di linea tumorale, ibridizzate con le cellule della milza di un animale che è stato a contatto con l'antigene. Iniettandole nuovamente nell'animale questo sarà in grado di produrre anticorpi monoclonali.

Esistono test che sfruttano anticorpi per verificare la presenza di un certo antigene o un certo anticorpo: **test ELISA**.

*Anticorpo: 4 catene polipeptidiche legate da ponti di solfuro(S-S) con una regione antigenica.  
 Antigeni: molecole o proteine che si legano agli anticorpi.  
 Gli anticorpi sono di tipo: policlonali o monoclonali (dove c'è riconoscimento univoco tra antigene e anticorpo)*

La punta interagisce con gli anticorpi sulla superficie venendo attratta con una certa forza; tramite questo passaggio comprendo quanti marker tumorali ho.

I magnetosomi agiscono come piccoli bioreattori, in cui avviene la biomineralizzazione della magnetite, sotto stretto controllo di:

- Concentrazione di ferro
- Nucleazione del cristallo
- Potenziale redox
- pH

Possiamo sfruttare i batteri per produrre cristalli di magnetite di dimensioni controllate. Essi possono trovare svariate applicazioni in campo biotecnologico. Un'applicazione è quella relativa al trattamento dei tumori.

**Box 1. Potential applications of bacterial magnetic particles (BacMPs).**

- Immunoassays for human disease diagnosis or environmental assessment
- Cell separation
- DNA and/or RNA recovery
- DNA discrimination within species (e.g. bacteria)
- Detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to human disease
- Receptor-binding assay for drug screening
- Drug delivery
- Hyperthermia
- Magnetic probes
- Material for magnetic force microscopy (MFM) cantilever

**BATTERI MAGNETOTATTICI PER TERAPIA TERMICA DEI TUMORI CON CAMPI MAGNETICI**

**ALTERNATI:** I magnetosomi estratti dai batteri sono stati utilizzati per la terapia termica contro il cancro. Si prende il batterio magnetotattico e si estraggono i magnetosomi individuali separando le catene lineari. Questi materiali sono stati utilizzati per trattare i tumori, notando che la dimensione del tumore cresceva in modo notevolmente ridotto rispetto al non utilizzo. La terapia consiste nell'applicazione di un campo magnetico alternato con conseguente ipertermia del materiale magnetico che distrugge le cellule tumorali, più sensibili al calore. L'effetto delle catene di magnetosomi è risultato più efficace rispetto all'utilizzo di singoli magnetosomi, a causa del fatto che producono, se esposti a un campo magnetico, una maggior quantità di calore essendo più grandi e favorendo allo stesso tempo una distribuzione più uniforme nel tessuto.

**NANOFABBRICAZIONE VIRUS – ASSISTITA**

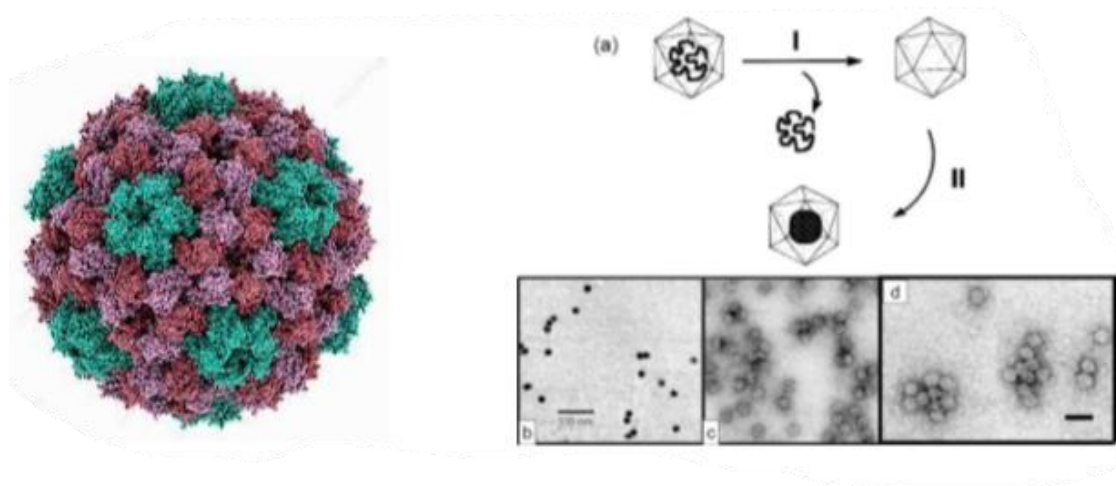
I virus sono particelle submicroscopiche (di dimensioni comprese tra i 20 e i 300 nm) in grado di infettare le cellule. La membrana virale (scaffold o capside) ha diversi gruppi funzionali, rendendo le particelle virali utili come modelli per la sintesi di nanomateriali, data la loro geometria variabile.

Ad esempio, i virus a forma di asta o filamentosi possono essere utilizzati come modello per la produzione di nanofili e nanotubi. Oppure i virus con capsidi sferici o quasi sferici possono produrre metalli di dimensioni nanometriche, semiconduttori e altri materiali inorganici di quella forma.

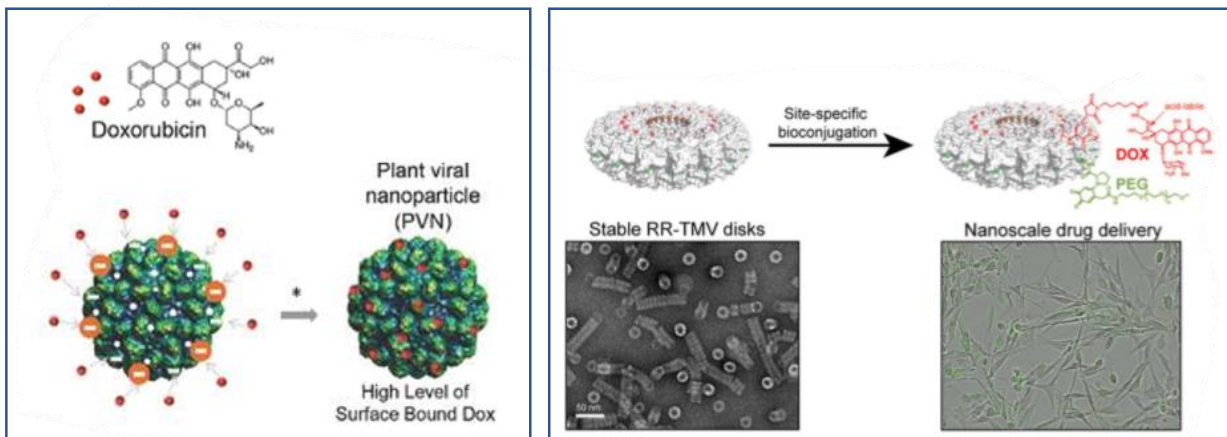
Questa nanofabbricazione funziona perché l'effetto di contenimento dello spazio aiuta a produrre particelle monodisperse e dimensioni sulla nanoscala. Inoltre, i capsidi virali impediscono ai nuclei inorganici di aggregarsi e ne facilitano il recupero e la manipolazione.

Le particelle virali esistono in varie forme e strutture, consentendo, come già detto, la sintesi di un'ampia gamma di strutture inorganiche.

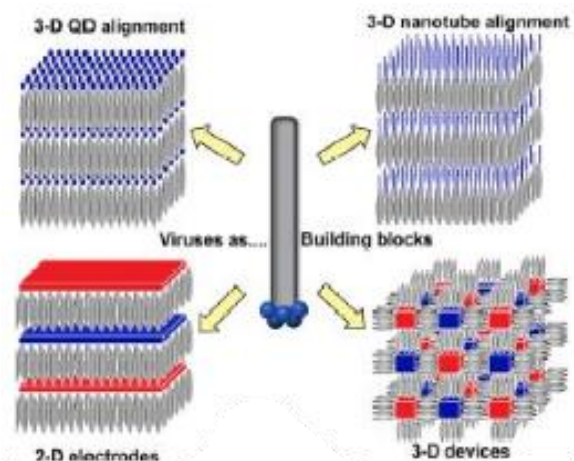
Per riassumere, gli scaffold virali (svuotati dal materiale genetico) sono usati come mezzo per templare o dirigere la nucleazione e l'assemblaggio di materiali inorganici, sfruttando l'affinità dei materiali inorganici verso i peptidi (porzioni di proteine) che costituiscono il capsido o son espressi sulla superficie di esso. La dimensione e la forma del virus determinano le dimensioni e la forma dei nanocristalli coltivati.



Il capside virale può essere modificato con all'interno diversi farmaci per migliorare il rilascio, sfruttando ad esempio la Doxorubicina.



I virus a forma di asta accoppiati con nanoparticelle sono blocchi costitutivi versatili in grado di organizzare varie forme di assemblaggi di nanomateriali, tra cui array di nanopunti, array di nanotubi, pellicole 2D e array di cubi 3D.



## ELECTROSPINNING

L'elettrospinning (o elettrofilatura) è un processo dal quale nanofibre polimeriche possono essere prodotte usando un sistema di guida elettrostatica che consente una loro deposizione controllata su di un substrato. Diversamente dalle convenzionali tecniche di filatura che sono capaci di produrre fibre di polimero con diametri dell'ordine dei micrometri, l'elettrospinning è un processo capace di produrre fibre di polimero con diametri dell'ordine dei nanometri.

L'elettrospinning si realizza applicando un campo elettrico ad alto voltaggio (es. 10 kV) ad un capillare (solitamente un ago di una siringa), dotato di un ugello di dimensione millimetriche, che è riempito con il polimero sciolto in un solvente (detto *solution electrospinning*). Le fibre che attraversano il campo elettrico sono poi raccolte su un collettore.

### Caratteristiche delle nanofibre ottenute per electrospinning:

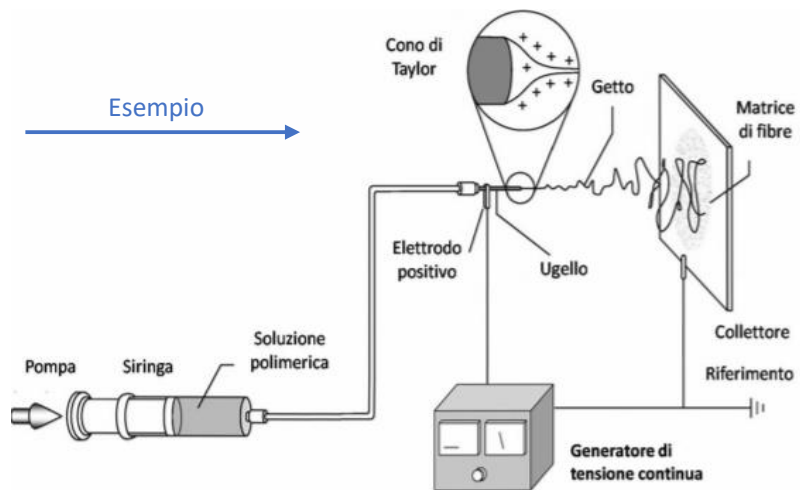
- Diametri ultrafini inferiori a 100 nm;
- Grande area superficiale con valori prossimi a 100 m<sup>2</sup>/g;
- Pori di piccole dimensioni (qualche micron).

### CONFIGURAZIONI

Si può operare essenzialmente in due configurazioni:

- *Configurazione orizzontale*: collettore verticale.
- *Configurazione verticale*: collettore orizzontale.

In generale, abbiamo la siringa che contiene la soluzione polimerica e l'ugello da cui fuoriesce mediante l'azione di una pompa. Tra collettore e pompa (in particolare all'ugello) viene generata una differenza di potenziale, grazie ad un generatore di tensione. Lavorando con un solvente si lavora in una cappa di respirazione. Il diametro della soluzione in uscita si assottiglia grazie alla presenza del campo elettrico (Cono di Taylor).

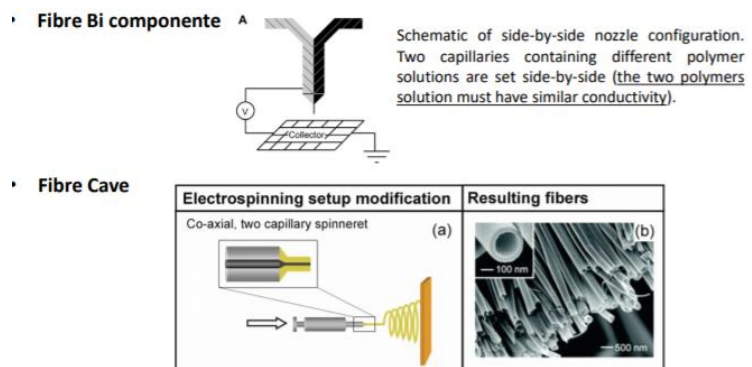


### COMPONENTI

- Siringa: contiene la soluzione polimerica
- Pompa: genera il flusso di soluzione polimerica
- Generatore di tensione: genera la differenza di potenziale tra l'ugello e il collettore
- Collettore metallico: raccoglie le fibre

### Capillare

Utilizzando una siringa con ugello tradizionale si fabbricano fibre piene, modificando il capillare si possono ottenere nanofibre bicomponenti o anche cave.

