

PLS – Piano nazionale Lauree Scientifiche

Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff" – UNIFI

Liceo scientifico A.M.Enriques Agnoletti

a.s. 2014-2015

NANOPARTICELLE PER USO MEDICO

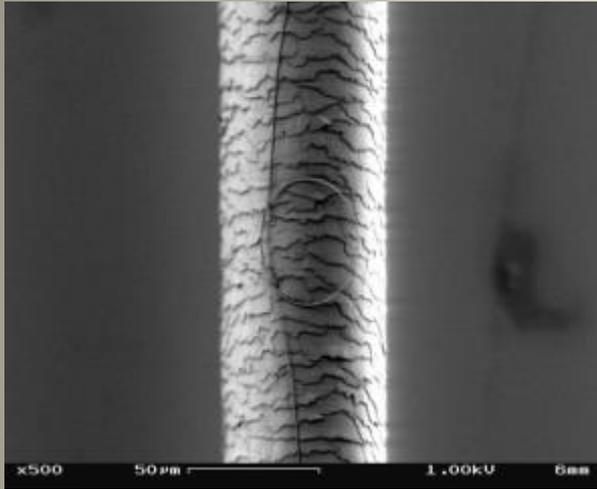


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

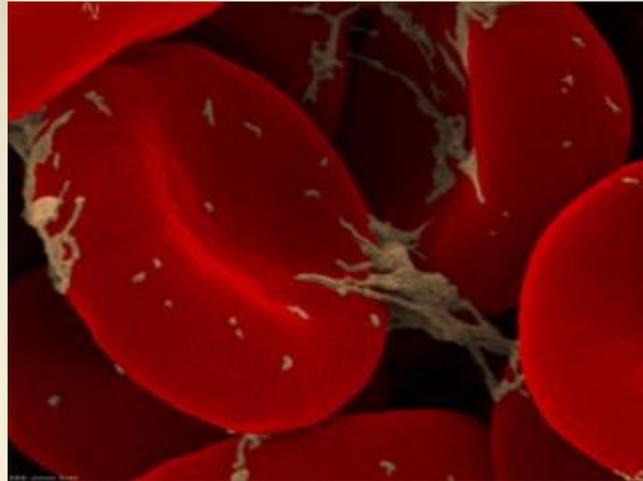
OpenLAB
EDUCAZIONE E DIVULGAZIONE
SCIENTIFICA

Con il termine nanoparticella si identificano normalmente delle particelle formate da aggregati atomici o molecolari con un diametro compreso indicativamente fra 2 e 200 nm.

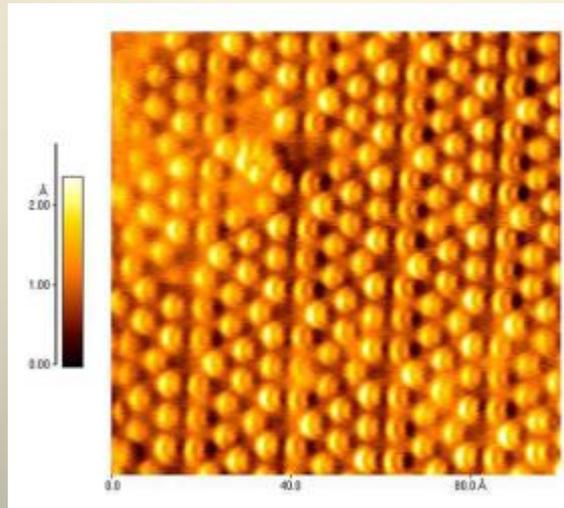
Per dare un'idea dell'ordine di grandezza:



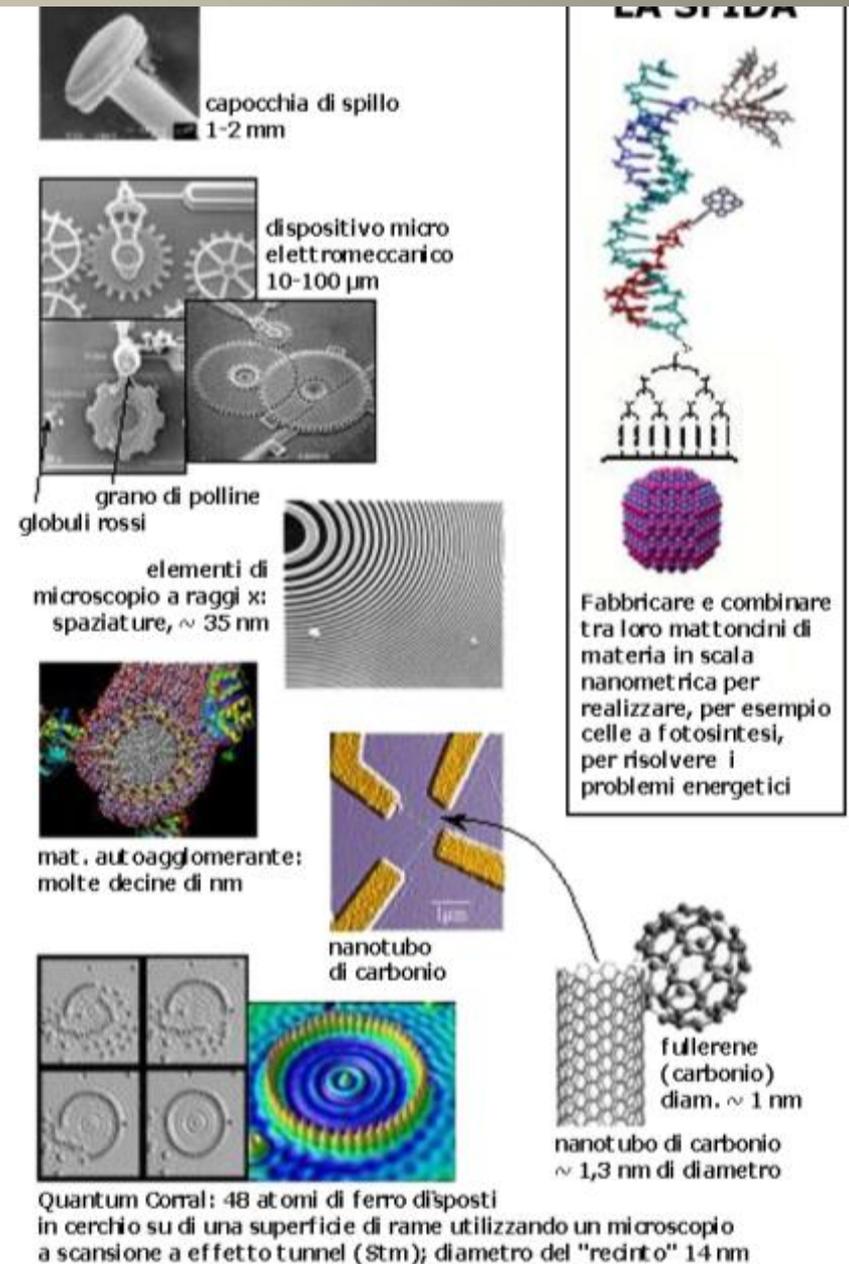
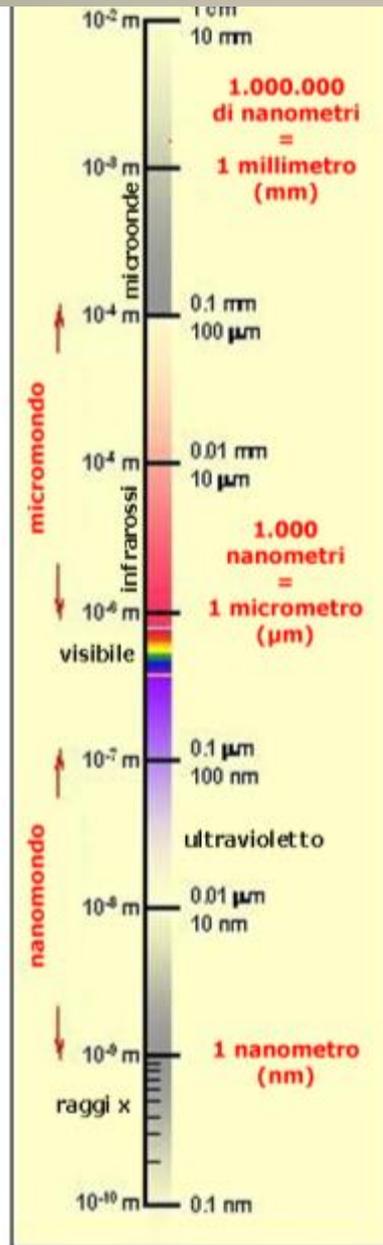
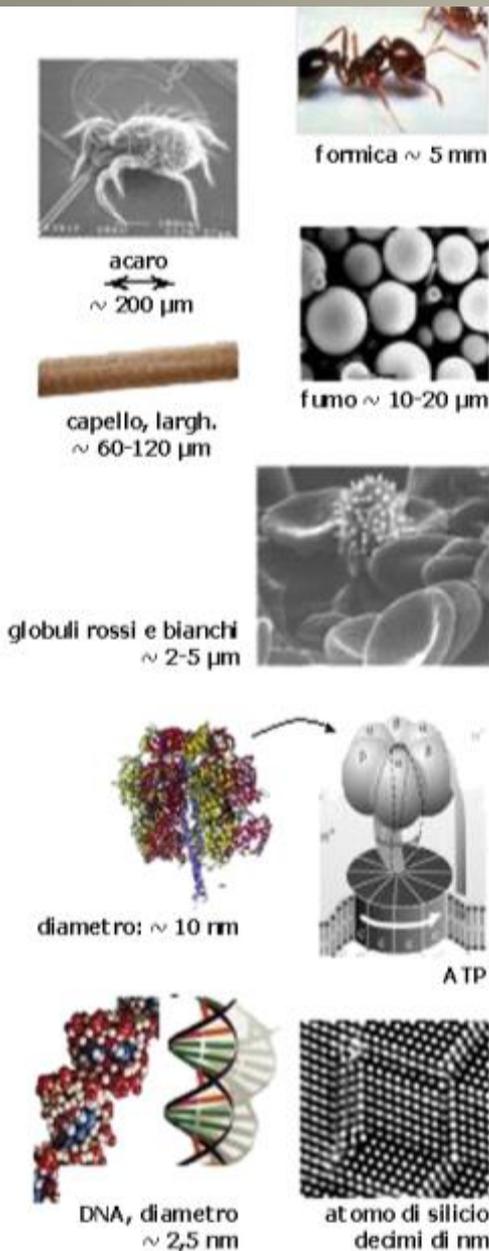
Capello umano: 50'000 – 100'000 nm
50 – 100 μm (micron)
0.05 – 0.1 mm
 0.5×10^{-4} – 1×10^{-4} m



Globulo rosso: 2'000 – 5'000 nm
2 – 5 μm (micron)
0.002 – 0.005 mm
 2×10^{-6} – 5×10^{-6} m



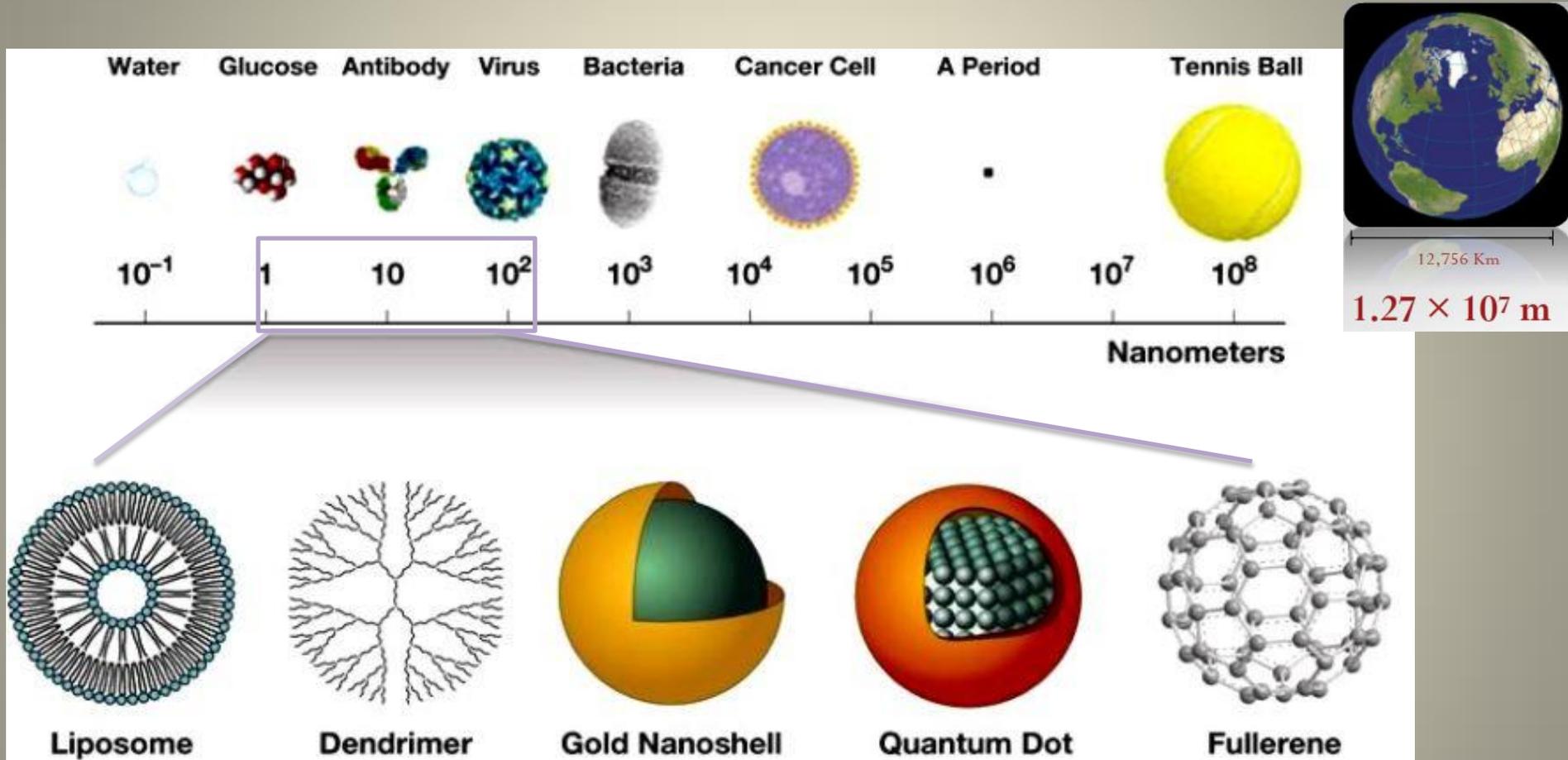
Un atomo:
1 – 5 Å (Angstrom)
0.1 – 0.5 nm
 1×10^{-4} – 5×10^{-4} μm
 1×10^{-7} – 5×10^{-7} mm
 2×10^{-10} – 5×10^{-10} m



LA SFIDA

Fabbricare e combinare tra loro mattoncini di materia in scala nanometrica per realizzare, per esempio celle a fotosintesi, per risolvere i problemi energetici

Cosa è "nano"?



1 nanometro = $1 \cdot 10^{-9}$ m

Proprietà dei sistemi nanometrici



Vaso di Licurgo (400 DC). La coppa da verde assume colorazione rosso rubino se attraversata dalla luce grazie alle nanoparticelle d'oro e d'argento di 30-70 nanometri all'interno del vetro (British Museum).

Il rapporto tra atomi superficiali e interni aumenta al diminuire delle dimensioni della particella

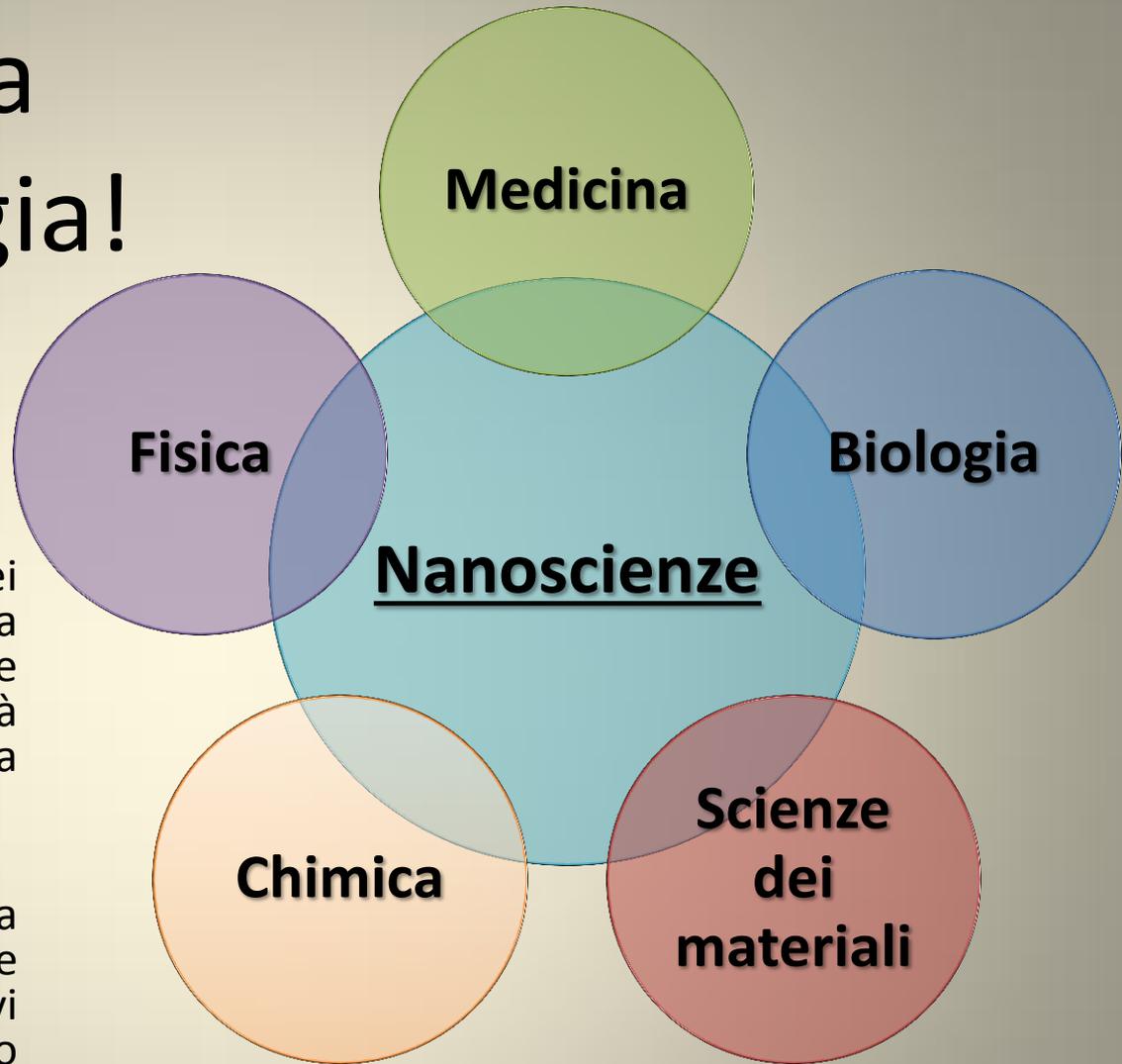


Immagnini da Dott.ssa Elisabetta Lottini - LAMM
«Nanoparticelle per uso medico»

Nanoscienza Nanotecnologia!

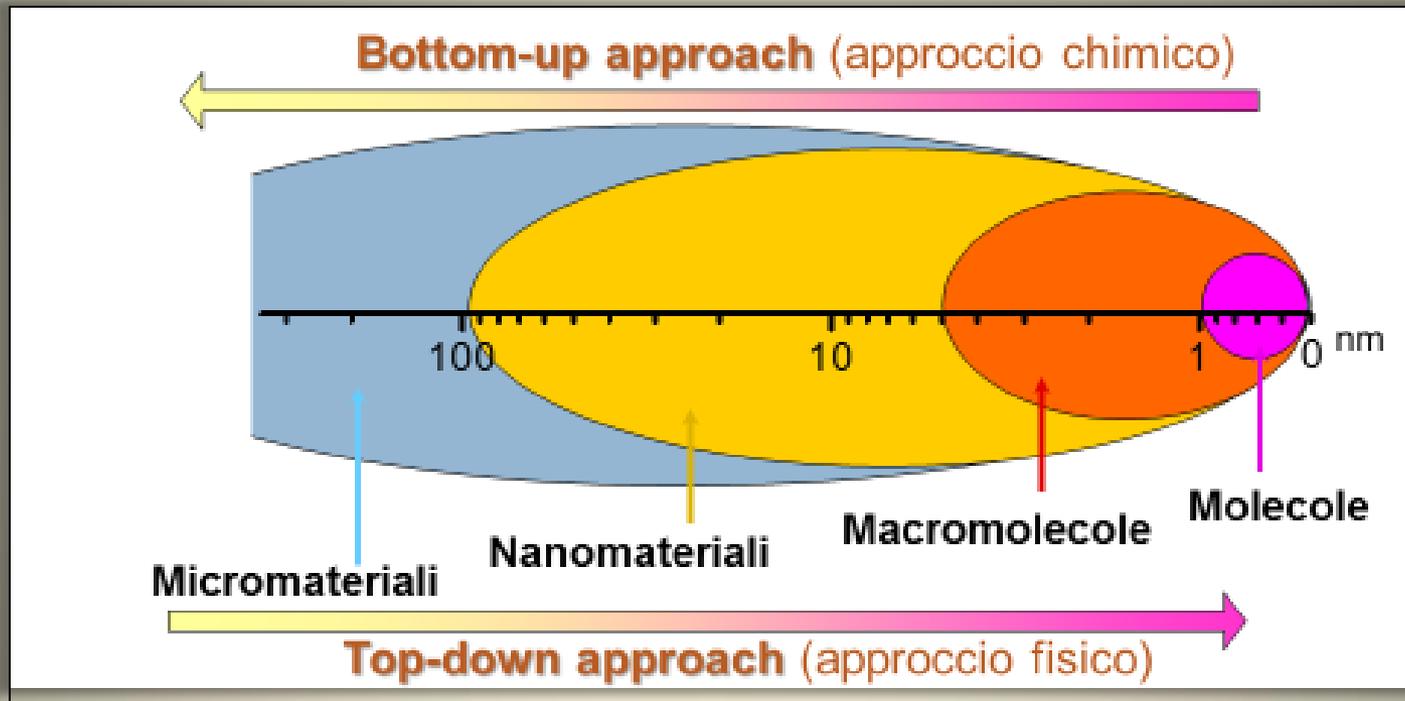
Nanoscienza: è lo studio dei fenomeni e dei materiali su scala atomica, molecolare e macromolecolare, dove le proprietà differiscono rispetto ad una scala più ampia.

Nanotecnologia: è il progetto, la caratterizzazione, la produzione e l'applicazione di strutture, dispositivi e sistemi che prevedano il controllo della forma e della misura su scala nanometrica.



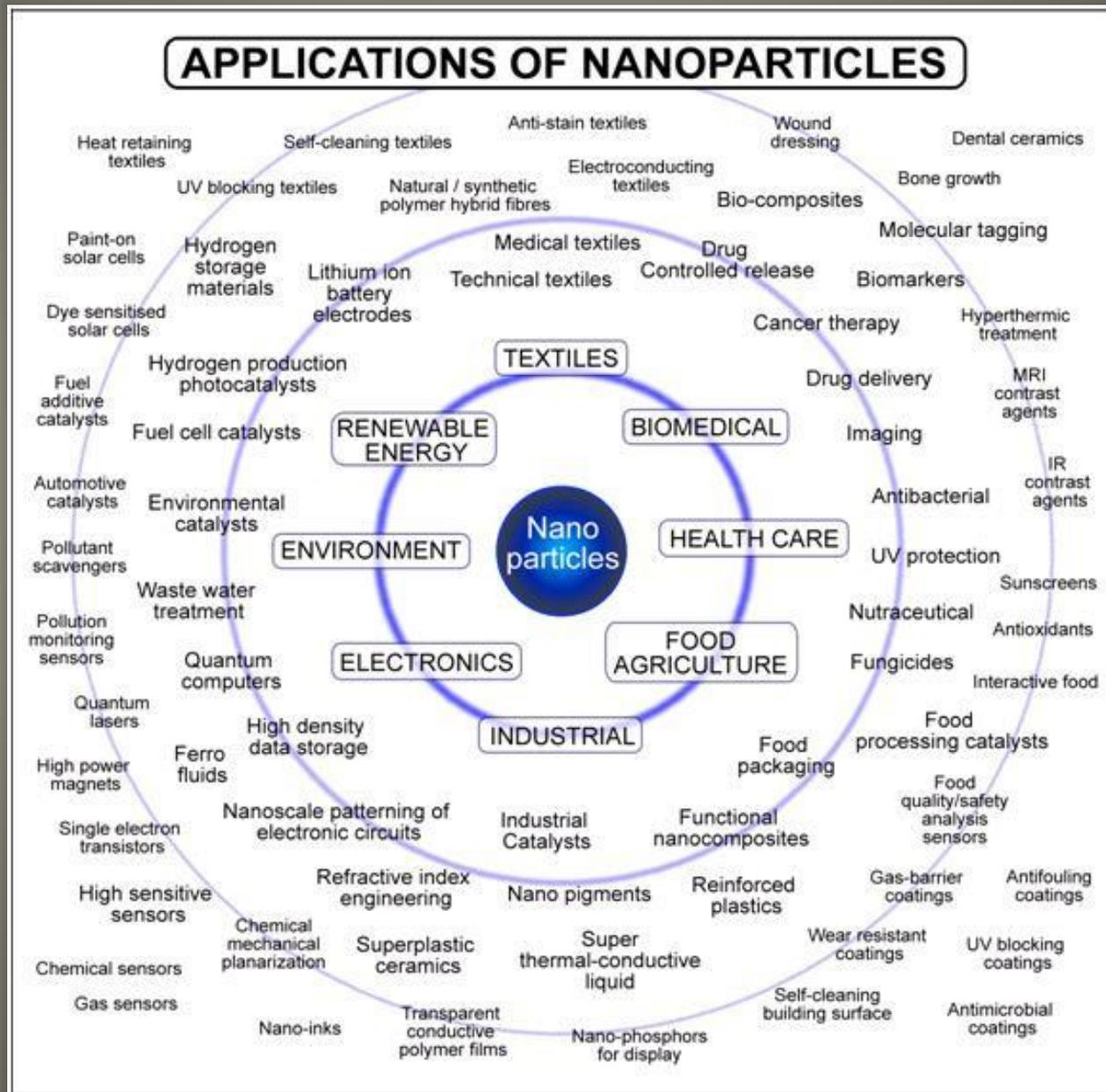
Sintesi di Nanomateriali

-**“top down”** sintesi che porta alla creazione di strutture molto piccole partendo da pezzi più grandi.