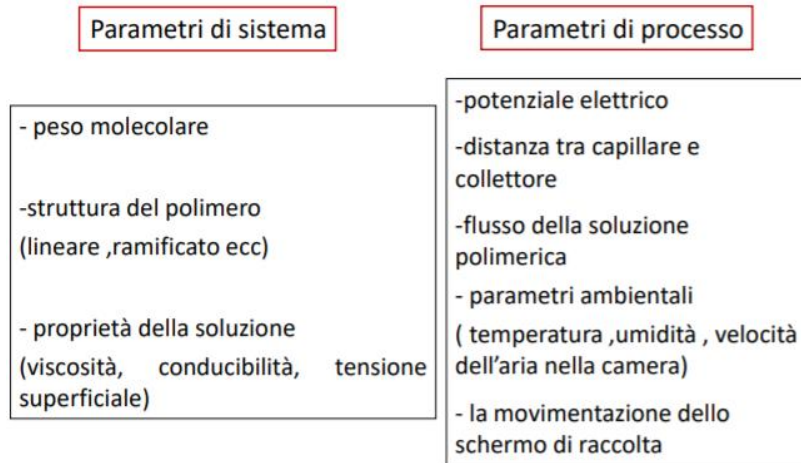




Come apparecchiatura si usano due cilindri di alluminio come portacampioni per il SEM (12.5 mm di diametro) coperti con una pellicola di carbonio. Uno è attaccato ad un mandrino di acciaio inossidabile coperto con Teflon (per la rotazione a 2500 rpm). Distanza tra i dischi: 60 mm (tra 40-100 mm). Tensione 15-25 kV.

Siccome non è un sistema ideale, esistono dei difetti di filettatura, legati a parametri di processo:

- **Beads (perline)**, rigonfiamenti della fibra. La formazione a “pallone collassato” è indice di un’evaporazione del solvente lenta, che è avvenuta solo dopo la deposizione sul collettore.
- **Nastri**, fibre ancora ricche di solvente che collassano su sé stesse perdendo la geometria cilindrica unendosi l’una con l’altra.
- **Difetti superficiali**: al fine di ridurli, i parametri di processo e di sistema devono essere ottimizzati.



### Effetto dei parametri di sistema

#### **Proprietà della soluzione polimerica**

- Concentrazione: esiste una concentrazione minima al di sotto della quale si instaura un processo di “electrospray” (genera fibre anziché sferette di polimero) ed una concentrazione massima oltre la quale la soluzione è eccessivamente viscosa per garantire un processo continuo.
- Viscosità: a viscosità troppo basse, non si formano fibre continue, mentre a viscosità troppo elevate, il getto polimerico ha difficoltà a formarsi.
- Tensione superficiale: dipende soprattutto dal solvente e meno dal materiale polimerico. Riducendo la tensione superficiale, generalmente, si riduce la formazione di fibre con difetti (beads). Ad elevata tensione superficiale, infatti, il getto è instabile e si possono formare difetti, come gocce o beads.
- Conduktività: dipende dal polimero (se polare o no), dal solvente (polare) e dalla presenza di sali in soluzione (che aumentano la conducibilità della soluzione). Al crescere della conduttività, generalmente il diametro delle fibre decresce. Se la conduttività è eccessivamente bassa, non si formano fibre continue ma fibre con difetti (beads). Tuttavia, la soluzione eccessivamente conduttive sono instabili in campi elettrici intensi e la regione di instabilità è molto marcata, portando a fibre con diametri molto disomogenei.

#### **Proprietà del polimero**

- Peso molecolare: Il peso molecolare influenza la viscosità, la tensione superficiale, la conduttività e la resistenza dielettrica. Generalmente i polimeri più facilmente filabili hanno un alto peso molecolare, mentre i polimeri a basso peso molecolare tendono a formare beads. Un alto peso molecolare aumenta infatti le interazioni intercatena e causa maggiori “attorcigliamenti” fisici di catena (entanglements) che contribuiscono a stabilizzare il getto polimerico. Inoltre, maggiore è il peso molecolare del polimero e maggiore è il diametro delle fibre.
- Struttura del polimero: un polimero a struttura lineare (rispetto a una ramificata ad esempio) è più facilmente filabile, a seguito delle maggiori interazioni intercatena.

- **Applicazioni come abbigliamento protettivo.** Nanofibre permeabili a vapore acqueo e aria, ma reattive verso i gas nervini e altri prodotti chimici. Le strutture hanno una porosità elevata, ma pori piccoli che resistono anche alla penetrazione di aerosol.
- **Applicazioni ottiche ed elettriche.** Nanofibre conduttive: sensori, attuatori; elettrodi porosi per batterie ad alta prestazione (la velocità della reazione elettrochimica dipende dall'area superficiale); membrane per la protezione dalla corrosione; membrane per apparecchiature fotovoltaiche, etc. Applicazioni ottiche in compositi a base di cristalli liquidi e nanofibre che, per effetto di un campo elettrico, cambiano da uno stato in cui sono trasparenti alla luce ad uno in cui sono opachi.

### Applicazioni biomediche.

1. *Protesi mediche, protesi* per tessuti soft (vascolari, seno, vasi sanguigni) + *coating* con un film nanofibroso che fungano da interfaccia tra protesi e tessuto, riducendo la differenza di proprietà tra tessuto umano e protesi e migliorando le interazioni.
2. *Scaffold* per ingegneria dei tessuti che mimano la struttura dell'ECM
3. *Rivestimento di ferite*: l'alta area superficiale è estremamente efficiente per l'assorbimento dei fluidi e il rilascio di farmaci nel derma; inoltre i pori hanno dimensioni sufficientemente piccole da impedire la penetrazione dei batteri.
4. *Rilascio di farmaci e composizione farmaceutica*: la velocità di rilascio del farmaco cresce al crescere dell'area superficiale del farmaco e del materiale portatore.
5. *Cosmetici*: maschere per la pelle a base di nanofibre con piccolissimi interstizi e alta area superficiale che sono di facile uso e garantiscono una maggiore velocità di trasferimento degli additivi.

## Article: Wearable high-performance pressure sensors based on three-dimensional electrospun conductive nanofibers

### Abstract

Polymer-based pressure sensors play a key role in realizing lightweight and inexpensive wearable devices for healthcare and environmental monitoring systems. Here, conductive core/shell polymer nanofibers composed of poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropene) (PVDF-HFP)/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) are fabricated using three-dimensional (3D) electrospinning and vapor deposition polymerization methods, and the resulting sponge-like 3D membranes are used to create piezoresistive-type pressure sensors. Interestingly, the PEDOT shell consists of well-dispersed spherical bumps, leading to the formation of a hierarchical conductive surface that enhances the sensitivity to external pressure. The sponge-like 3D mats exhibit a much higher pressure sensitivity than the conventional electrospun 2D mats due to their enhanced porosity and pressure-tunable contact area. Furthermore, large-area, wireless, 16 × 10 multiarray pressure sensors for the spatiotemporal mapping of multiple pressure points and wearable bands for monitoring blood pressure have been fabricated from these 3D mats. To the best of our knowledge, this is the first report of the fabrication of electrospun 3D membranes with nanoscopically engineered fibers that can detect changes in external pressure with high sensitivity. The developed method opens a new route to the mass production of polymer-based pressure sensors with high mechanical durability, which creates additional possibilities for the development of human-machine interfaces.

### **APPLICAZIONE: Wearable Sensor (Sensore indossabile)**

Si produce una pelle elettronica artificiale (E-skin) in grado di rilevare contemporaneamente lievi variazioni di pressione, l'umidità, e la temperatura ed è stata intensamente studiata per il suo potenziale utilizzo in varie applicazioni, inclusi sistemi di monitoraggio sanitario, diagnostica medica, robotica leggera e interfacce uomo-macchina.

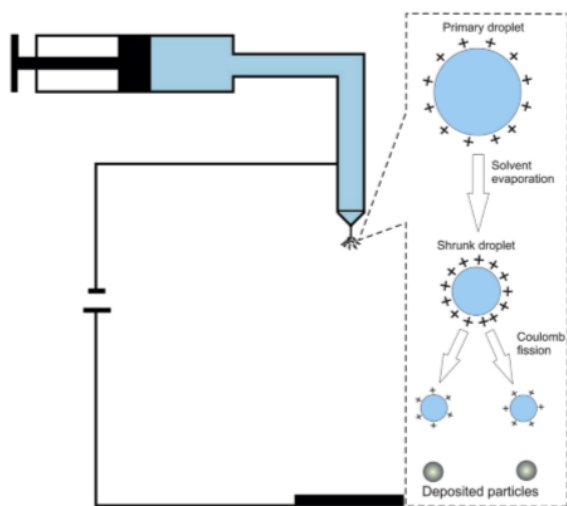
Sono dispositivi elettronici e risultano flessibili e facilmente integrabili con il corpo umano.

I sensori di pressione indossabili integrati sono stati sviluppati con diversi tipi di sistemi di trasduzione, compresi i tipi resistivi, capacitivi e piezoelettrici.

Il primo caso è noto come electrospraying, usato per ottenere aerosol, formati da goccioline sub-micron, con una limitata distribuzione. Applicato a soluzioni di polimero concentrato (o un fuso polimerico), il secondo caso è noto come electrospinning, generando fibre nanometriche di polimero.

La tecnica di electrospray genera particelle applicando una forza elettrodrodinamica uniforme per rompere il liquido in getti fini. È una delle tecniche più promettenti ed efficienti per produrre materiali particellari per applicazioni farmaceutiche e biomediche, in quanto presenta numerosi vantaggi rispetto ad altri metodi:

- Produzione di particelle (< 1 micron) con distribuzione dimensionale delle particelle ridotta e limitati agglomerati grazie alle proprietà di auto-dispersione;
- Ampia gamma di materiali che possono essere elaborati mediante electrospray, tra i quali proteine o cellule;
- Il set up sperimentale richiede bassi investimenti e richiede apparecchiature ampiamente utilizzate.
- È una tecnologia molto flessibile e versatile per preparare micro e nanoparticelle con composizione, microstruttura dimensione e forma controllabili.



### Principi base dell'elettrospraying

Abbiamo il nostro solito set strumentale. Il getto di liquido caricato ad un certo punto si romperà in gocce. Le prime gocce sperimentano un fenomeno chiamato Rayleigh disintegration o Coulomb fission, che fa sì che le particelle si rompano in particelle più piccole. Durante il percorso verso il collettore, l'evaporazione del solvente fa restringere le gocce portando ad un aumento della concentrazione di carica, che porta alla rottura delle particelle in particelle più piccole. Per ottenere particelle monodisperse, la Coulomb fission e la successiva perturbazione delle gocce devono essere evitate. (modalità Taylor cone-jet)

Oltre alla modalità Taylor cone-jet, è possibile ottenere diverse modalità di electrospray a seconda del potenziale elettrico applicato. Tuttavia, al fine di

ottenere micro o nanoparticelle altamente monodisperse, la modalità Taylor cone-jet è quella ottimale, in quanto fornisce un processo più stabile, riproducibile e facilmente controllabile.

### Effetto dei parametri di sistema: il polimero

Come i parametri di sistema influenzano il processo:

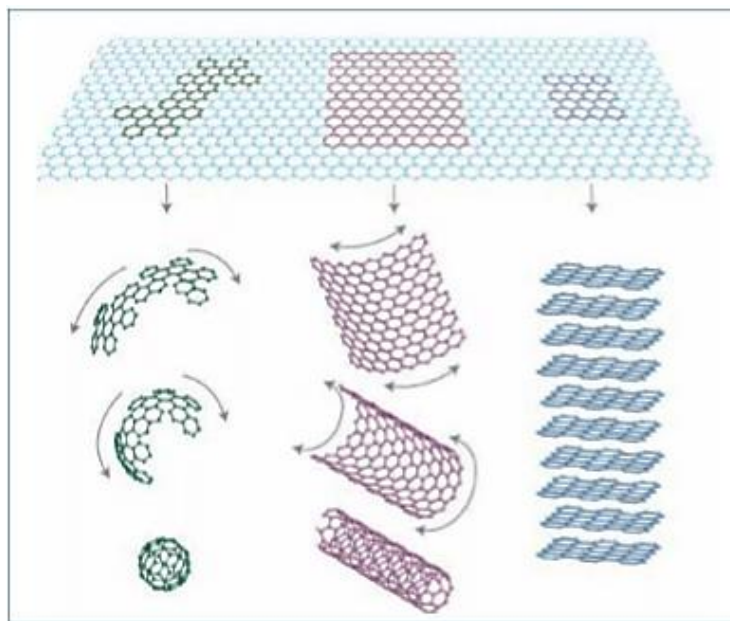
- 1) La solidificazione delle gocce primarie ottenute con l'elettrospray è influenzata da molti fattori tra cui la viscosità e la tensione superficiale della soluzione che è direttamente governata dal tipo di polimero con rispetto al solvente specifico, dal peso molecolare e dalla concentrazione del polimero stesso.
- 2) Durante la solidificazione delle particelle primarie avvengono differenti eventi: (i) evaporazione del solvente, (ii) diffusione del polimero e (iii) l'aggravamento delle catene.