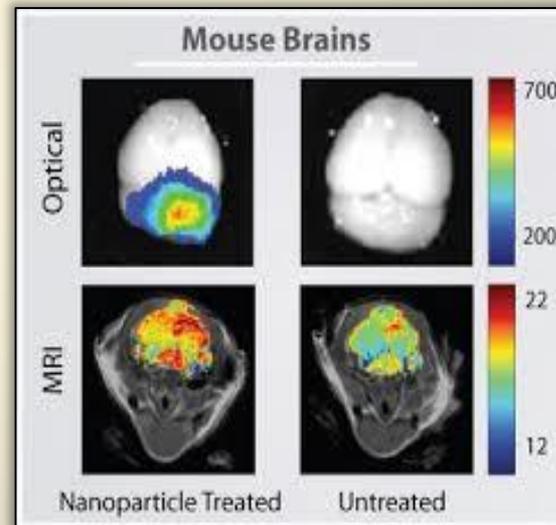
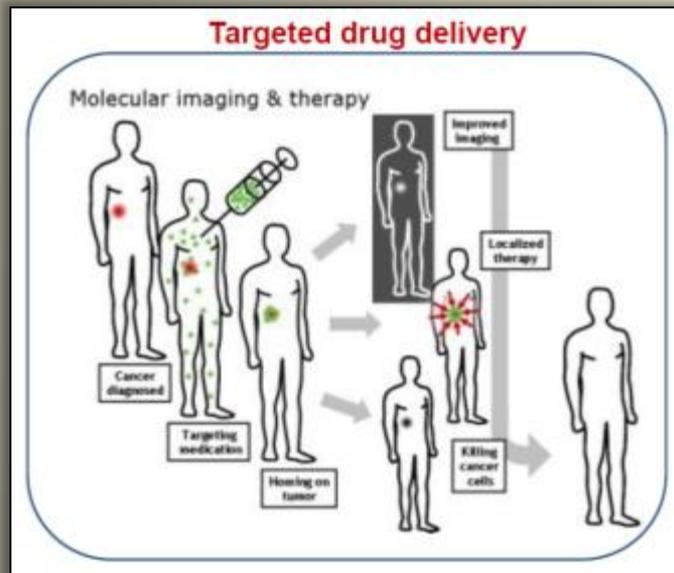
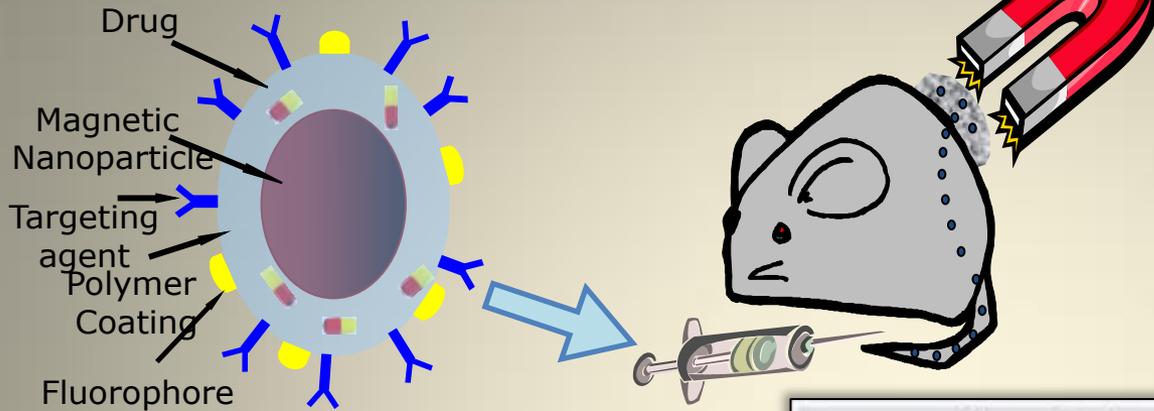


-**“bottom up”** sintesi che mette assieme atomo dopo atomo o molecola dopo molecola. Perciò si può sfruttare anche la capacità che hanno certi atomi o molecole di **autoorganizzarsi** in ragione della loro natura e di quella del substrato.

Funzionalità del Micro e del Nano

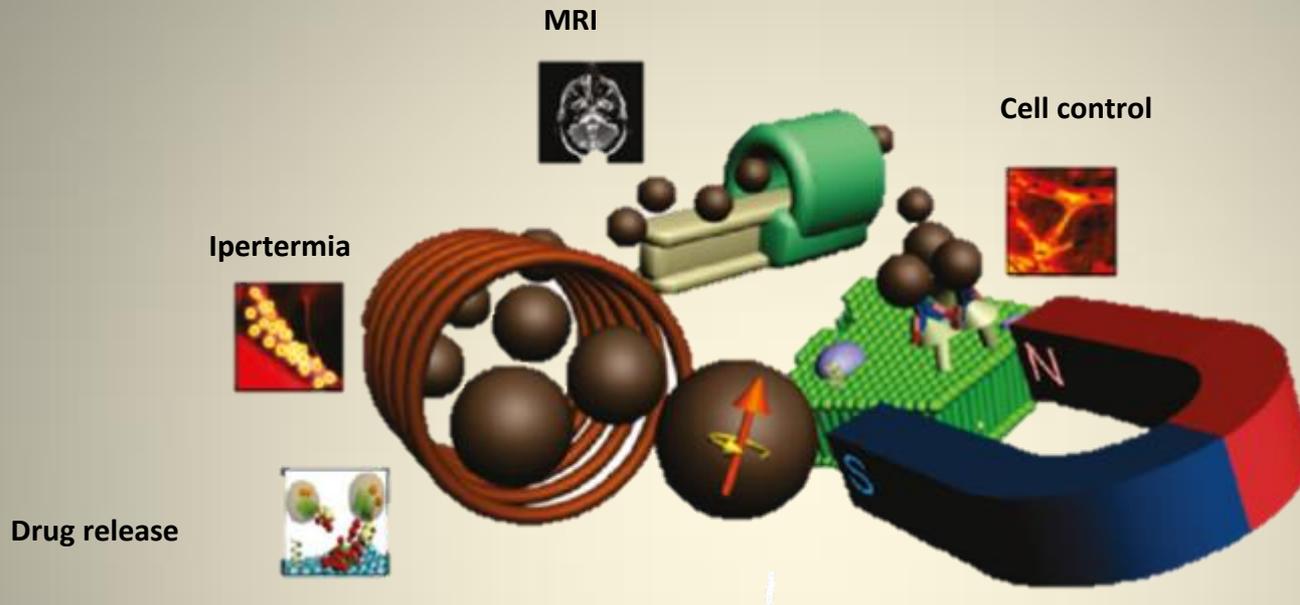


Applicazione per uso medico



Le nanoparticelle possono essere utilizzate allo stesso tempo sia per la diagnosi e la localizzazione di masse tumorali sia per svolgere un'azione terapeutica.

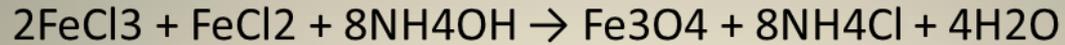
Le nanoparticelle magnetiche rispondono all'applicazione di un campo magnetico esterno



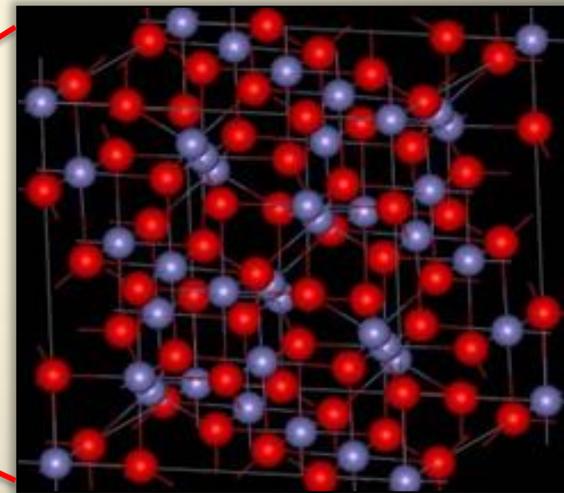
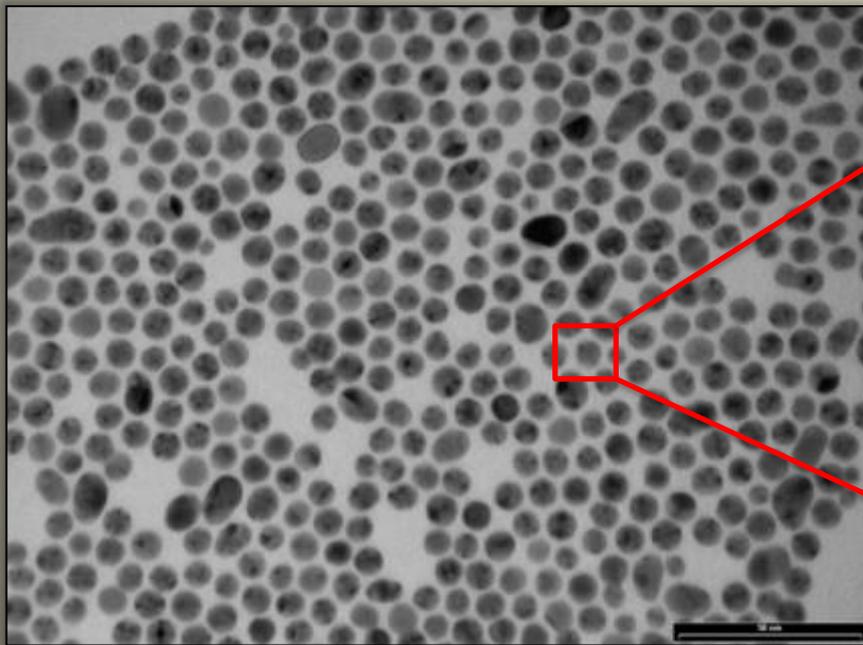
Le proprietà magnetiche dipendono:

1. dalla composizione
2. dalla dimensione
3. dalla struttura atomica e sono dovute al moto degli elettroni attorno al loro “spin”: ogni atomo si può considerare come una microscopica spira percorsa da corrente che, quindi, genera in piccolissimo campo magnetico.

Sintesi di nanoparticelle di magnetite (Fe_3O_4):

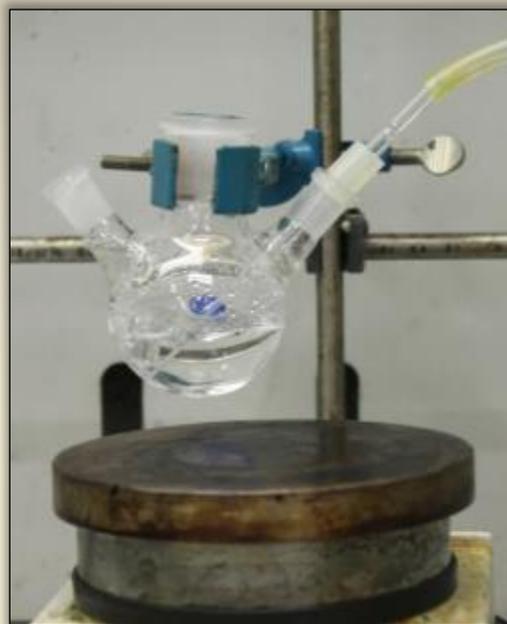
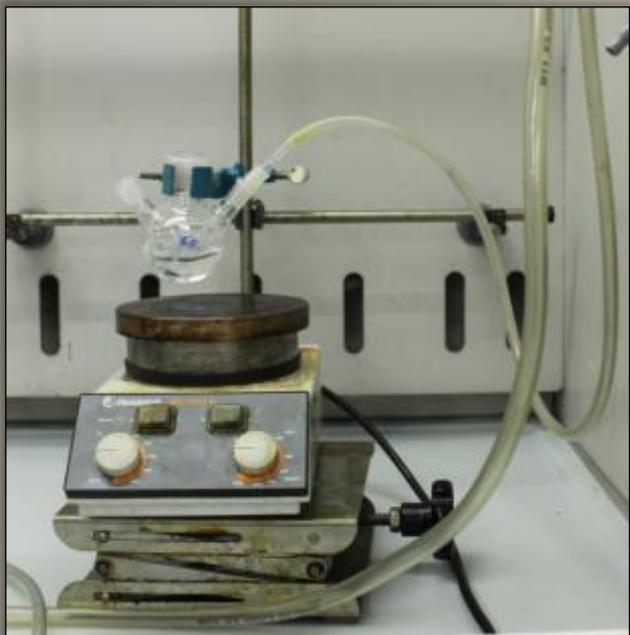


La sintesi prevede anche l'utilizzo di sostanze (tensioattivi) in grado evitare l'agglomerazione delle nanoparticelle, che rimangono stabili in soluzione.



Fe_3O_4

Strumentazione:



piastra riscaldante agitatrice
bagno a olio
pinze
termometro
pipette pasteur
ancorina magnetica
pallone a tre colli da 100 ml
cilindro graduato
imbuto
becker da 25 /50 ml

Reagenti: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Acido oleico (tensioattivo)
 NH_4OH al 30%
Acetone
 H_2O
Cicloesano (solvente organico)





bagno a olio

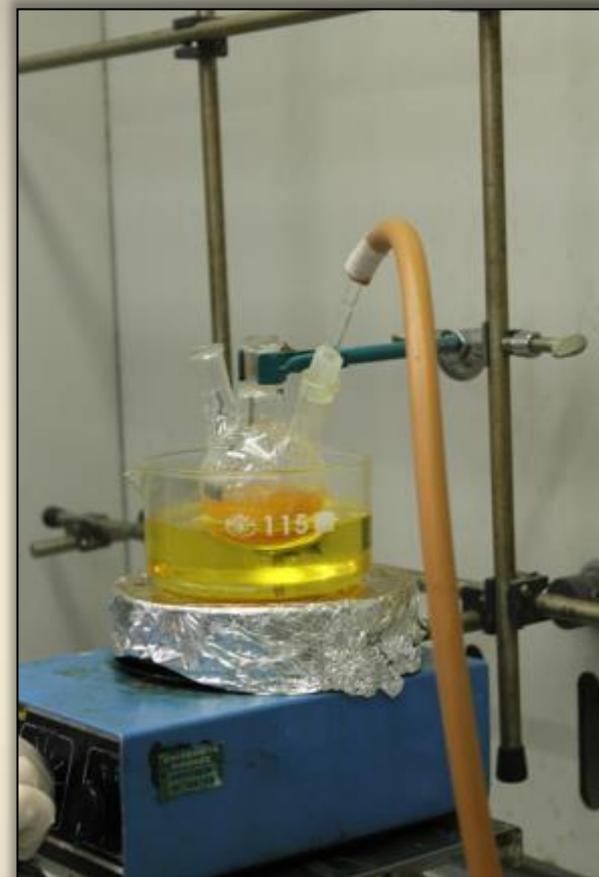


Gorgogliare azoto in 50 ml di H_2O , precedentemente posta all'interno del pallone da 100 ml

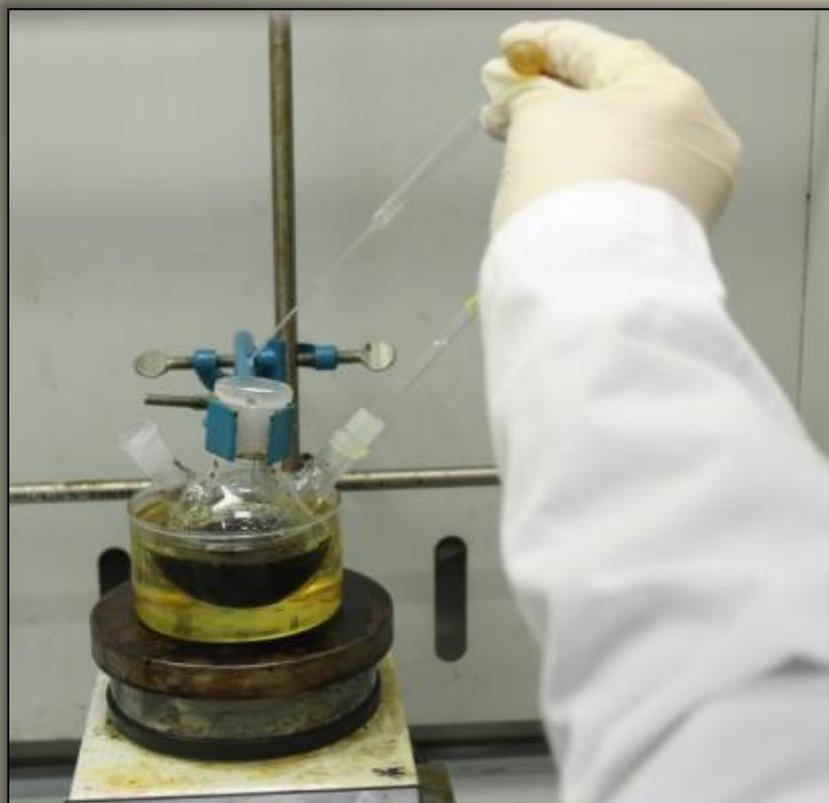
Sempre sotto flusso di azoto aggiungere $7,0 \cdot 10^{-3}$ mol di $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $3,5 \cdot 10^{-3}$ mol di $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$



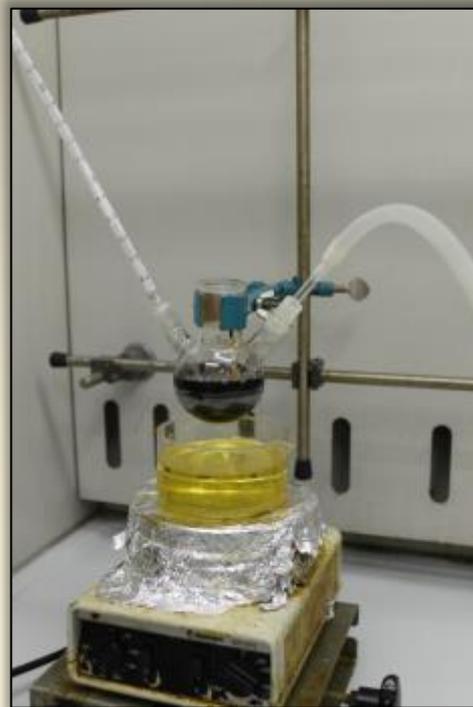
Sciogliere $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol di acido oleico in 5 ml di acetone



Aggiungere la soluzione di acido oleico (tensioattivo) in acetone alla soluzione acquosa di Fe (II) e Fe (III) e agitare per 5 minuti.



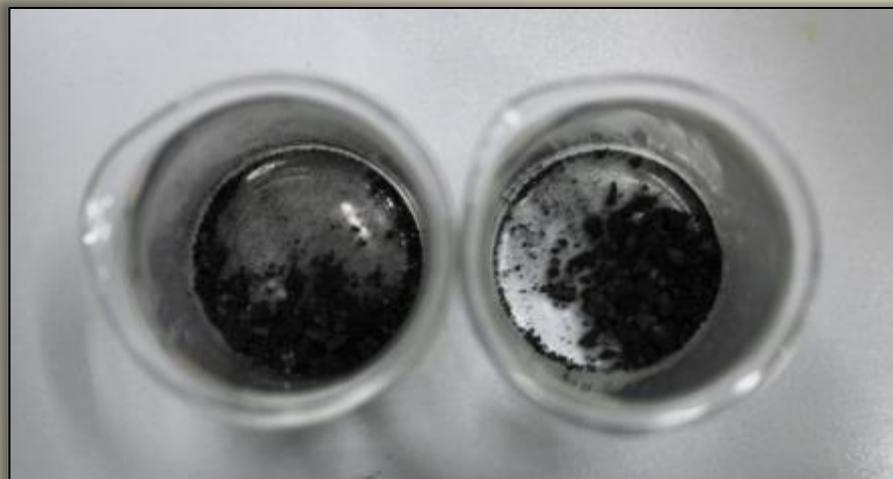
Aggiungere goccia a goccia 6 ml di NH_4OH al 30% e agitare per 30 minuti.



Riscaldare a 85°C per 30 minuti, fino alla formazione di un precipitato nero che è costituito dalle nanoparticelle.



Disperdere il precipitato con 20 ml di H₂O e 2 ml di NH₄OH, quindi trasferire la sospensione in due becker



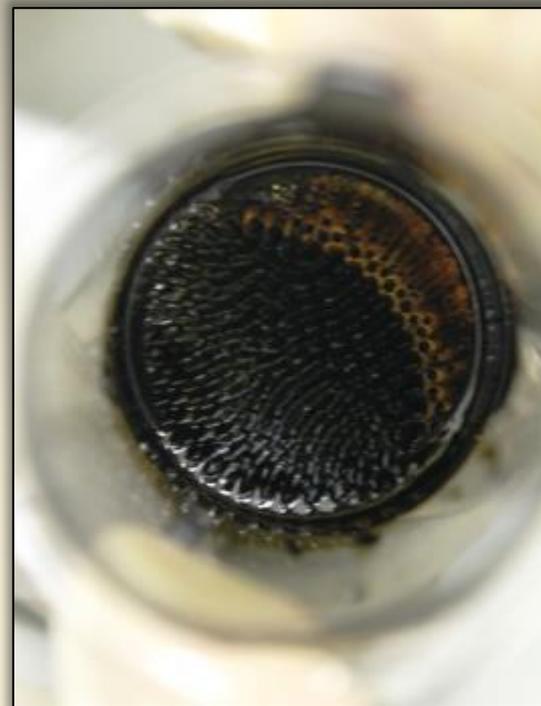
Aggiungere HCl 1M fino a pH 2 nella sospensione



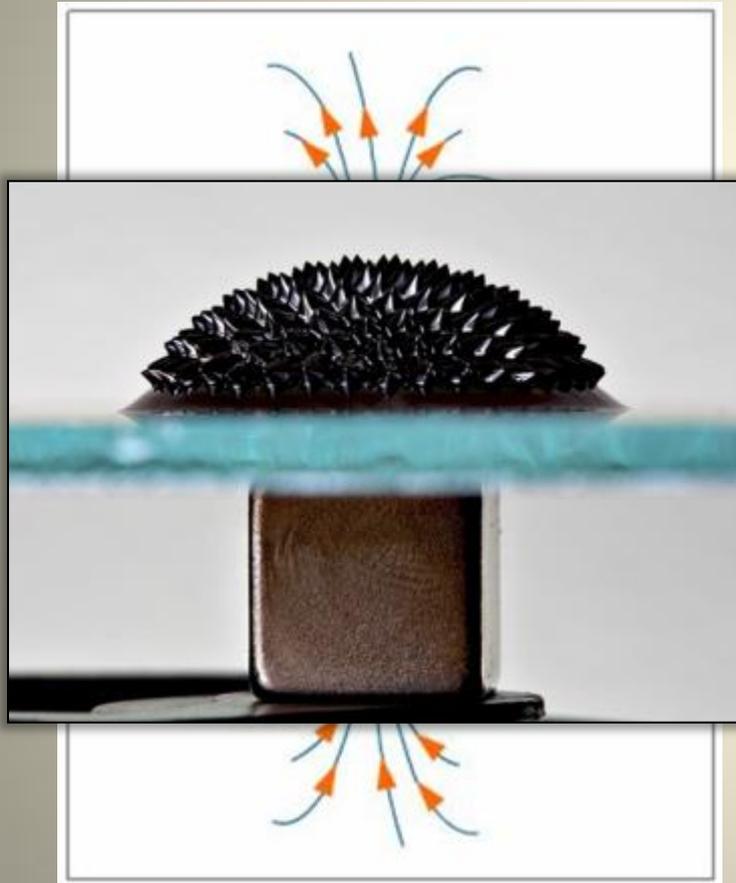
Separare il precipitato con l'aiuto di un magnete e lavare con H₂O per due volte.

Asciugare per 15 min in stufa il precipitato di uno dei due becker e risospingere con cicloesano (ferrofluido a base e organica)

All'interno dell'altro becker aggiungere poche gocce di H₂O e NH₄OH fino alla completa dissoluzione (ferrofluido a base acquosa)



Un ferrofluido è formato da una matrice solida (NP di ossidi di ferro) dispersa in un solvente. Poiché tali NP rispondono ad un campo magnetico orientandosi lungo le linee di campo, e sono assimilabili ad un fluido, se si avvicina un magnete la superficie forma spontaneamente una sequenza regolare di increspature, dando luogo a strutture ben definite.

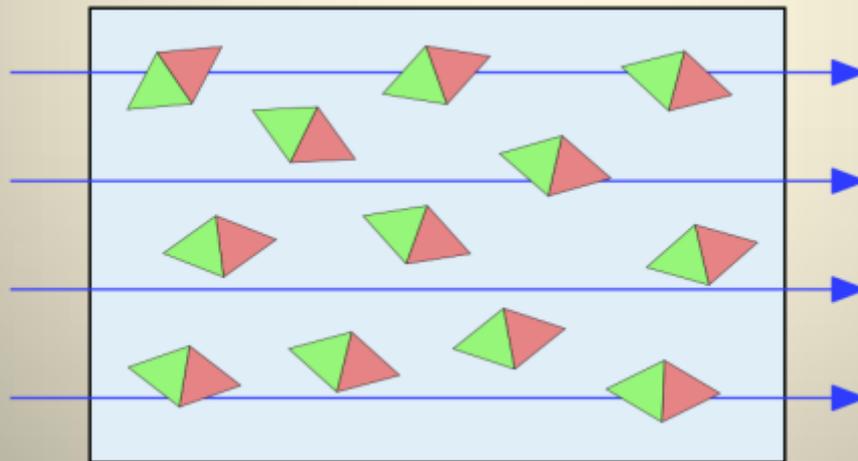


Ferrofluido collocato su una lastra di vetro, che lo separa da un magnete sottostante.

I ferrofluidi non presentano magnetizzazione in assenza di un campo applicato esternamente, sono materiali paramagnetici, e si dice spesso che sono "superparamagnetici" a causa della loro grande suscettività magnetica.

Il paramagnetismo è una forma di magnetismo che alcuni materiali mostrano solo in presenza di campi magnetici, e si manifesta con una magnetizzazione avente stessa direzione e verso di quella associata al campo esterno applicato al materiale paramagnetico stesso.

I materiali paramagnetici sono caratterizzati a livello atomico da dipoli magnetici che si allineano con il campo magnetico applicato, venendone debolmente attratti.



Allineamento dei singoli dipoli magnetici in presenza di un intenso campo magnetico.