Per i polimeri con pesi molecolari relativamente bassi, per l'elettrospray di nanoparticelle, si raccomandano solo 1-2.5 per entanglement (nodo fisico) della catena: un numero maggiore di entanglement porterebbe ad una viscosità tale da supportare la formazione di fibre (elettrospinning).

## **NANOSTRUTTURE DI CARBONIO**

Ricordiamo che il carbonio è un elemento che presente in natura, si presenta in due forme (grafite e diamante) ed è il principale elemento costituente di materiali e particelle. Vedremo come da un foglio di grafene (carbonio ibridazione  $sp^2$ ) si possano ottenere nelle nanostrutture particolari:

- Fullereni, ripiegando il foglio in forma sferica.
- Nanotubi di carbonio, ripiegando il foglio in forma cilindrica.
- Grafite, sovrapponendo più fogli di grafene uno sopra l'altro, ed è conduttore.



### **FULLERENI**

Il Buckminsterfullerene è una molecola a 60 atomi di carbonio, chiamata così per la somiglianza alla cupola geodetica dell'architetto Richard Buckminster Fuller (1895-1983). Nella struttura del buckminsterfullerene ( $C_{60}$ ) gli atomi di carbonio si dispongono ai vertici di un particolare poliedro semi regolare: l'icosaedro troncato. Si tratta di uno dei 13 solidi archimedeei, le cui facce sono esagoni e pentagoni. Tale poliedro rappresenta perfettamente la forma dei moderni palloni da calcio.

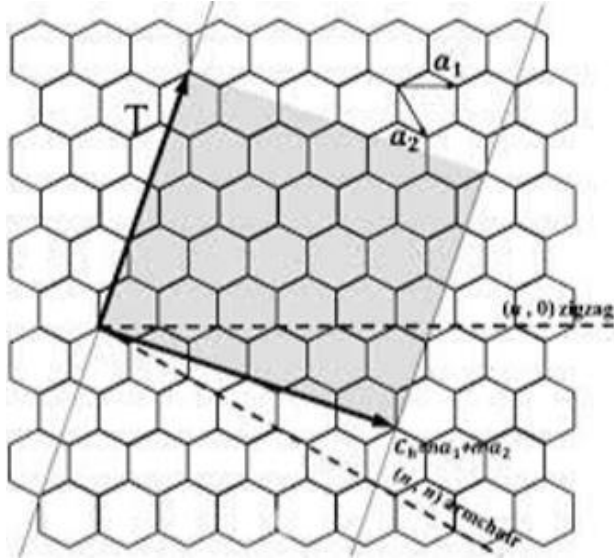


I fullereni, molecole sferiche come il buckminsterfullerene, possono avere diverse dimensioni e sono sempre indicate con la lettera C seguita dal numero di atomi di carbonio:  $C_{60}$ ,  $C_{70}$ ,  $C_{80}$ .

Huffman and Kratschmer svilupparono negli anni '90 il «Huffman-Kratschmer reactor» per la produzione di fullereni. Veniva usato un reattore gassoso dove si inserivano due elettrodi grafite, si applicava nel vuoto un campo elettrico che generava un plasma e sugli elettrodi, successivamente, si trovava il fullerene.



### Geometria dei nanotubi di carbonio



Abbiamo detto che possiamo ottenere strutture diverse: immagino di avere il mio foglio di grafite ripiegato e definire un vettore che definisce in che direzione ho fatto il ripiegamento: questo si chiamerà vettore chirale e sarà dato dalla combinazione lineare di due vettori  $a_1$  e  $a_2$  (vettori del reticolo) attraverso due numeri interi  $n_1$  e  $n_2$ .  
 (vettore chirale  $C$ :  $c = n_1 \cdot a_1 + n_2 \cdot a_2$  dove  $a_1$  e  $a_2$  sono i vettori del reticolo e  $n_1$  e  $n_2$  sono due numeri interi).

CLASSIFICAZIONE per proprietà elettriche: I nanotubi di tipo  $(n, 0)$  sono classificati come **zig-zag**, i nanotubi in cui  $n_1$  e  $n_2$  sono uguali sono classificati come **armchair**, tutti gli altri come **chiral**.

*La regola che mi dice che il nanotubo è metallico è: Dato un nanotubo  $(n_1, n_2)$ : se  $2n_1 + n_2 = 3q$  (dove*

*$q$  è un numero intero) (quindi ottengo un multiplo di 3), allora il nanotubo ha una struttura metallica, altrimenti è un semiconduttore. Per questo i zig-zag non sono tutti conduttori, ma solo i 2/3.*

L'armchair è sempre conduttore metallico, infatti,  $n_1=n_2=n$  da cui  $2n+n=3n=3q$  (sempre multiplo di 3!!!), quindi avrò sempre un nanotubo metallico.

Infine, per i chirali,  $n_1$  e  $n_2$  sono diversi tra loro e diversi da zero.

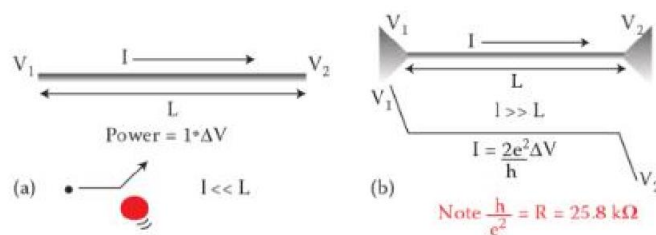
Il ripiegamento fa sì che si generino dei livelli energetici diversi per gli elettroni.

(conduzione: nei metalli gli elettroni negli orbitali e gli elettroni liberi hanno delle energie molto simili tra loro e questo fa sì che il materiale sia conduttore).

### Proprietà elettriche nanotubi

Conduzione balistica: in determinate condizioni, gli elettroni possono passare all'interno di un nanotubo senza scaldarlo. → I NTC metallici hanno la proprietà di conduzione balistica.

In un filo conduttore normale, il trasporto di carica è diffusivo e non balistico: la lunghezza di diffusione dell'elettrone ( $l$ ) è molto più piccola della lunghezza del filo  $L$  ( $l \ll L$ ).



**FIGURE 3.49** (a) Diffusive transport in an ordinary wire. (b) Ballistic transport in a quantum wire.

Le proprietà elettriche degli elettroni nei NTC sono dovute al confinamento quantico degli elettroni nella direzione perpendicolare dell'asse del tubo, che porta gli elettroni a propagarsi lungo l'asse del nanotubo con il vettore d'onda sempre nella stessa direzione. Gli elettroni di un NTC ideale si comportano come onde che viaggiano su un canale liscio senza atomi con cui scontrarsi e quindi non sono sottoposti a scattering. Questo fa sì che la corrente nei NTC passi senza resistenza lungo la lunghezza del filo (trasporto balistico,  $l \gg L$ ).

## TECNICHE DI PRODUZIONE

Ci sono 4 tipi diversi di tecniche:

- Arco elettrico
- Vaporizzazione laser
- Forno solare
- CVD

Dalla prima alla terza abbiamo tecniche che si basano sulla vaporizzazione di un blocco di grafite (altissima temperatura); l'ultima tecnica si basa sulla decomposizione di un precursore gassoso (metano).

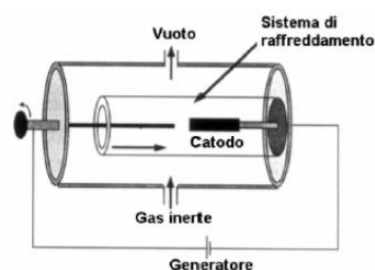
Tutti questi metodi richiedono la contemporanea presenza di una sorgente di carbonio e di un catalizzatore metallico.

**ARCO ELETTRICO:** è il primo metodo utilizzato per la produzione dei nanotubi, ed è molto simile a quello utilizzato per la sintesi dei fullereni.

La camera di reazione viene riempita di gas inerte e successivamente posta sottovuoto controllato. Tra gli elettrodi di grafite viene applicato un potenziale di circa 20V. Si avvicinano quindi tra di loro i due elettrodi, fino ad avere una scarica elettrica di circa 50-200 A (T circa 4000°C) (arco elettrico).

Il carbonio sublimato si deposita sulle pareti del reattore e sull'elettrodo stesso, formando una sorta di "ragnatela".

La sublimazione si ha grazie ad altissime temperature.

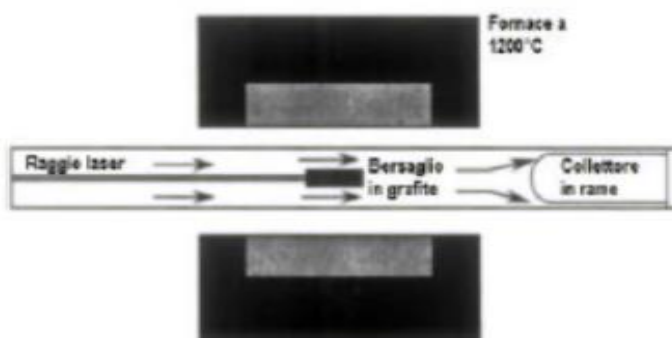


Caratteristiche: il carbonio ottenuto secondo questo metodo presenta una grande varietà di morfologie, tra cui quella dei nanotubi.

- Resa tipica: fino al 30% in peso.
- Vantaggi: alte T e catalizzatori ottimali possono produrre sia SWNT che MWNT con difetti strutturali limitati.
- Limiti: nanotubi corti (50 micrometri o meno) e depositati in dimensioni e direzioni casuali.

**VAPORIZZAZIONE LASER:** variazione del metodo dell'arco elettrico. In questo caso, invece di una scarica elettrica tra i due elettrodi, la miscela di carbonio e metallo viene colpita e vaporizzata da un laser, sublima e poi raccolta su un collettore di rame (vd. Immagine).

Otengo percentuali molto elevate di nanotubi (70-90%) e una qualità migliore.



## CVD (Deposizione chimica per evaporazione)

Consiste nella decomposizione di un gas contenente carbonio (idrocarburi, CO, etc) su un catalizzatore finemente disperso (Co, Ni, Y).

È l'unico metodo continuo (o semi) per la produzione di nanotubi. Vi sono diverse possibili applicazioni a livello industriale.

- Resa tipica: dal 20 al 100% a seconda dei parametri
- Vantaggi: nanotubi più lunghi
- Limiti: generalmente MWNT, alta percentuale di difetti.

## GRAFENE

Il grafene è un monostrato di atomi di carbonio, organizzati in anelli simili a quelli del benzene. Il grafene si ottiene per esfoliazione chimica, crescita epitassiale (CVD), epitassia su superfici catalitiche (Ni, Pt), clivaggio meccanico.

### Proprietà

- Alta mobilità degli elettroni nel grafene (10 volte più alta che nel silicio);
- Trasporto (conduzione) balistico: si osservano superfici con conduzione di tipo quantico
- A temperatura ambiente si osserva l'effetto «quantum Hall».

Si pensa di sviluppare un'elettronica a base di carbonio, ad alto rendimento e bassa potenza. Il grafene è importante anche nella tecnologia per il rilascio di farmaco.

Esempio - articolo scientifico: Questo studio ha dimostrato che la combinazione di Pt e DOX su GO di dimensioni nanometriche funzionalizzate con PEG ha offerto numerosi vantaggi per la terapia del tumore come la riduzione al minimo della tossicità sistemica, il controllo del rilascio di farmaci in ambiente acido del tumore e il miglioramento dell'efficacia terapeutica, implicando che questo sistema di rilascio di due farmaci ha grande potenziale per applicazioni cliniche.