11 Marzo 2015

Caratterizzazione nanoparticelle magnetiche tramite diffrazione a raggi x

L'obiettivo è controllare la forma
delle nanoparticelle

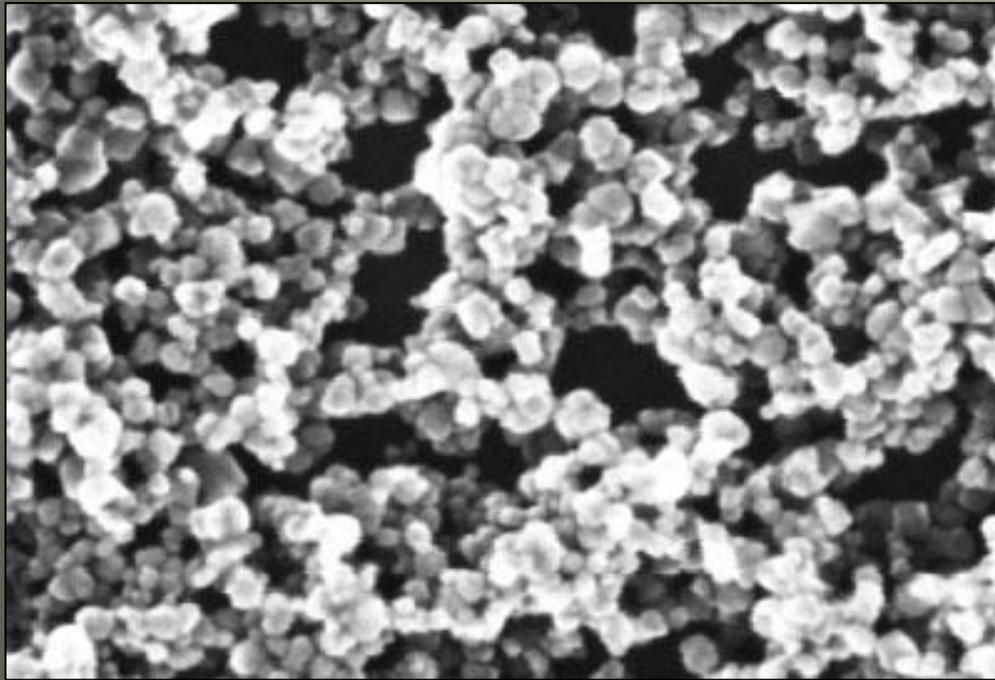


immagine SEM

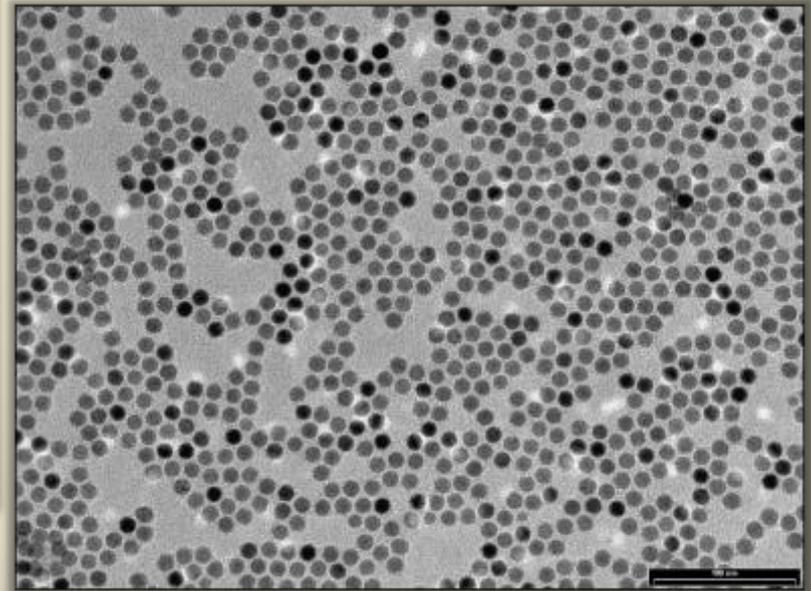


immagine TEM

Strumenti per analisi cristallografica

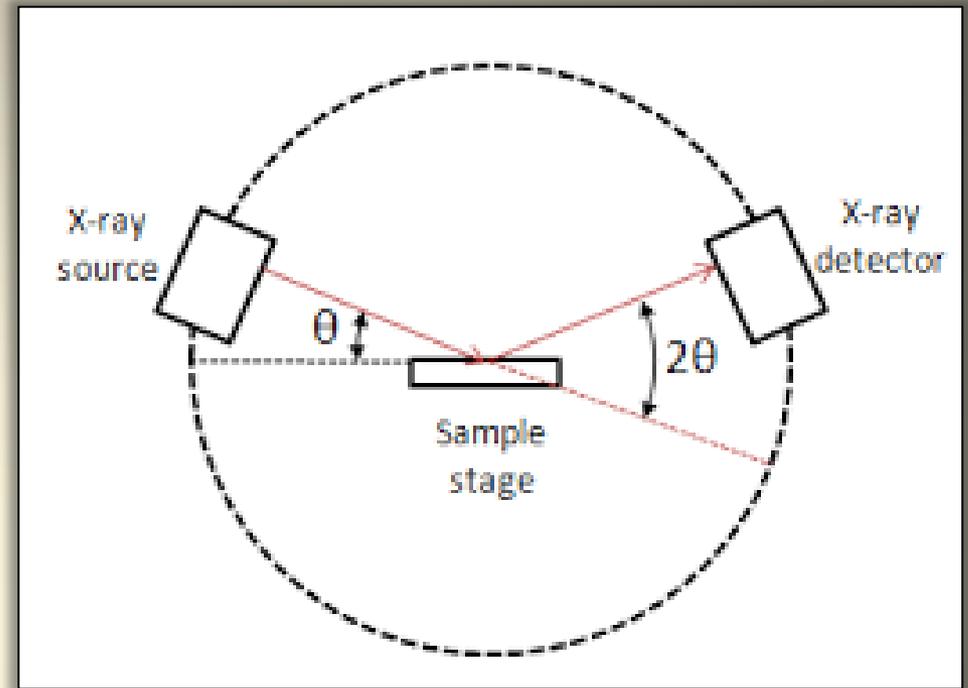


Diffrattometro a raggi x

spettrofotometro



Diffratore a raggi X



La macchina produce raggi x

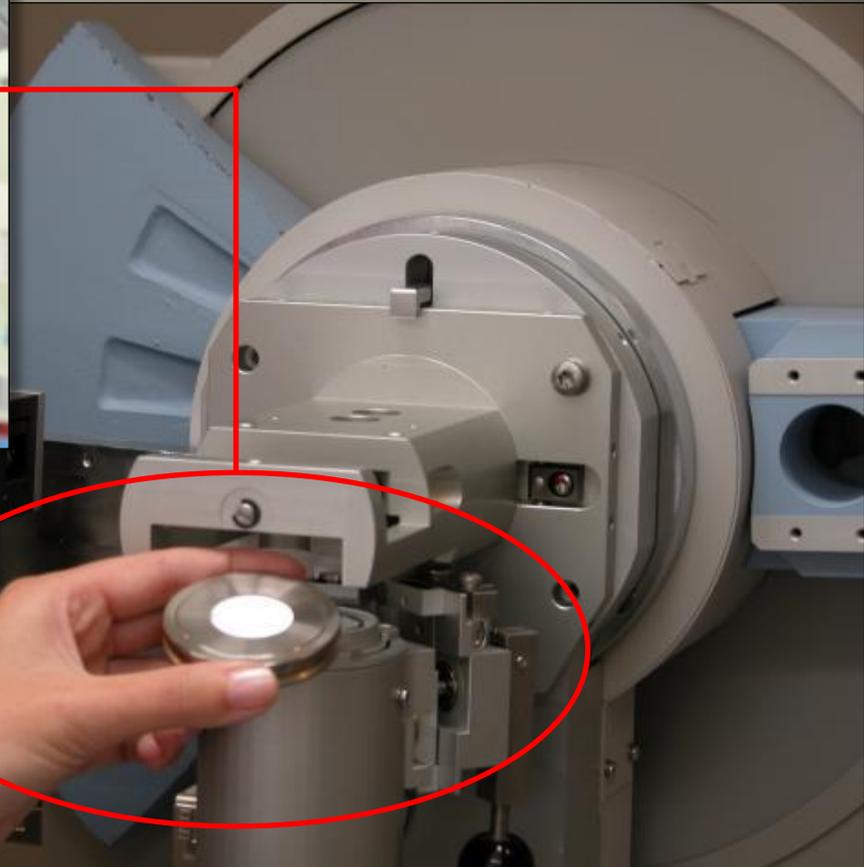
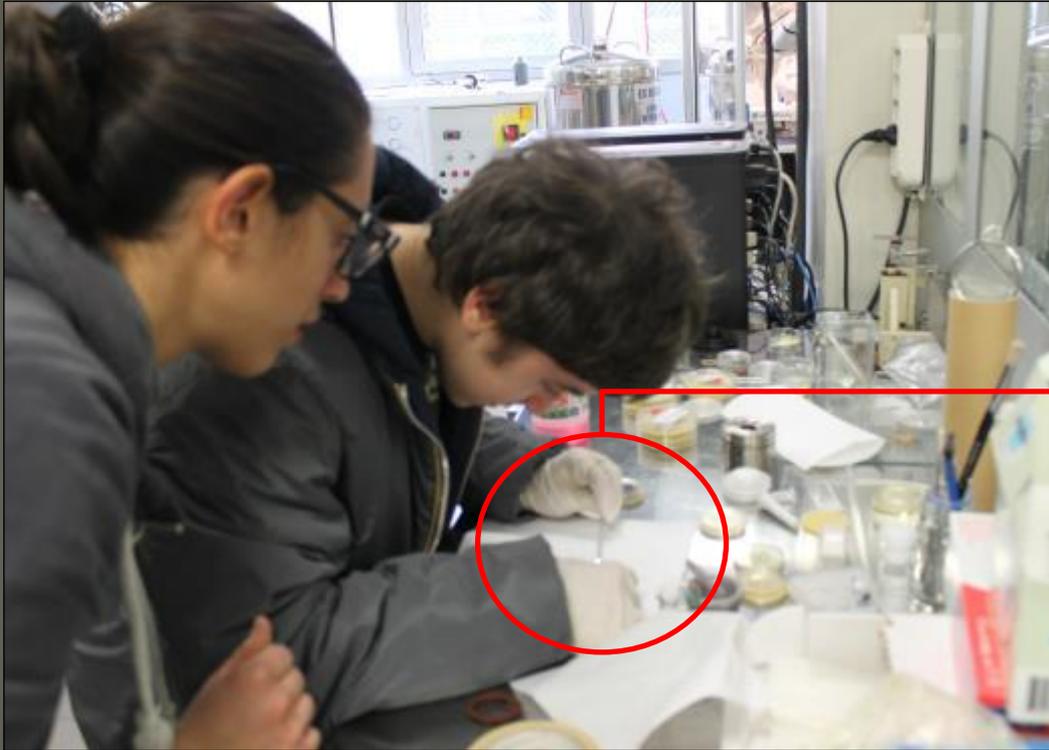
I raggi x sono diffratti dal campione

Si registrano gli angoli in cui
l'intensità è max

Procedimento

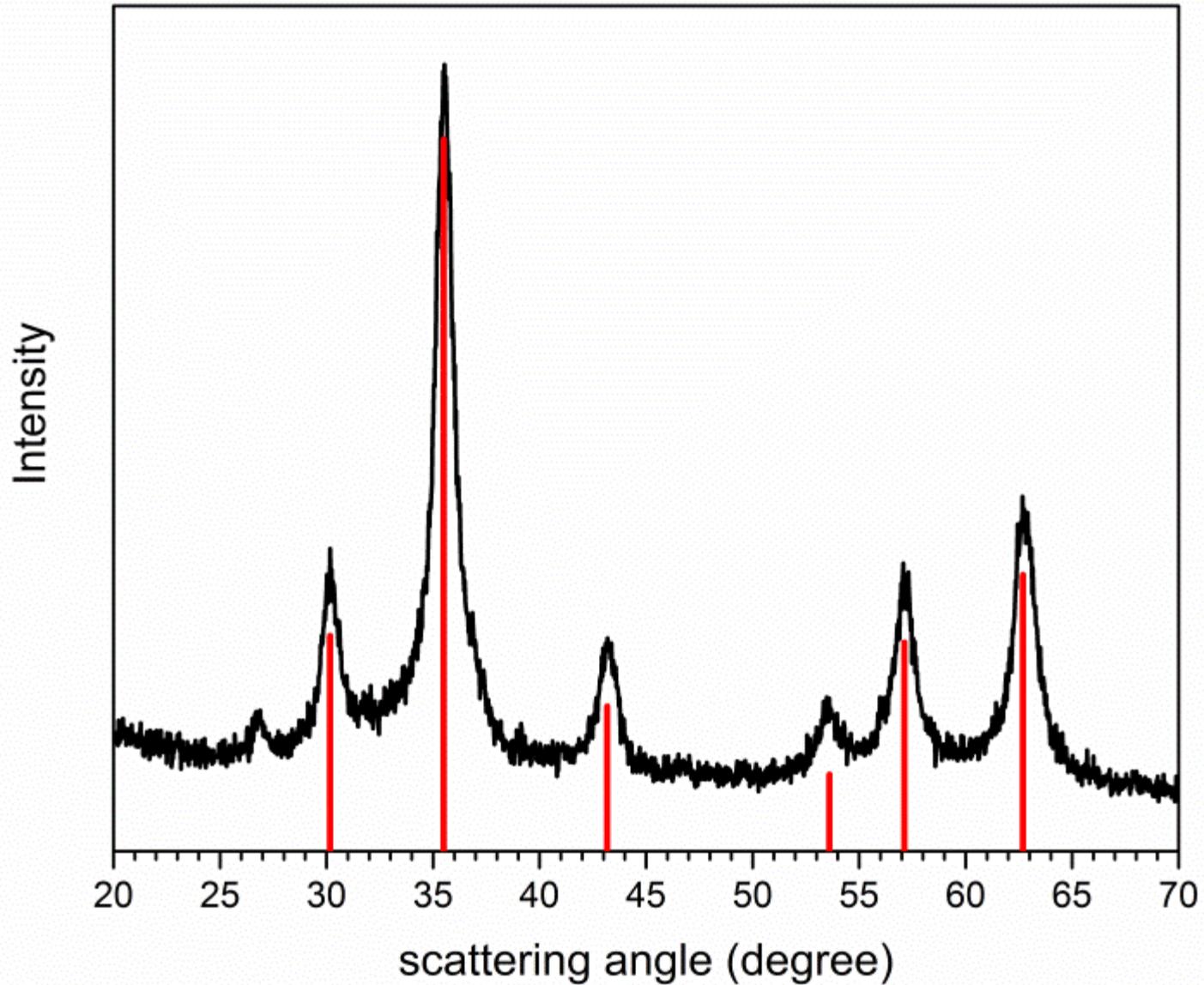
Si prepara il campione

Si inserisce nella macchina



E si lascia lavorare!