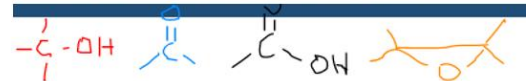
**SCIENTIFIC REPORTS**  
nature portfolio

**PEGylated nano-graphene oxide as a nanocarrier for delivering mixed anticancer drugs to improve anticancer activity**

Khan Haq<sup>1</sup>, Zhou Zhai<sup>2</sup>, Zhong Guo<sup>3</sup>, Junqi Chen<sup>4</sup>, Xizhen Wang<sup>5</sup>, Mingting Cheng<sup>6</sup>, Guohong Chen<sup>7</sup> & Sun Wang<sup>8\*</sup>

Due to their high specific surface area, graphene oxide and graphene oxide have nanoparticles have great potential both in drug delivery and anticancer chemotherapy. Herein, we described highly Pt and Doxorubicin (DOX) dual drug loaded PEGylated nano-graphene oxide (Pt/DOX-PEG-GO) for combined chemotherapy in one system. In this study, nano-sized Pt/DOX ranged around 100–200 nm were fabricated and characterized via atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), zeta potential, and FTIR analyses. The drug delivery efficacy of Pt was enhanced through the introduction of PEG, and the dual drug release of DOX in acidic environment was 4.1% & 37.1%, in vitro studies revealed that the Pt/DOX-PEG-GO nanocomplexes showed a higher growth inhibition than the single drug delivery system in vitro. The Pt/DOX-PEG-GO nanocomplexes were cell apoptosis induction rate with 18.8%, which was observed almost 2 times higher than that of Pt/DOX or Pt/DOX-GO groups. In the apoptosis and necrosis equivalent to in vitro confirmed that the Pt/DOX-PEG-GO dual drug delivery system enhanced the toxicity of Pt and DOX to normal organs compared to free drugs. The tumor inhibition data, histopathology observation, and immunohistochemical staining confirmed that the dual drug delivery system presented a better anticancer effect than free drugs. These results clearly indicated that the Pt/DOX-PEG-GO dual drug delivery system provided the superior combination drug delivery in cancer treatment.

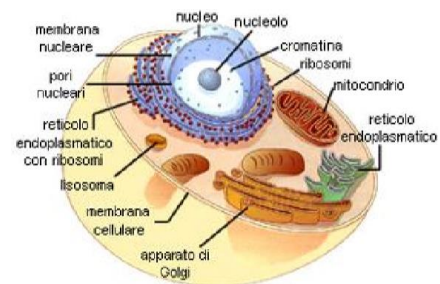
- Graphene is a two-dimensional single layer constituted of sp<sup>2</sup> hybridized carbon, which could supply an excellent drug-load ability with its high specific surface area.
- As a derivatives of graphene, graphene oxide (GO), which could be detected to have hydroxyl, carboxyl, carboxyl and epoxide functional groups on the surfaces of each sheet .
- The presence of those reactive functional groups imparts GO with excellent aqueous solubility, biocompatibility and multi-functionalities, which is essential for the delivery of anticancer drugs.



## MODIFICHE SUPERFICIALI – ADESIONE CELLULARE

La cellula (dal latino piccola camera) è l'unità morfo-funzionale, cioè di forma e di funzione, degli organismi viventi, la più piccola struttura ad essere classificabile come vivente.

Ogni cellula può esser definita come un'entità chiusa ed autosufficiente: essa è infatti in grado di assumere nutrienti, di convertirli in energia, di svolgere funzioni specializzate e di riprodursi se necessario. La cellula è di dimensioni micrometriche, ma in realtà ha una nano-strutturazione interna: esistono proteine sulla superficie con cui la cellula interagisce con l'esterno: matrice extracellulare o superficie ingegnerizzata che permette l'adesione e l'interazione cellulare.

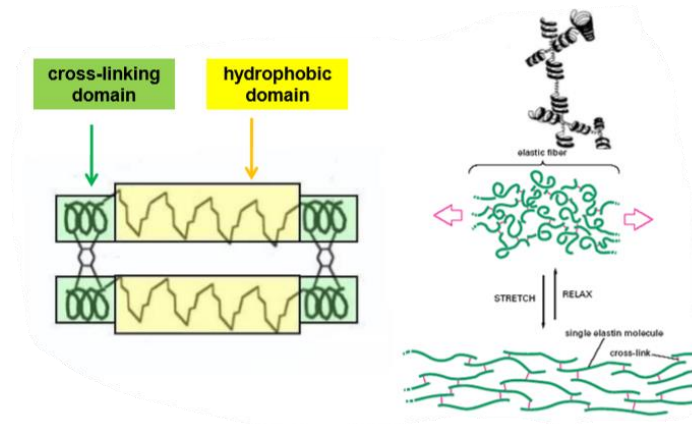


Come comunica la cellula? La **membrana cellulare**, anche detta membrana plasmatica, è un sottile rivestimento, con spessore di 5 nm (50 Å), che delimita la cellula in tutti gli organismi viventi, la separa dall'ambiente esterno (fluido extracellulare) e ne regola gli scambi con questo.

Formata in prevalenza da lipidi, e più precisamente fosfolipidi, viene chiamata anche "doppio strato fosfolipidico". Nella componente lipidica si vanno a collocare, con importanti funzioni fisiologiche, proteine e una piccola percentuale di glucidi, in forma di glicoproteine e glicolipidi, e di molecole di colesterolo che la stabilizzano.

## ELASTINA

È un materiale che presenta polimeri reticolati: presenta parte di domini idrofobici legati ai domini di cross-linking, che donano effetto memoria e quindi un comportamento elastico.



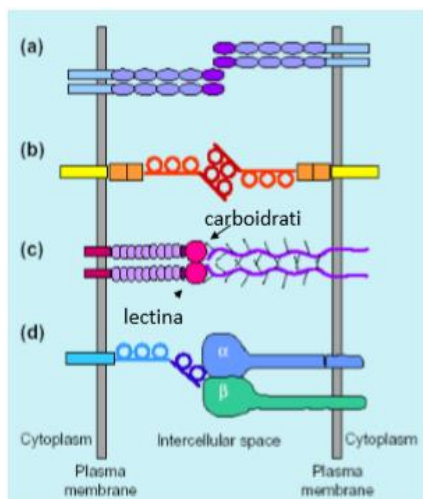
## PROTEINE SPECIALIZZATE

Proteine diverse a seconda dei tessuti analizzati. Classi di glicoproteine che contengono sia aminoacidi che polisaccaridi.

Componente	Struttura	Unità base	Localione
Fibronectina	Glicoproteica	AA e monosaccaridi	Tessuti connettivi. Fattore di legame tra fibre collagene e fibroblasti
Laminina	Glicoproteica	AA e disaccaridi	Membrane basali. Fattore di legame tra collagene IV e cellule.
Osteonectina	Glicoproteica	AA e monosaccaridi	Tessuto osseo. Media l'attacco di $Ca^{++}$ , idrossipatite-collagene I.
Vitronectina	Glicoproteica	AA e monosaccaridi	Fattore di legame tra cellula e ECM
Condronectina	Glicoproteica	AA e monosaccaridi	Cartilagine. Fattore di legame tra collagene IV e condrociti

AA = aminoacidi

## ADESIONE CELLULARE



Le cellule interagiscono non solo con la matrice extracellulare ma anche tra di loro. Le molecole di adesione sono principalmente proteine che costituiscono recettori transmembrana composti da tre domini:

- intracellulare, che interagisce con il citoscheletro;
- transmembrana;
- extracellulare, che interagisce con altre molecole di adesione dello stesso tipo (legame omofilo) o di altro tipo piuttosto che con la ECM (legame eterofilo).

La maggior parte delle molecole di adesione appartiene a quattro famiglie proteiche:

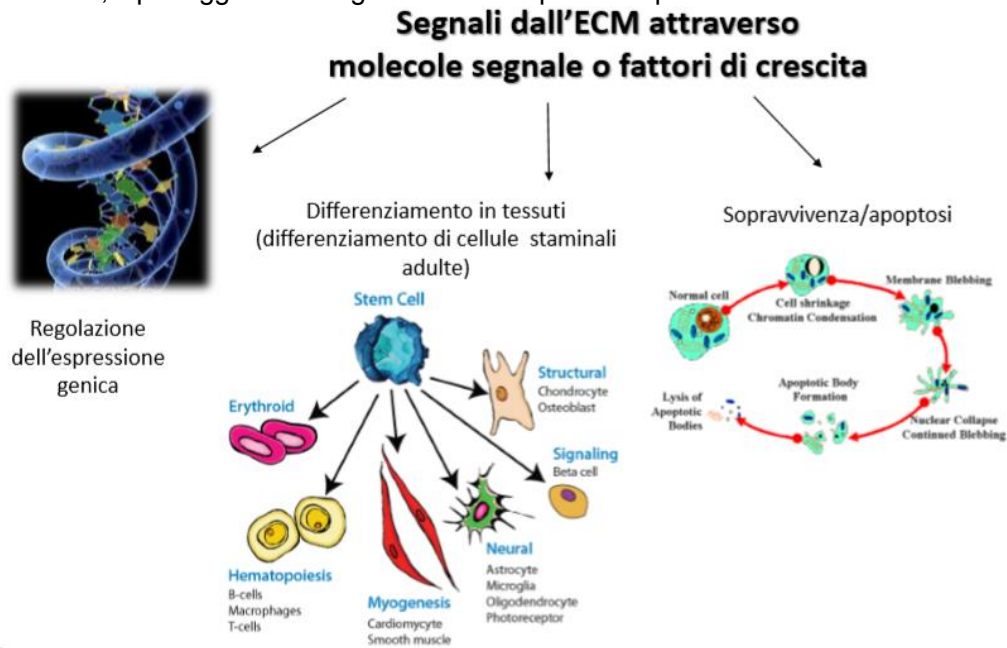
**Caderine:** adesione cellula/cellula

**Superfamiglia Immunoglobuline:** interagiscono con porzioni idrofobiche a foglietto beta



**L'ECM fornisce:**

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



**MECCANISMI DI ADESIONE CELLULARE: INTERAZIONI CELLULA/SUPERFICIE**

La membrana cellulare ha una carica netta negativa. L'adesione sarà modulata da circa 100 tipi di recettori della superficie cellulare che si legano a specifiche sequenze peptidiche o molecole; in assenza di ligandi, l'adesione è elettrostatica (carica netta) o regolata dalla bagnabilità (idrofilicità o idrofobicità della superficie).

Fattori per controllare la forza delle interazioni:

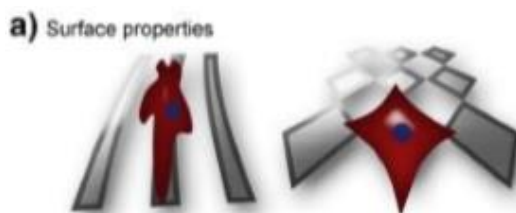
- tensione superficiale;
- la carica superficiale aumenta l'adesione;
- rugosità superficiale:  $A_s$  (area specifica) più alta promuove l'adesione;
- chimica superficiale: ligandi di adesione (fibronectina, collagene, rivestimenti idrofilici) o agenti bloccanti (BSA –albumina da siero bovino-, eparina).

È possibile controllare anche vitalità e crescita cellulare. - Esempio: cellule nervose su polimeri conduttori.

Le cellule diffondono sulla superficie, cercando le interazioni migliori con la superficie.

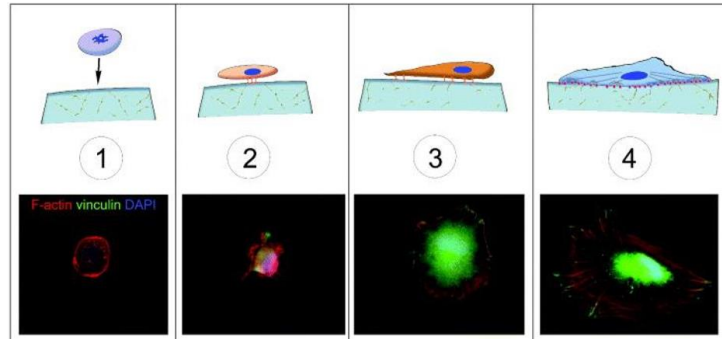
I meccanismi di adesione cellulare tengono conto di alcune proprietà che ne modificano il comportamento:

- a) Proprietà della superficie. La topografia superficiale potrebbe favorire l'adesione, la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule.



Dal punto di vista dell'adesione, possono essere individuati siti di adesione di diverso tipo:

- **ADESIONE FOCALE** → adesione molto forte tramite recettori specifici per le proteine adesive. Il legame è di tipo ligando-recettore che induce un cambiamento conformazionale dei siti recettoriali di membrana (proteine transmembrana) ed innesca una precisa risposta biochimica.