Si ottiene un grafico intensità-angolo diffrazione
Lo si confronta con dati in rete e si controlla la natura della sostanza

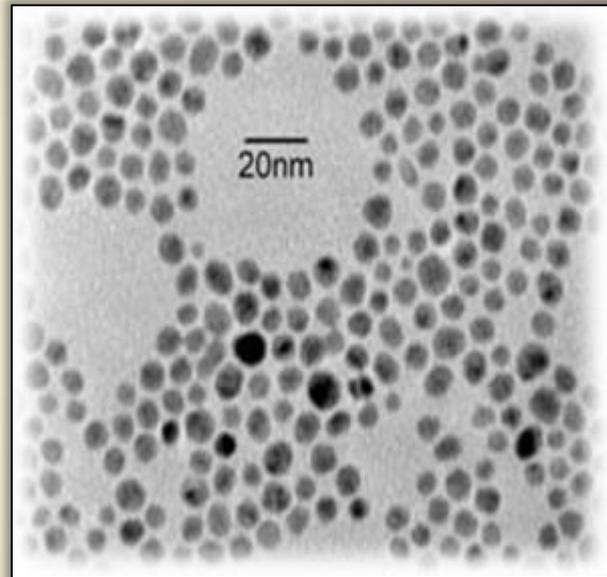


11 Febbraio 2015 – Sintesi di nanoparticelle di oro

L'oro colloidale è una sospensione colloidale di particelle d'oro di dimensione sub-micrometrica in un fluido, in genere acqua. Il liquido assume un intenso colore rosso (per particelle di dimensione inferiore a 100 nm), o un colore giallo sporco (per particelle di dimensioni maggiori). Le nanoparticelle d'oro possono assumere varie forme; le più frequenti sono sfere, bastoncini, cubi, e calotte.



Nanoparticelle d'oro (Northwestern University)



Nanoparticelle d'oro osservate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Conosciuto fino dall'antichità, gli Egizi e i Cinesi, diversi secoli prima di Cristo, utilizzavano l'oro colloidale per colorare il vetro. Nel corso del XVII secolo furono addirittura usate sospensioni per il trattamento di alcune malattie.

Tuttavia lo studio sistematico delle nanoparticelle è cominciato solo nel XIX secolo con Faraday, mentre le prime applicazioni alla biologia molecolare risalgono all'ultimo decennio.



Si discute il metodo tutti insieme

Strumentazione:

piastra riscaldante-agitatrice
bagno a olio
pinze
refrigerante a bolle
pallone da 50 ml e tre colli
cilindro graduato
pipette graduate da 1 ml e inferiori

Reagenti: citrato di sodio
 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (acido tetracloroaurico triidrato)
 H_2O milliQ



Prelevare 5 mL della soluzione di HAuCl_4 1 mM e trasferirli nel pallone

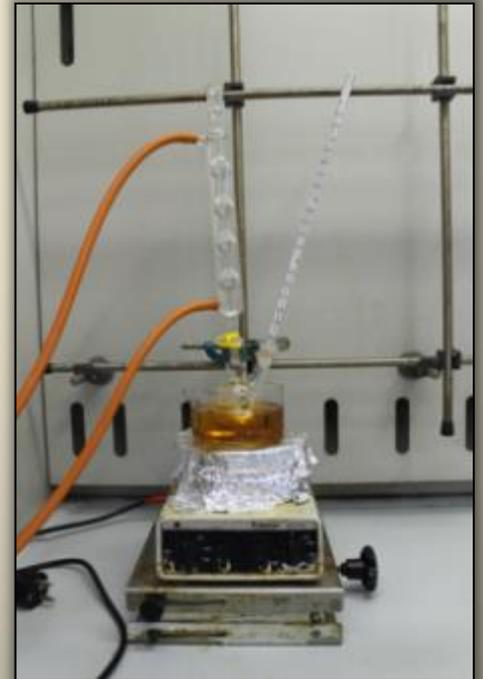


Collegare l'apparato per il riflusso (refrigerante, tubi per l'acqua) e portare ad ebollizione sotto agitazione magnetica.



Prelevare x ml della soluzione di citrato di sodio 20 mM e trasferirli nel pallone secondo lo schema:

1. 0.125 ml
2. 0.250 ml
3. 0.375 ml
4. 0.500 ml
5. 0.615 ml
6. 0.750 ml
7. 0.875 ml
8. 1.000 ml
9. 1.125 ml
10. 1.250 ml





Dopo 15 minuti di agitazione, riportare a temperatura ambiente la soluzione.

Discussione dei risultati



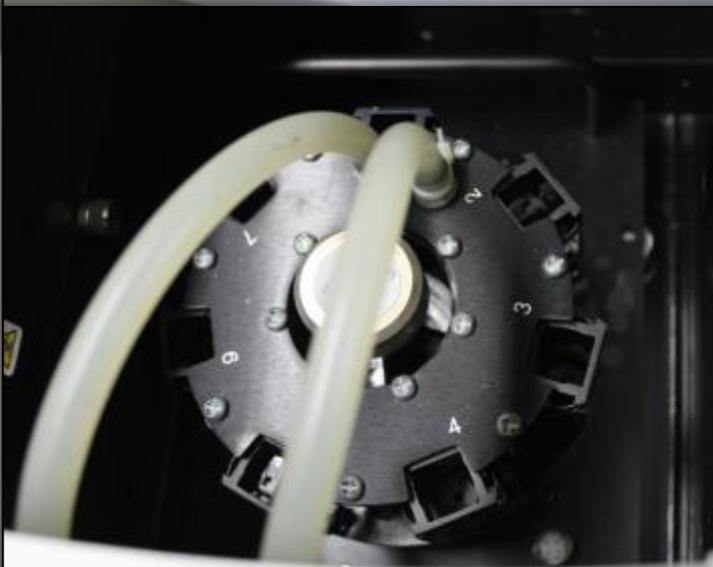


Nanoparticelle d'oro: l'intensità della colorazione varia con la concentrazione

Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro

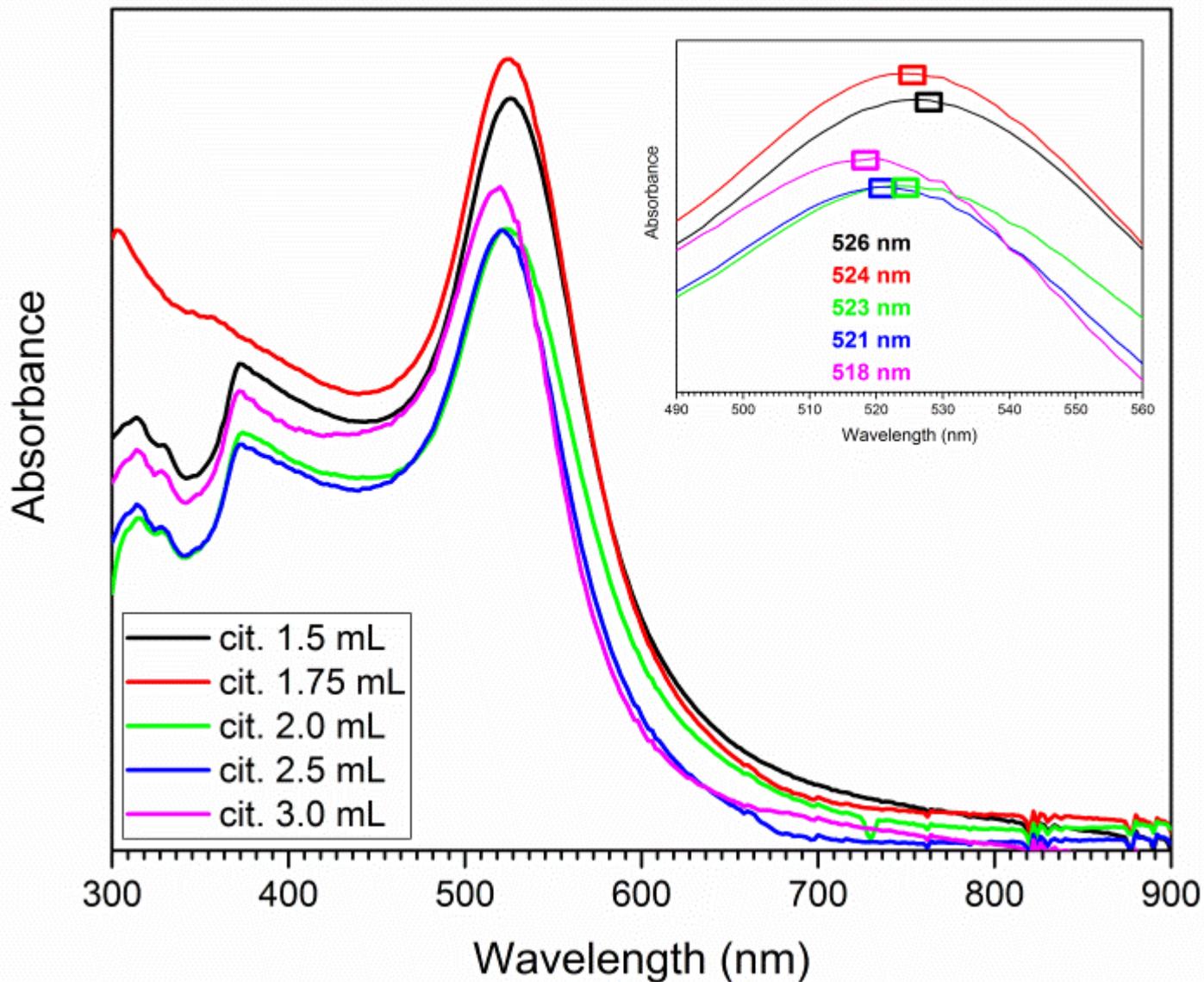


Beute con le sospensioni

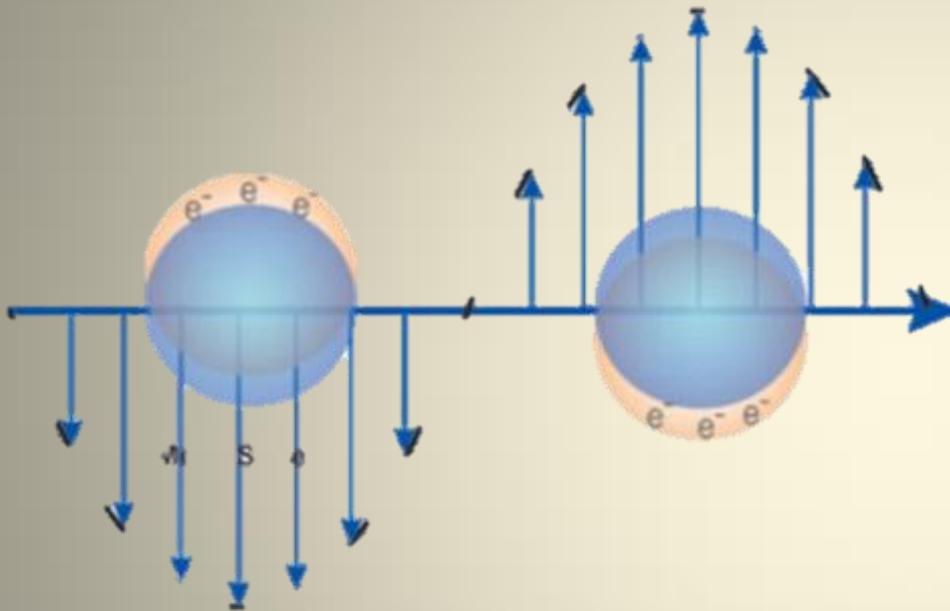


spettrofotometro

Assorbimento della radiazione elettromagnetica nelle regioni del visibile e del vicino ir



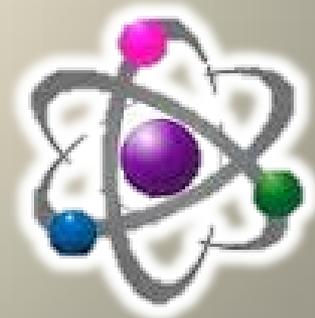
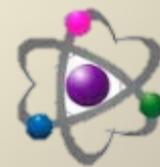
Proprietà ottiche



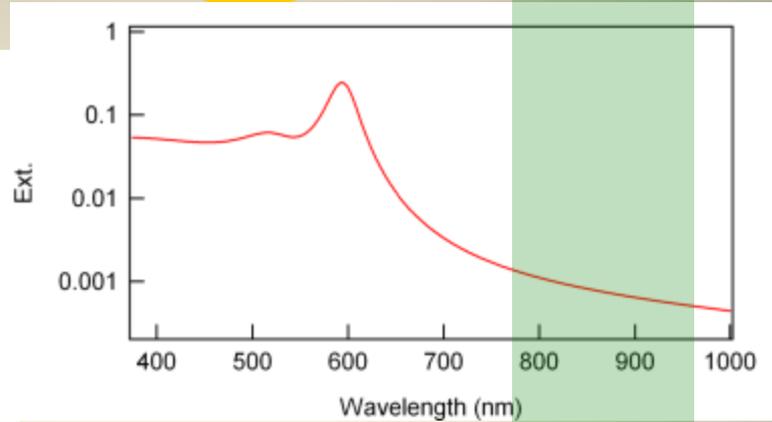
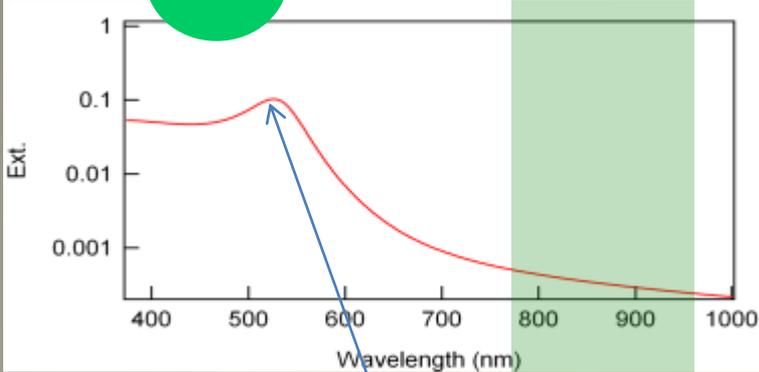
Gli elettroni nei metalli hanno libertà di movimento. Però in uno spazio ridotto, di misura nanometrica, il loro spazio è limitato. La loro agitazione provoca un'oscillazione unisona nominata **RISONANZA PLASMONICA**.