- **CLOSE CONTACT** → siti meno forti di adesione che in genere circondano l'adesione focale.
- **CONTATTO con la ECM** → legami elettrostatici tra membrana cellulare e il substrato della matrice

### ADESIONE NEI PUNTI FOCALI

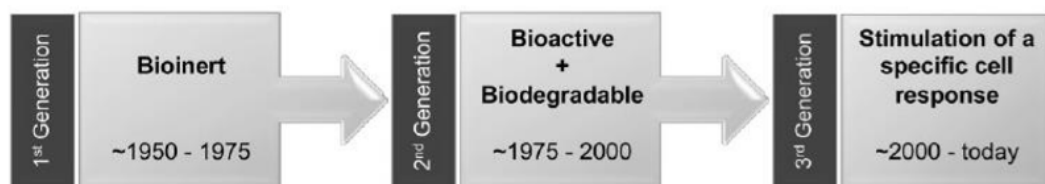
**Complessi focali:** Piccole strutture che contengono integrine e molecole associate, situate sul bordo di lamellipodi. Possono essere transienti o evolvere in adesioni focali, in seguito a forze di tensione generate all'interno della cellula o applicate dall'esterno (perturbazioni meccaniche) **Meccanosensori:** trasformano una perturbazione meccanica in un segnale che promuove la formazione di adesioni focali e attiva il signalling delle integrine.

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.

### PROGETTARE E COSTRUIRE "MATERIALI BIOMIMETICI"

**Biomateriale** → materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo.

Fino ad adesso si sono avute **3 generazioni di biomateriali**, grazie all'avanzamento delle tecnologie e dei diversi obiettivi scelti:



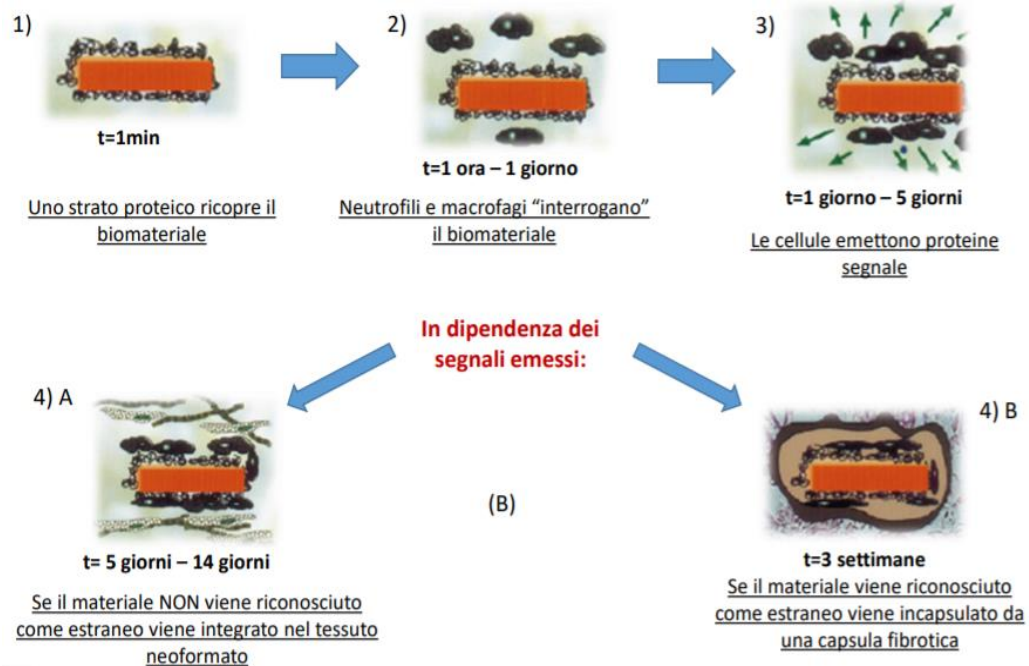
**OBIETTIVO:** individuazione di materiali con proprietà funzionali adatte alla sostituzione di un tessuto danneggiato, e in grado di non provocare risposte negative da parte dell'organismo ospite. Questi materiali (es. gomma siliconica) non nascono per applicazioni biomedicali, ma vengono presi in prestito da altri settori poiché possiedono proprietà che li rendono adatti per applicazioni cliniche. Questi materiali sono definiti bioinerti poiché non innescano alcuna reazione nell'organismo ospite né di rifiuto né di riconoscimento.

I materiali di II generazione vengono definiti bioattivi poiché suscitano nel tessuto in cui vengono impiantati risposte non banali, controllate e desiderate. Nei medesimi anni viene anche sviluppato il concetto di biomateriali degradabili con velocità di degradazione compatibili con le richieste derivanti dal tipo di applicazione; in questo modo, il materiale viene degradato dall'organismo e rimpiazzato con tessuto di neoformazione.

I biomateriali di III generazione stimolano reazioni precise a livello molecolare. Questi materiali si prestano allo sviluppo di scaffold in grado di attrarre cellule endogene *in vivo* o essere seminati con cellule *in vitro* e poi impiantati. Uno scaffold con specifiche informazioni chimico-strutturali può controllare la formazione di un tessuto mimando le comunicazioni cellula-cellula. I materiali che appartengono a questa categoria sono definiti biomimetici.

## **INTERAZIONI TRA BIOMATERIALE E TESSUTI**

- 1) Entro 1 minuto proteine in superficie formano uno strato proteico che ricopre il biomateriale
- 2) Da 1 ora a 1 giorno le cellule del sistema immunitario (neutrofili e macrofagi) cercano di capire se le cellule del biomateriale sono accettabili o meno
- 3) Da 1 a 5 giorni, le cellule emettono dei segnali attraverso le proteine (citochine).
- 4) A seconda del segnale emesso, entro 5-14 giorni:
  - A) se materiale è riconosciuto come non estraneo: integrato nel tessuto neoformato.
  - B) se materiale estraneo: materiale incapsulato da una capsula fibrotica che lo isola



### **Interazioni proteina/superficie**

Le proteine possono aderire a quasi ogni tipo di superficie grazie alla presenza di strutture idrofiliche e idrofobiche, così come residui con carica positiva e negativa.

Creano dei legami (ordine di forza di legame: Elettrostatico > legami Idrogeno > forze di dispersione)

Una superficie ultra-idrofilica o ultra-idrofobica riduce l'assorbimento.

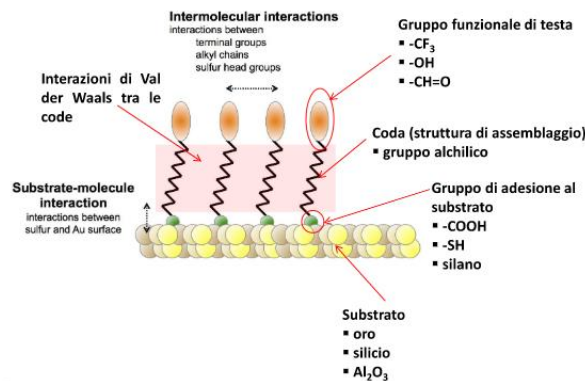
Infatti, le proteine possono denaturarsi (perdita della sua conformazione tridimensionale) sulla superficie, annullando la loro funzionalità, o possono riarrangiarsi per alterare la loro funzione. Posso avere:

- Forze entropiche associate con lo spostamento di acqua adsorbita sulla superficie (solvente), e aumento delle configurazioni delle proteine adsorbite rispetto a quelle in soluzione.
- Localmente elevata concentrazione alla superficie (può essere dipendente dalla concentrazione)
- Siti di legame possono essere occlusi o la conformazione alterata

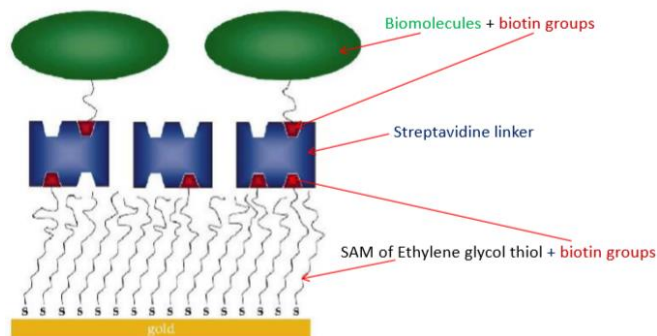
Si nota un effetto dinamico al passare del tempo chiamato Effetto Vroman: sostituzione di una proteina (con elevata affinità per la superficie) per un'altra su una superficie al passare del tempo.

## SELF ASSEMBLED MONOLAYER (SAM)

Sono film di ricopertura superficiale che spontaneamente formano strutture altamente ordinate su specifici substrati. I gruppi funzionali di testa servono a dare determinate funzioni.



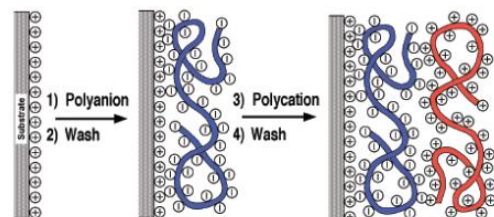
In generale è una tecnica molto versatile. Preferibilmente si usa una molecola ponte, cioè la Streptavidina, proteina di origine batterica in grado di legare con la biotina (vitamina idrosolubile) mediante un legame ad alta costante di equilibrio e costante di dissociazione molto bassa. La streptavidina contiene 4 siti di legame per la biotina. Se rimarranno dei siti liberi, questi saranno in grado di legarsi ad altre biotine, o molecole biotinate (molecola + gruppo biotino). Creerò un collegamento con un ponte.



## LAYER-BY-LAYER

Una tecnologia per la nanofabbricazione multimateriale di film su superfici accessibili ai solventi di ogni dimensione e forma.

Si parte da una superficie di qualsiasi materiale ma carica che viene immersa in una soluzione con elettroliti carichi in maniera opposta alla superficie. Ottengo quindi un rivestimento con un secondo polimero e poi si ripete l'operazione. Se ero partita da un polianione ottengo un policatione.



La tecnica Layer-by-layer (LbL) permette di ottenere un film multistrato a partire da:

- Polielettroliti sintetici;
- Nanoparticelle inorganiche (ad es. nanoparticelle);
- Lipidi;
- Ceramiche;
- Biomolecole (proteine, polisaccaridi, polipeptidi).



## SISTEMI BIOLOGICI MICRO-ELETTROMECCANICI (BioMEMS)

I BioMEMS sono utilizzati per lo più come sensori biologici, che possono essere suddivisi secondo la classe della molecola che costituisce la parte sensibile del sistema. Possiamo avere:

- Bioriconoscimento enzimatico
- Bioriconoscimento immunologico (o immunosensori)
- Metodi utilizzando DNA per il riconoscimento dei geni
- Metodi di riconoscimento cellulare, che utilizzano composti in grado di modificare la crescita delle popolazioni cellulari o producono in esse alterazioni del metabolismo
- Metodi tessutali

Ci concentriamo per lo più sui metodi utilizzando DNA per il riconoscimento dei geni:

### Rilevamento del DNA - tecnica PCR

Innanzitutto, bisogna amplificare questo materiale, che spesso si presenta in quantitativi piccoli, sfruttando il fatto che il DNA sia auto-replicabile naturalmente. Esiste una tecnica, detta **PCR** che permette di far ciò.

La PCR è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. È una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi.

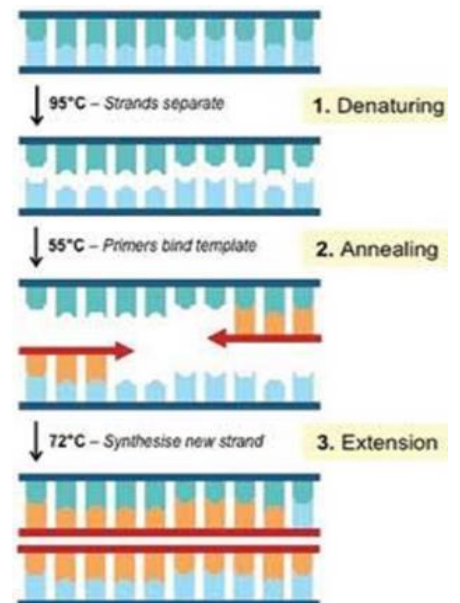
Utilizzando componenti utili alla PCR (campioni di DNA, nucleotidi ecc) e l'enzima polimerasi, posso ottenere il mio DNA replicato.

Si basa sulla esecuzione ciclica ripetuta più volte delle fasi di:

1. **denaturazione** (denaturation) della doppia elica del DNA stampo in due singole eliche alla temperatura di 95°C, utilizzando come enzima il *Taq DNA polimerasi* (enzima termoresistente ottenuto dal microrganismo termofilo *Thermophilus aquaticus*).