La risonanza plasmonica facilita l'assorbimento delle radiazioni luminose, e dipende non solo dal materiale, ma anche dalla forma e dalle dimensioni delle nanoparticelle.

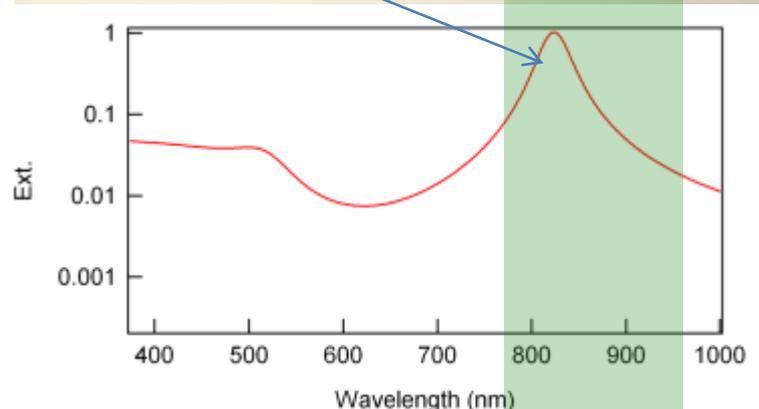
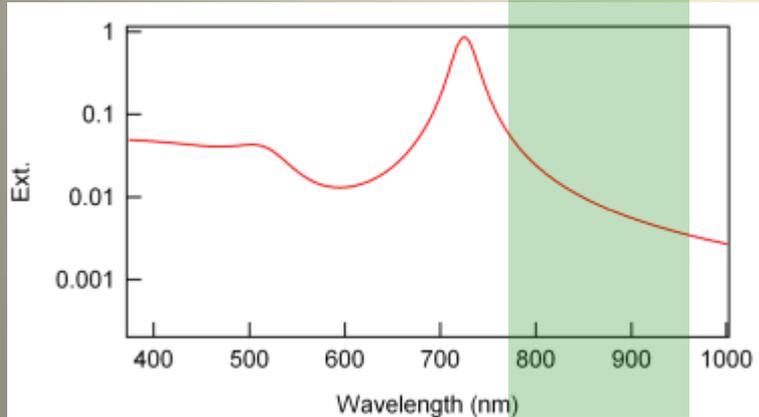


Altra proprietà importante

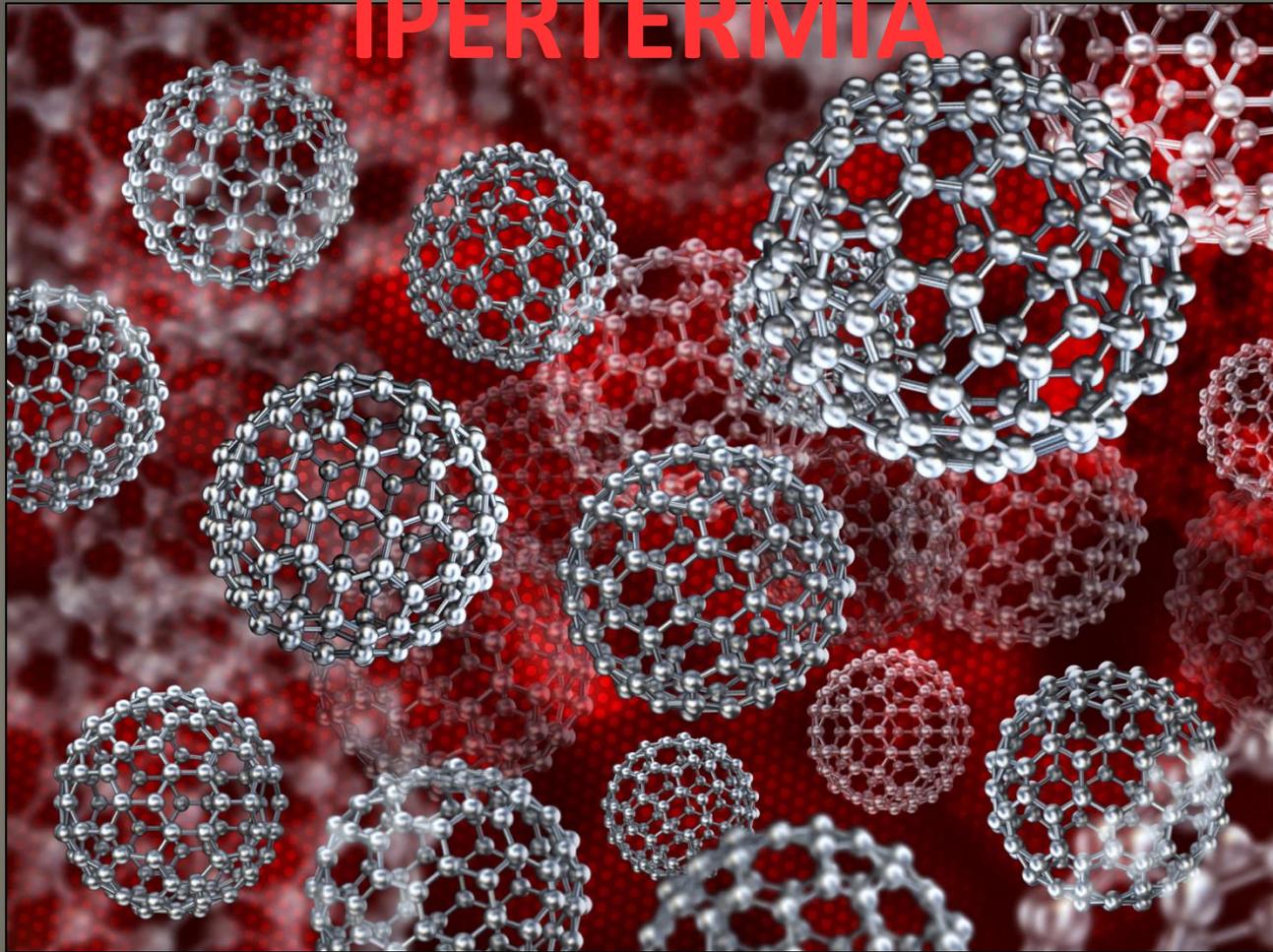


Il punto massimo di assorbimento va da circa 520 nm a quasi 800 nm

Le particelle d'oro hanno comportamenti diversi a seconda della loro dimensione e della loro forma cambiando i loro punto di massimo assorbimento



IPERTERMIA



1. INTERNA

2. ESTERNA (microonde, radiofrequenze, ultrasuoni)

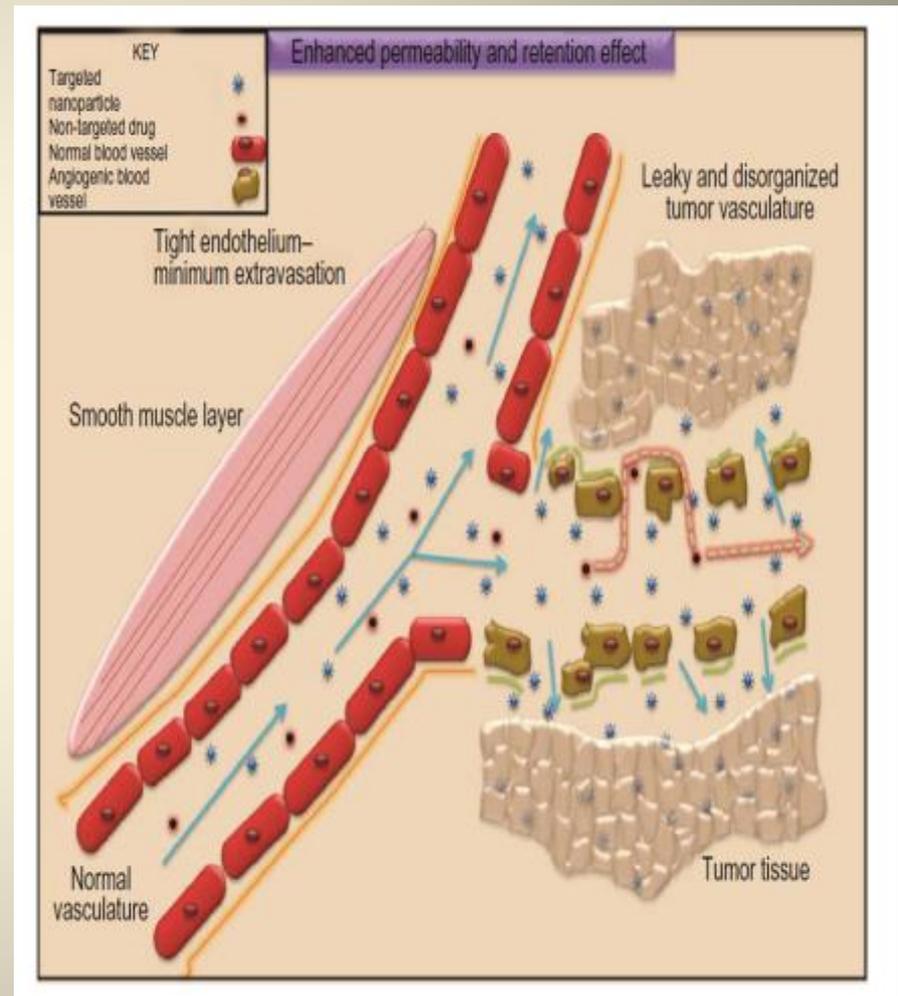
Locale

Regionale

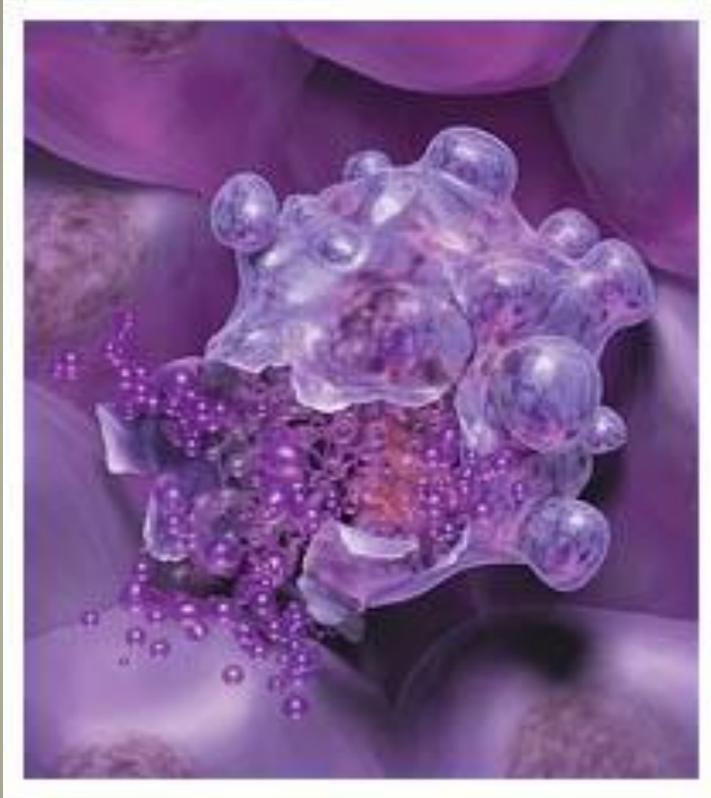
Total body

COME LE NANOPARTICELLE RAGGIUNGONO I TESSUTI TUMORALI

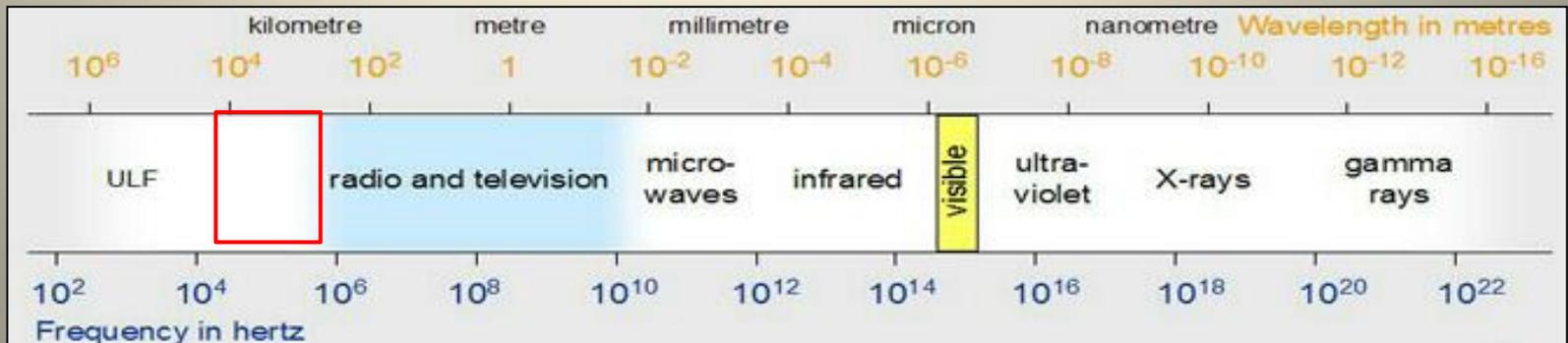
Le nanoparticelle magnetiche raggiungono il luogo interessato autonomamente in quanto gli endoteli del tessuto tumorale sono maggiormente permeabili rispetto a quelli sani.