2. **ibridazione** (annealing) degli inneschi oligonucleotidici (primer) alla sequenza di DNA a singola elica ad essi complementari e localizzati alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura compresa tra i 50°C e i 70°C)

3. **sintesi** (extension) del DNA complementare allo stampo ad una temperatura compresa tra 68 e 72°C.

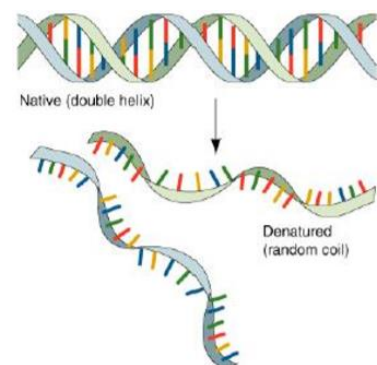


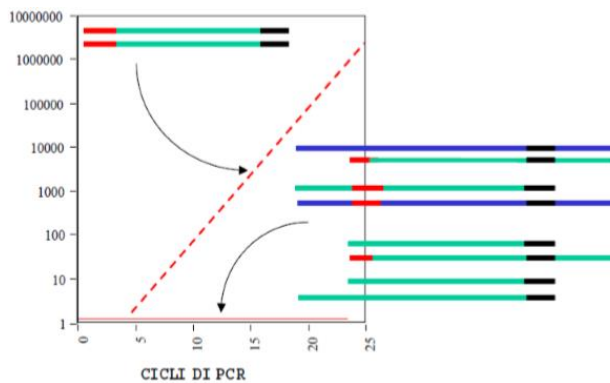
Si ottengono rapidamente milioni di molecole identiche di DNA, perché la crescita risulta essere esponenziale, raddoppiando ad ogni ciclo le catene ottenute nel ciclo precedente.

Vediamo nel dettaglio i vari processi:

### Denaturazione

Il DNA si trova nella classica conformazione a doppio filamento in cui i due filamenti (strands) sono tenuti assieme dai legami idrogeno formati tra le basi azotate complementare (A→T; G→C). Il DNA deve essere portato ad una condizione di singola elica in modo che successivamente si verifichi l'ibridazione (annealing) delle molecole di primer (anch'esse a singolo filamento). Per fare ciò la soluzione contenente DNA viene portata a una temperatura al di sopra della sua temperatura di fusione  $T_m$ , nella quale i legami ad idrogeno, non più stabili, permettono la separazione dei due filamenti.





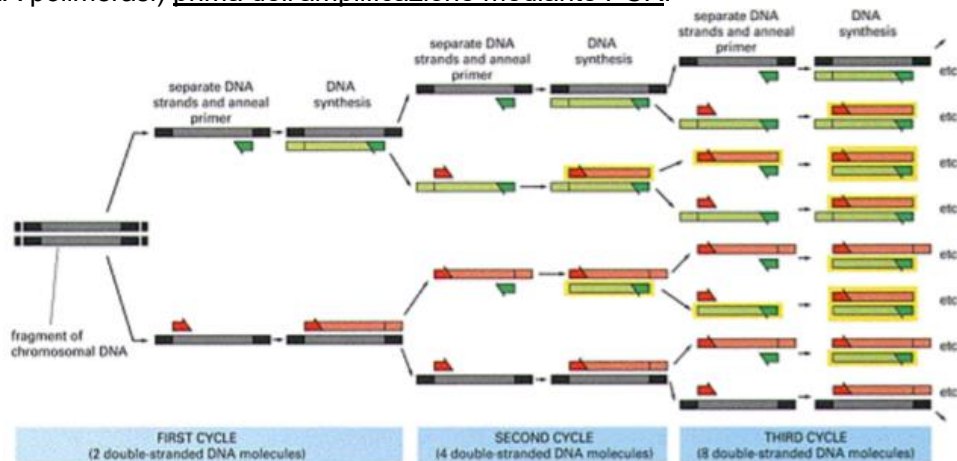
Il grafico in figura mostra la crescita esponenziale delle molecole di DNA prodotto (verdi) tramite PCR a partire da una molecola campione di DNA (blu)

### Funzionamento della PCR

Il materiale di partenza può essere o un frammento di DNA clonato o una miscela di molecole di DNA. 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 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.

Anche le sequenze di RNA possono essere amplificate mediante PCR, ma prima è necessario sintetizzare una copia di cDNA (DNA complementare, da RNA ottengo DNA) utilizzando una trascrittasi inversa (DNA polimerasi) prima dell'amplificazione mediante PCR.



### Utilizzo della PCR

La PCR può essere effettuata su DNA genomico per:

- identificare un determinato individuo (medicina legale)
- identificare la presenza di un determinato microorganismo (ad es. un microorganismo patogeno)
- individuare eventuali mutazioni
- clonare regioni genomiche: i geni sono classificati come esoni (trascrivibili, con informazioni utili) o introni (porzioni di DNA non espresse, non trascritte).

## **ELETTROFORESI**

L'elettroforesi è senza dubbio una delle tecniche maggiormente utilizzate che permette la separazione, la visualizzazione e la purificazione di molecole di interesse biologico quali acidi nucleici e proteine. Tale separazione è resa possibile sia dal peso molecolare sia dalla carica elettrica di cui sono dotate le particelle, ioni o macromolecole. Tali particelle poste in un campo elettrico generatosi dalla d.d.p. applicata a due elettrodi, si muoveranno in direzione dell'elettrodo di carica opposta, quelle cariche positivamente verso il polo negativo e viceversa.

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

La tecnica dell'Elettroforesi può avvenire su vari supporti, tra cui

1. Carta (elettroforesi delle globuline del sangue)
2. Fase liquida (all'interno di capillari)
3. Su gel

**L'elettroforesi in gel** è il metodo standard utilizzato per separare, identificare e purificare frammenti di DNA. Nell'elettroforesi su gel c'è un mezzo di supporto che agisce impedendo disturbi meccanici e di convezione durante la migrazione e che serve da setaccio molecolare per separare le molecole, provviste della stessa carica, in base alle dimensioni. La matrice può essere costituita da poliacrilammide, agarosio o una miscela di questi. I gel di agarosio sono largamente impiegati per separare molecole di DNA di dimensioni maggiori di 100 bp, mentre si ricorre ai gel di acrilammide quando serve una risoluzione maggiore per frammenti di DNA di piccole dimensioni.

Il gel viene preparato in opportuni tamponi, identici a quelli posti nella vaschetta elettroforetica, per consentire il passaggio di corrente:

-TBE (Tris Borato EDTA)

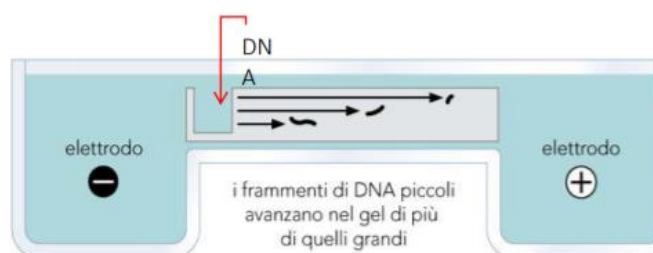
-TAE (Tris Acetato)

I gel possono essere neutri o denaturanti a seconda che essi permettano la migrazione di doppie o singole eliche. La denaturazione è di solito permessa grazie all'aggiunta di agenti (es. Formammide, Urea). Per entrambi i gel, si assembla il sistema su un apparecchio per elettroforesi o cella elettroforetica.

I sistemi orizzontali offrono il vantaggio di poter in ogni istante analizzare la corsa elettroforetica in quanto non contemplano l'assemblaggio delle lastre di vetro alla vaschetta. È quindi possibile anche ad intervalli ravvicinati rimuovere il gel (solitamente di agarosio perché più resistente alle varie manipolazioni) ed analizzare la migrazione delle bande. Tutte le celle elettroforetiche sono costituite da 2 vaschette contenenti il tampone (TAE o TBE) ed in comunicazione tra loro, alle quali sono collegati il polo negativo e positivo tra cui si genera una d. d. p.

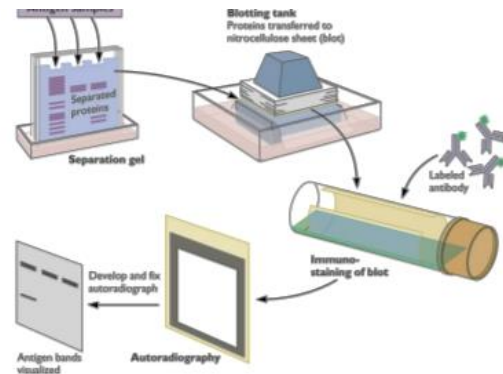
Gli acidi nucleici migrano sempre verso il polo positivo per la presenza nella loro molecola di cariche negative dei gruppi fosfato ( $PO_4^{2-}$ ). Il risultato della corsa elettroforetica consisterà in una serie di bande. Sul gel si depone anche una miscela di frammenti a PM noto (MARKER) che servirà per il calcolo della lunghezza in basi delle bande incognite.

Il sistema è collegato ad un alimentatore in grado di creare il campo elettrico. Grazie al campo elettrico generatosi la miscela di frammenti comincerà a migrare verso il polo positivo in base al loro diverso peso molecolare: quelle più pesanti (a maggior PM) migreranno più lentamente rispetto a quelle più leggere (a minor PM), che a loro volta migreranno più velocemente.



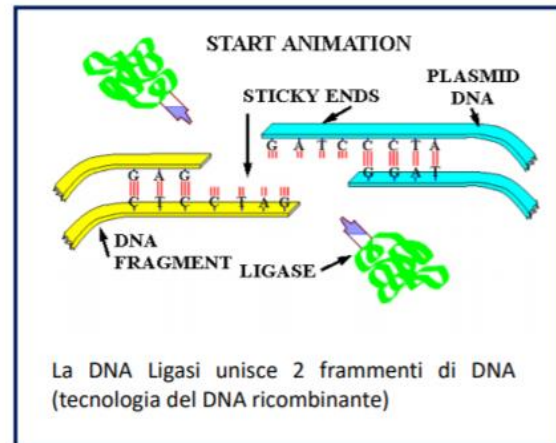
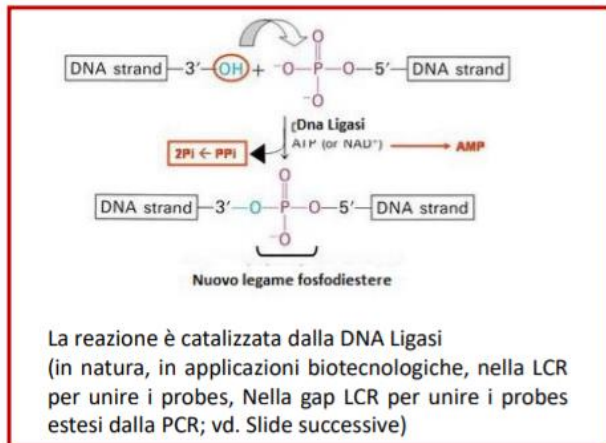
## 2) WESTERN BLOTTING

**Western blotting:** usato per l'identificazione di proteine; le proteine presenti sugli estratti cellulari sono dapprima separate in accordo con le dimensioni secondo la tecnica di elettroforesi su gel di poliacrilammide. Le proteine ottenute vengono trasferite a un filtro il quale viene fatto reagire con l'anticorpo e successivamente si rileva l'anticorpo attraverso diverse tecniche (es. chemiluminescenza).



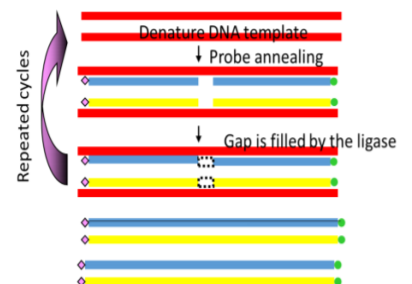
## LIGASE CHAIN REACTION (LCR)

È una metodica che permette l'amplificazione di materiale genetico sfruttando un processo ciclico che viene ripetuto più volte. A differenza della PCR, però, viene sfruttata l'azione di una ligasi termostabile e la presenza di quattro oligonucleotidi in grado di appaiarsi, a due a due, a specifiche sequenze della molecola di DNA.



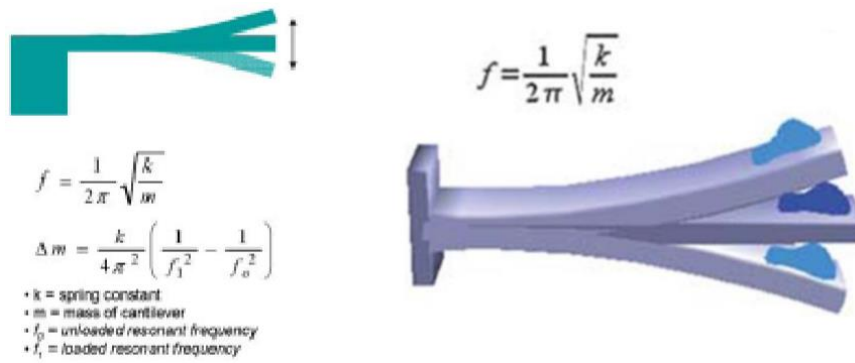
I passi della tecnica sono i seguenti:

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



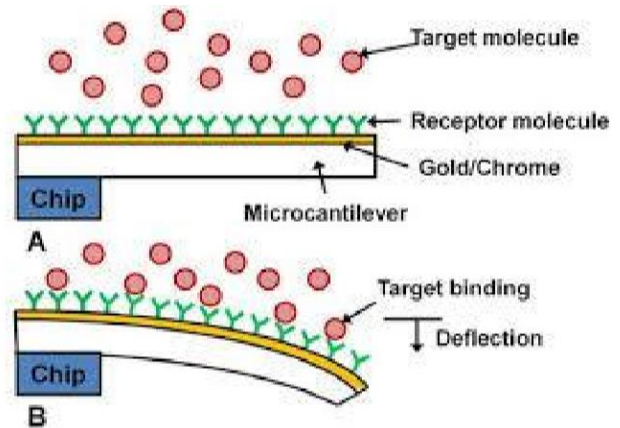
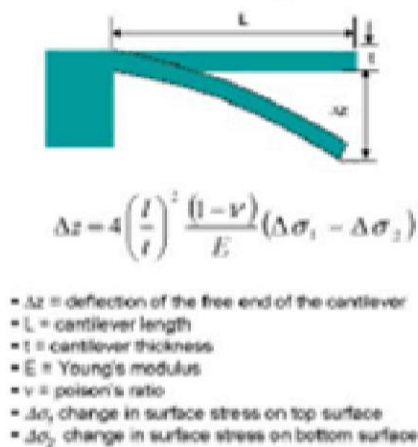
La **rilevazione** nella LCR avviene tramite la cattura con microparticelle e un saggio immunoenzimatico. Ogni probe ha un raggruppamento antigenico "di cattura", che si lega a un anticorpo legato ad una particella magnetica (o raggruppamento "di rilevazione"). Questo fa sì che ogni segmento amplificato, dove la ligasi ha sempre unito 2 probes, abbia un terminale con un raggruppamento di rilevazione ed uno di cattura.





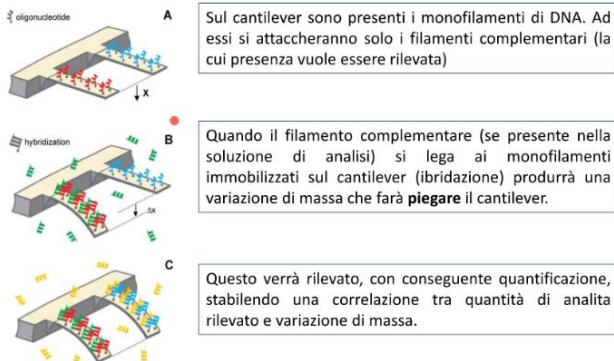
### Reazione biochimica

La rilevazione meccanica tramite reazioni biochimiche viene fatta facendo 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.



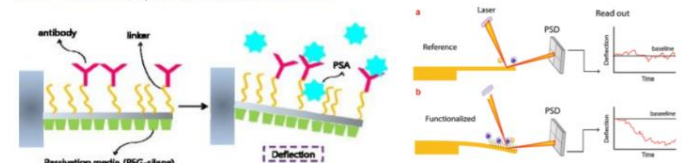
### Esempi:

#### Rilevazione di DNA:



#### Rilevazione dei marker tumorali:

I cantilever vengono rivestiti con anticorpi in grado di legarsi con specifiche proteine secrete dalle cellule tumorali. Questi anticorpi sono specifici per diverse proteine. Quando un anticorpo lega una specifica proteina, le proprietà fisiche del cantilever cambiano a causa del legame che si instaura tra le due entità (**oscillazione del cantilever**). Le misure possono essere fatte in tempo reale e le informazioni che si possono ricavare sono riferite alla presenza e assenza di specifici marker e della loro concentrazione. L'inclusione del cantilever all'interno di un dispositivo di diagnostica può permettere un riconoscimento rapido dei marker tumorali.



### 3. RILEVAZIONE ELETTRICA

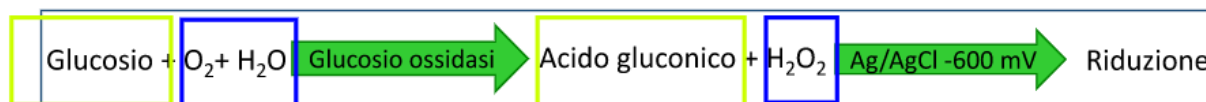
La rilevazione elettrica si basa su 3 tipi fondamentali di sensori

- I. Conduktivometrici
- II. Amperometrici
- III. Potenzimetrici

#### Sensori Amperometrici

L'esempio più rappresentativo di questi sistemi è basato su una reazione redox catalizzata da un enzima dove la corrente di elettroni risultante viene misurata a livello dell'elettrodo di lavoro.

Un esempio può essere la rilevazione del glucosio: i biosensori per questo tipo di rilevazione sono basati sull'enzima glucosio ossidasi, che genera perossido di idrogeno e acido gluconico in presenza di ossigeno, glucosio e acqua. La riduzione genera corrente che viene misurata.



#### Sensori Potenzimetrici

Questi sensori misurano un cambiamento di potenziale agli elettrodi causato da ioni o da una reazione chimica ad un elettrodo.

I Transistor a effetto di campo (Field Effect Transistor (FET)) sono la tecnologia alla base dei sensori potenziometrici. Questi sono maggiormente utilizzati per la misura del pH e il riconoscimento molecolare (in quest'ultimo caso si parla in particolare di BioFET).

La modifica dei sensori MOSFET può avvenire tramite:

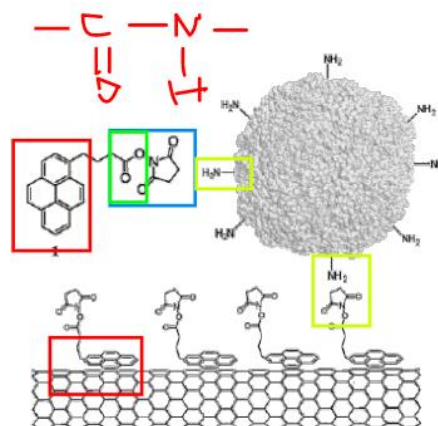
- nanowires di silicio
- nanotubi di carbonio

Ad esempio, è possibile legare ai nanotubi l'enzima glucosio ossidasi che in presenza di glucosio porta alla nascita di una grandezza elettrica.

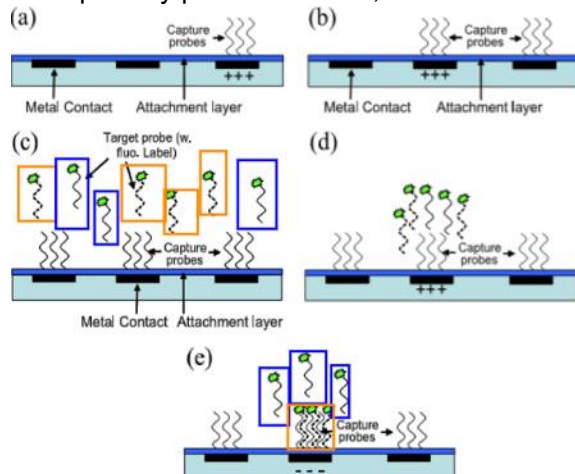
Esempio:

Immobilizzazione di proteine: vi è l'immobilizzazione di piccole proteine come la Zn-Cd metallotioneina, all'interno di nanotubi di carbonio. Tali proteine possono legarsi sia alle superfici esterne che interne dei nanotubi. L'immobilizzazione di molecole biologiche dentro i nanotubi presenta un alto grado di controllo e specificità.

Vi è una molecola bifunzionale (estere attivo dell'acido 1-pirenbutanoico) assorbita irreversibilmente all'interno delle superfici idrofobiche del SWNT in soluzione (DMF o metanolo). Il gruppo pirene, essendo altamente aromatico, interagisce fortemente con le pareti del nanotubo, creando un punto di aggancio per l'intera molecola bifunzionale sul nanotubo (p-stacking). Avviene la funzionalizzazione del SWNT con esteri reattivi (succinimidilestere) e la creazione di legame ammidico con i gruppi amminici sulle proteine.



**Tecnica elettrica:** È usata per immobilizzare sequenze più lunghe. L'approccio elettrico trae vantaggio dal fatto che gli oligonucleotidi ed il DNA hanno una carica negativa, dovuta allo "scheletro" di fosfato, che ne permette il trasporto elettroforetico in specifiche zone della superficie del chip cariche positivamente. Questo comporta una maggiore concentrazione locale ed un'accelerata ibridazione. L'approccio elettrico può essere utilizzato per indirizzare ogni elemento (pixel), così l'array viene costruito pixel by pixel dall'utente, come mostrato.



Sintesi di DNA micro-array mediata da campo elettrico.

- a,b) I capture probes vengono indirizzati sequenzialmente a specifici siti;
- c) Si analizza il campione costituito da target probes marcati
- d) La tensione applicata ai siti specifici incrementa la concentrazione locale ed avviene l'ibridazione;
- e) I filamenti non ibridizzati vengono rimossi

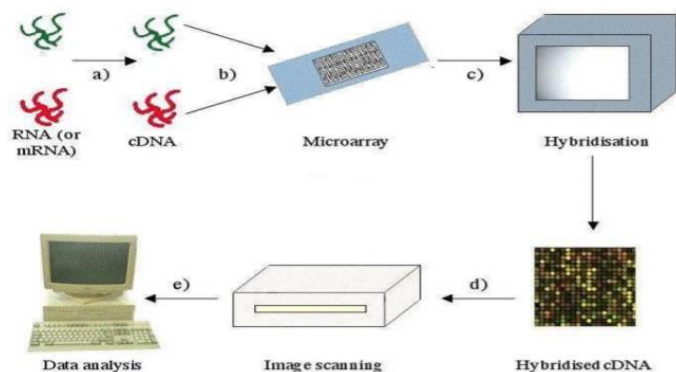
Le sequenze continue se ne vanno, le sequenze discontinue, quindi quelle complementari, rimangono legate alla regione.

Nel passaggio (b) ho uno strato di rivestimento detto 'attachment layer' che mi permette di tenere legate le molecole di DNA quando cesso il caricamento dello spot. Quindi posso avere formazione di un legame ionico o gruppi amminici. Per esempio posso avere:

- Superfici rivestite con Amminosilano  
DNA non modificato può essere legato a superfici ammino-modificate mediante interazioni tra gruppi fosfato (carichi negativamente) presenti sul DNA e le superfici cariche positivamente. Questa interazione aiuta ad assicurare la denaturazione del DNA così come ad aumentarne l'affinità di legame con la superficie. Il trattamento UV può essere usato per favorire ulteriormente l'immobilizzazione del DNA sulla superficie. L'attacco attraverso interazioni 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.
- Superfici rivestite con Aldeidi  
DNA ammino-modificato può essere legato a microarray modificati con gruppi aldeidici. Il gruppo amminico può essere introdotto all'interno del DNA in una reazione di amplificazione PCR mediante l'utilizzo di oligonucleotidi non modificati.

**Protocollo di analisi**

- a) RNA o mRNA viene prelevato dal campione di interesse e convertito in cDNA
- b) cDNA viene applicato al microarray
- c) Il cDNA target e le probes sono ibridizzate in specifiche condizioni
- d) Il chip viene scannerizzato e convertito in dati grezzi per la successiva analisi tramite software dedicato (e)





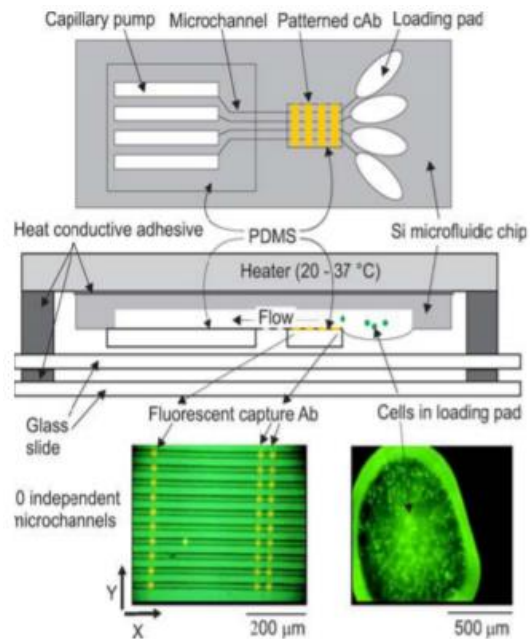
### Esempio applicativo: Saggio immunologico

Lo scopo del sistema è intercettare cellule tumorali sfruttando il fatto che queste cellule hanno proteine extra membranali diverse da quelle sane. È un saggio immunologico a micromosaico per lo screening di recettori cellulari. Viene usato un Chip Microfluidico con 11 percorsi di flusso. Le cellule si muovono su 11 linee di superfici funzionalizzate con anticorpi che sono disposti su linee di 30 m di larghezza. Il dispositivo è chiuso da uno strato di PDMS. Ci sono anticorpi anti-CD44, con cellule di topo aventi recettori per CD44 (derivati dei globuli bianchi).

Scorrendo il dispositivo da destra a sinistra si nota la zona in cui viene alimentato il chip con il campione. Il campione è costituito dalle cellule da analizzare. La zona successiva è costituita dai canali contenenti gli anticorpi distribuiti secondo uno specifico pattern.

Troviamo poi i micro-canali in cui le cellule scorrono e infine le pompe che aspirano il liquido lungo il canale. Nella vista laterale, si può notare che nella parte superiore è presente un riscaldatore (mantiene la temperatura fisiologica per le cellule) e un "recipiente" per il caricamento delle cellule (pallini verdi).

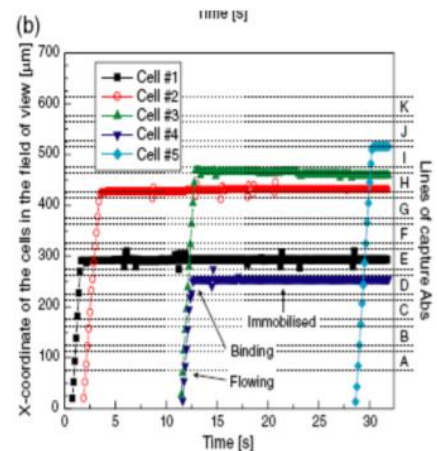
Le cellule scorrono sugli anticorpi (anch'essi marcati). Nel punto in cui la cellula si ferma e si lega all'anticorpo troveremo un segnale fluorescente.



Nel grafico, possiamo notare 3 zone:

1. **flowing**: le cellule vengono "sparate" nel dispositivo e iniziano a fluire;
2. **binding**: arrivano alla zona in cui sono presenti gli anticorpi;
3. **immobilised**: la cellula si lega con l'anticorpo e viene immobilizzata perché presenta sulla sua membrana il recettore per quell'anticorpo.

Nel grafico sono presenti linee che non hanno cellule immobilizzate; questo perché le particolari cellule di questo esempio non presentavano il recettore per l'anticorpo.



### Esempio applicativo: i-insulin

In questo caso si vede il rilascio di insulina intradermico quando il livello di mucosa si alza.

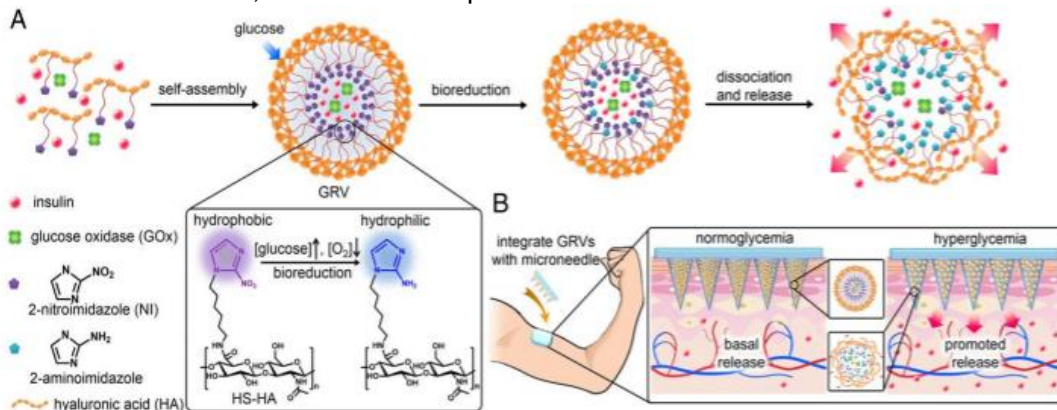
La stragrande maggioranza dei casi di diabete rientra in due grandi categorie eziopatogenetiche:

- **diabete di tipo 1**: la causa è un'assoluta carenza di secrezione di insulina.
- **diabete di tipo 2** (categoria molto più diffusa): la causa è una combinazione di resistenza all'azione dell'insulina e una risposta secretoria dell'insulina compensativa inadeguata, conseguenza l'iperglicemia. Prove crescenti stanno dimostrando che non esiste l'iperglicemia senza disfunzione delle cellule beta. In effetti, la maggior parte delle persone che sviluppano insulino-resistenza (a causa dell'obesità, ad esempio) può aumentare la secrezione di insulina in modo appropriato e mantenere l'omeostasi del glucosio per anni, evitando l'insorgenza del diabete. In particolare, il deterioramento del controllo del diabete e la funzione secretoria dell'insulina si verificano dopo anni nei pazienti diabetici di tipo 2 nonostante la resistenza all'insulina rimanga stabile. Pertanto, la disfunzione delle cellule beta è fondamentale per lo sviluppo del diabete, probabilmente a causa di una combinazione di ridotta massa di cellule beta e difetti della secrezione di insulina.

Gli enzimi rilasciati conformemente idrolizzano l' $\alpha$ -amilosio incorporato nella matrice del microneedle, generando un sito locale concentrato di glucosio. Il glucosio "amplificato" si diffonde efficacemente nelle cellule  $\beta$  posizionate esternamente le capsule, promuovendo la secrezione e la diffusione dell'insulina nel sistema vascolare e nei capillari linfatici.

La catena principale è acido ialuronico che a livello di un residuo pendente presenta una molecola che riporta un gruppo nitro NO<sub>2</sub>. Quando aumenta il glucosio l'ossigeno diminuisce, quindi ho una riduzione che forma un gruppo amminico NH<sub>2</sub>. I gruppi "pendenti" da idrofobici diventano idrofilici con una struttura come in figura.

Quando avviene la riduzione, la micella si rompe e viene rilasciato il suo contenuto.



Per ottenere una trasduzione sensibile all'ipossia è stato usato 2-nitroimidazolo, un componente idrofobo che è stato spesso applicato nell'imaging del cancro a causa della sua elevata sensibilità all'ipossico nei siti tumorali.

Il 2-nitroimidazolo può essere convertito in 2-aminoimidazoli idrofili in condizioni ambientali ipossiche tramite una riduzione a singolo elettrone.

Abbiamo coniugato 2-nitroimidazolo funzionalizzato con ammina con acido ialuronico (HA), che è ben noto per avere eccellente biocompatibilità e biodegradabilità.

Attraverso l'autoassemblaggio, l'acido ialuronico sensibile all'ipossia anfifilica (HS-HA) può prontamente formare vescicole sensibili al glucosio rilasciando glucosio ossidasi,  $\alpha$ -amilasi e amiloglucosidasi in una soluzione acquosa.

In presenza di un livello elevato di glucosio nel sangue, l'ossigeno disciolto può essere rapidamente consumato a causa dell'ossidazione del glucosio catalizzata da GOx, che ha prodotto un ambiente ipossico locale.

I gruppi di 2-nitroimidazolo sull'HS-HA sono stati quindi ridotti in 2-aminoimidazoli idrofili in condizioni bioreduttive, che ha portato alla dissociazione del glucosio responsabile delle vescicole e del successivo rilascio di enzimi.

### Componente vivo sensibile al glucosio

Per creare il componente "vivo" sensibile al glucosio del dispositivo, le linee cellulari  $\beta$  del topo sono state incapsulate nei microgel di alginato con peptidean di Arg-Gly-Asp (RGD) e collagene di tipo IV per fornire una matrice con interazioni biomimetiche cellula-ECM.

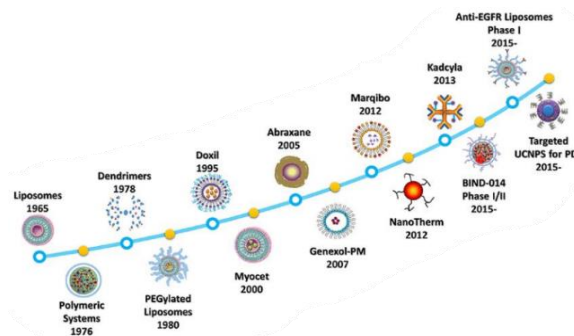
L'incapsulamento è stato visualizzato mediante microscopia a fluorescenza con le cellule concentrate e la distribuzione omogenea dell'insulina secreta che circonda le capsule. La dimensione della capsula ottenuta era  $735 \pm 27 \mu\text{m}$ .

Successivamente sono state eseguite l'analisi della secrezione di insulina stimolata dal glucosio e il saggio vivo-morto dal giorno 1 al giorno 3 per confermare che le cellule incapsulate erano ancora vive.

# NANOMEDICINA

È una scienza ed è l'applicazione medica alle nanotecnologie. Nasce nel 1910, precedentemente alle nanotecnologie, con Ehrlich che ipotizzò che potessero essere trovati dei farmaci specifici per determinate tossine al fine di avere un trattamento più specifico e una riduzione degli effetti collaterali. Nel 1975 poi viene pubblicato il primo articolo in cui si parla di nanomedicina.

A lato una serie di farmaci sviluppati negli ultimi decenni (10 farmaci approvati – pochi a causa della presenza di barriere nell'uomo molto efficienti rispetto a quelle animali).

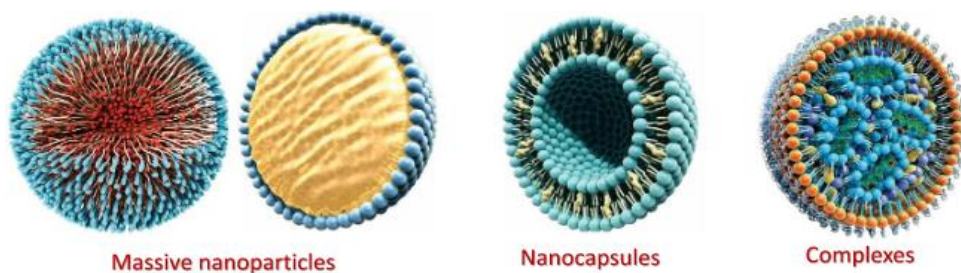


## Cosa sono le nanomedicine?

Rappresentano sia la scienza che il prodotto stesso della scienza. Nello specifico: una formulazione di farmaci all'interno di portatori di dimensioni nanometriche (nanoparticelle). Una "nanomedicina" è una medicina nano-formulata. Le nanomedicine combinano la capacità di curare e rilevare delle malattie.

Una classificazione in 3 grandi categorie delle nanoparticelle:

- **Massive:** quando la particella è piena di un materiale massivo (non è vuota) e il farmaco risulta disperso nel materiale che costituisce la particella stessa.
- **Nanocapsule:** il materiale che costituisce la particelle è un guscio (shell, in materiale o polimerico o inorganico) e il farmaco è sia nella cavità che all'interno del guscio.
- **Nanocomplesso:** quando il farmaco da rilasciare possiede una carica e il guscio possiede la carica opposta. In genere viene usato quando vengono incapsulati acidi nucleici di DNA/RNA che hanno una carica negativa: quindi posso usare dei materiali polimerici per incapsularli che presenteranno carica opposta in modo da formare un nanocomplesso.



In questa macro-classificazione possiamo suddividere le nanomedicine in base al materiale di composizione:

- **Nano carriers a base lipidica:** a loro volta liposomi (nanocapsula), liposomi stealth (che circolano più a lungo nel vaso sanguigno), nanoparticelle solide lipidiche (massiva).
- **Nano carriers a base polimerica:** particelle polimeriche massive, particelle ottenute con la tecnologia NAB (il farmaco viene legato con l'albumina in una sorta di nano-carrier – alla base del farmaco Abraxain) e micelle polimeriche con polimeri anfifilici (porzione idrofobica + porzione idrofilica).
- **Nanoparticelle inorganiche:** metalliche, a base di ossido di silicio e i quantum dots (sono fluorofori). Queste sono usate tipo per fare imaging (diagnosi o follow up) o rilasciare farmaci.
- **Nanoparticelle virali:** usate in vitro per la trascrizione di una sequenza genica diversa nella cellula studiata.
- **Farmaci coniugati:** farmaco legato a un polimero e modificato alla nanoscala.