COME L'IPERTERMIA DANNEGGIA LE CELLULE TUMORALI?

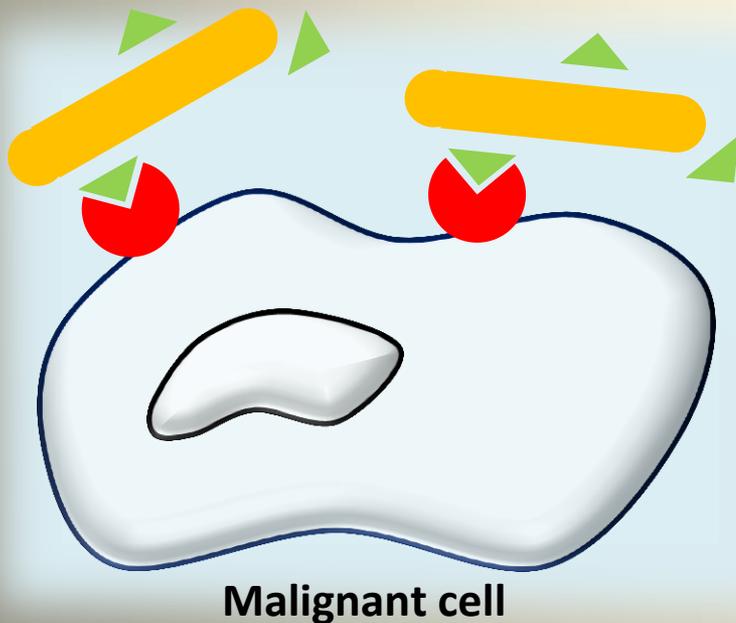


Temperature superiori a 42°C danneggiano il citoscheletro, la membrana e il nucleo cellulare, inducendo la apoptosi (morte cellulare).



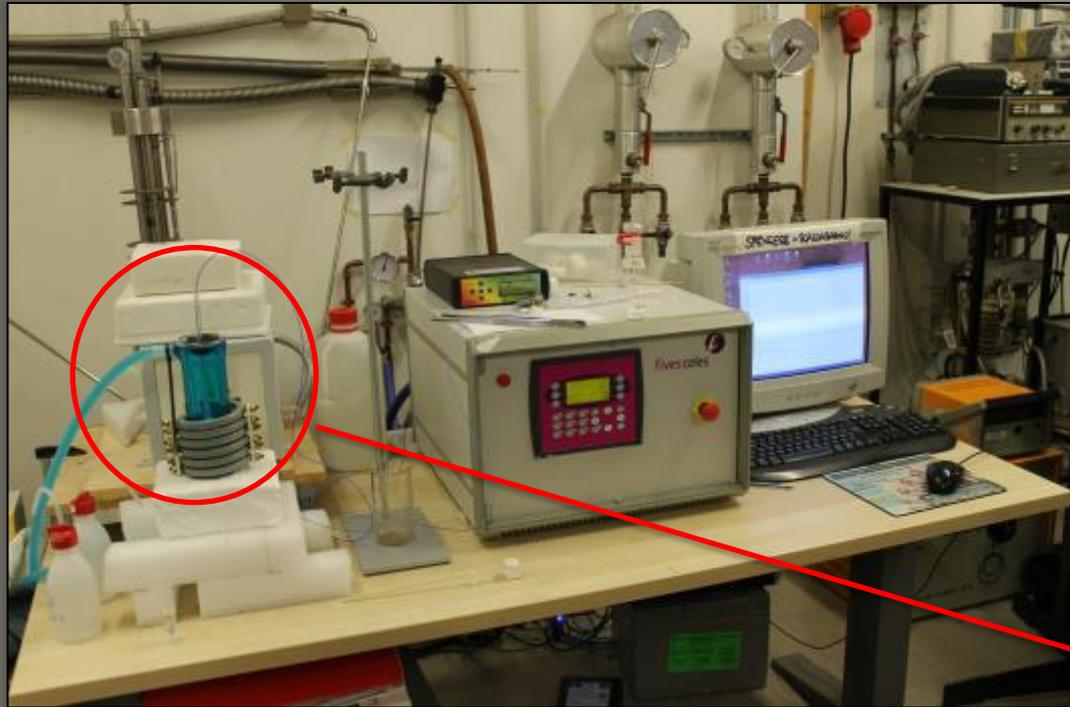
Come si aumenta la temperatura nelle cellule tumorali?

Tramite un campo magnetico alternato si riesce ad indurre l'oscillazione delle nanoparticelle magnetiche.

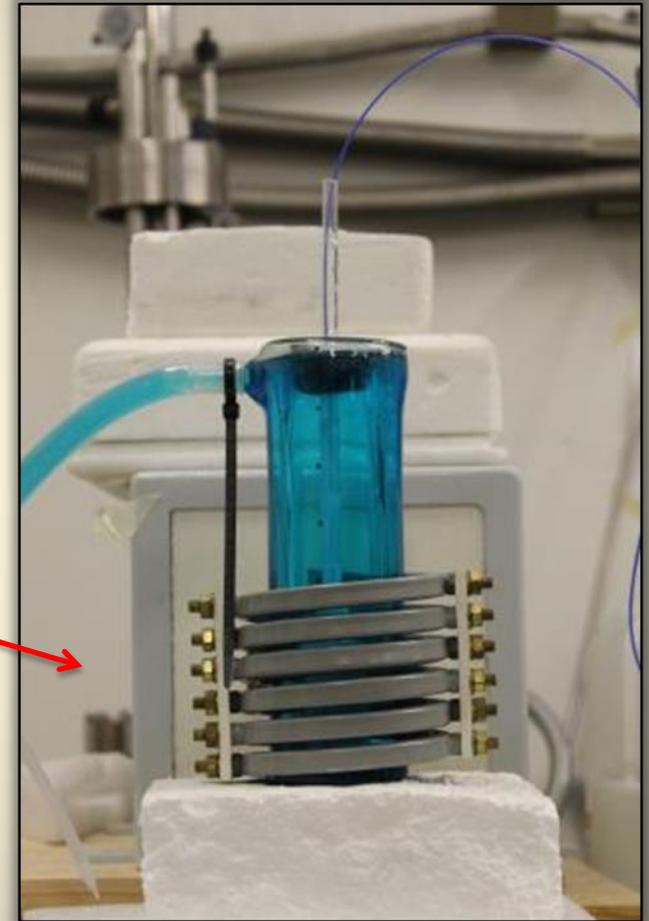


Le cellule tumorali, non avendo supporto muscolare, presentano una distribuzione non omogenea dei vasi sanguigni, pertanto la loro capacità di dissipare calore ne risulta compromessa.

Come si misura la proprietà ipertermica magnetica?



Lo strumento riesce per mezzo di un campo magnetico alternato a indurre in un conduttore corrente che, per effetto Joule, si trasforma in calore.



Nel caso della magnetite, i valori di campo ottimali sono $17 \text{ kAmp} \cdot \text{m}^{-1}$ e 183 KHz di frequenza.

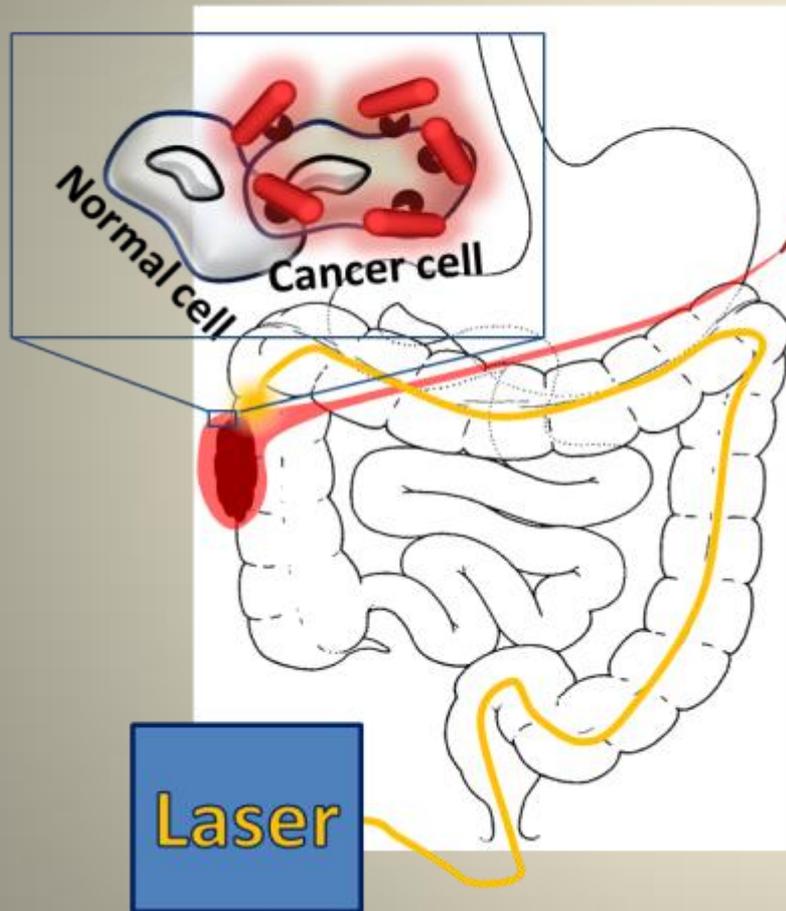
Termometro a fibre ottiche con una punta cristallina di arseniuro di gallio.



E' possibile così valutare la capacità di rilasciare calore per unità di massa delle nanoparticelle:

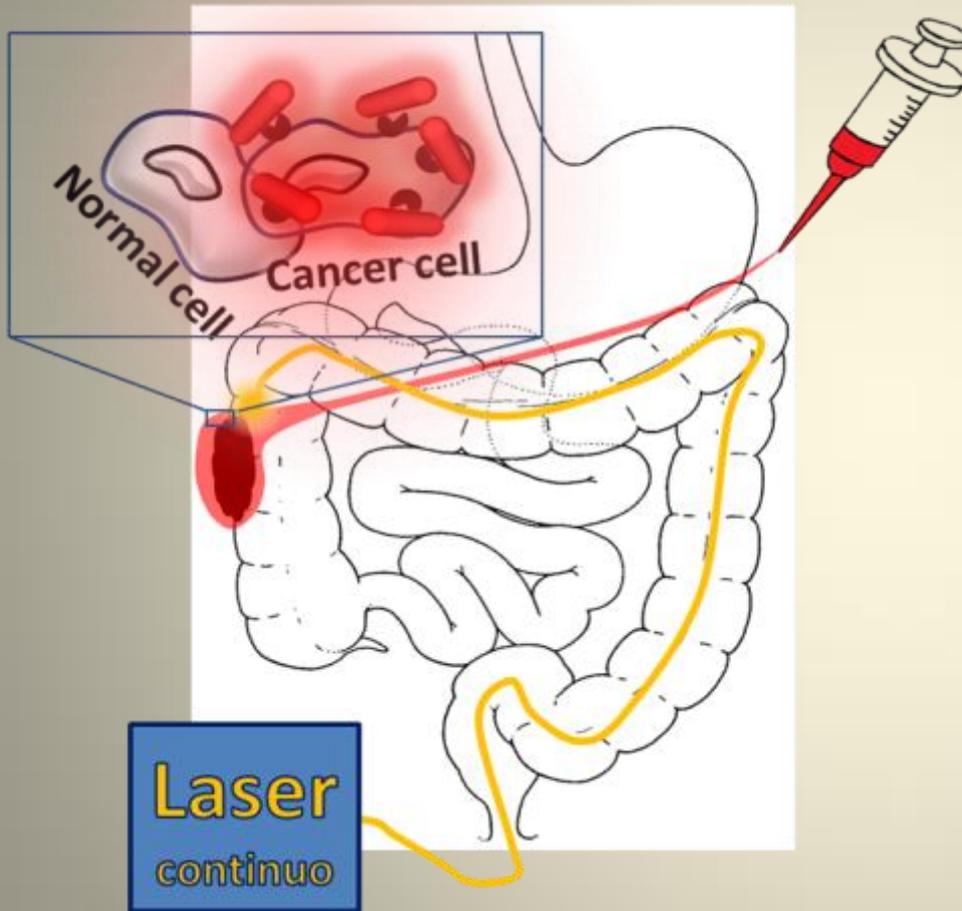
SAR Specific Absorbtion Rate

DIAGNOSI E CURA DEL CANCRO CON LA LUCE



Le caratteristiche che rendono le particelle che interagiscono con il NIR adatte sono:

1. Biocompatibilità
2. Efficienza e stabilità di assorbimento ottico
3. Capacità di circolare nei vasi sanguigni (non devono ostruire i vasi)
4. Specificità per il tumore



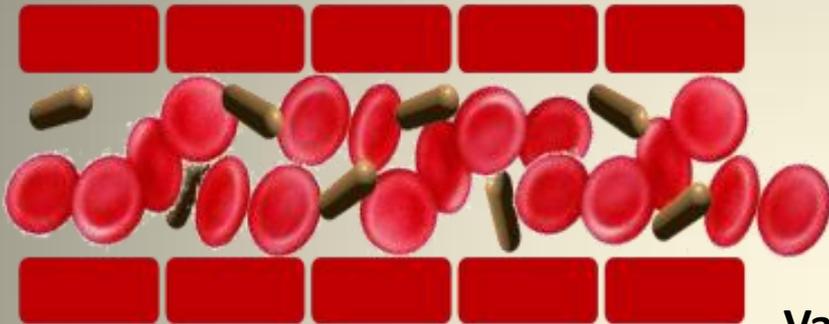
La luce del NIR (l'infrarosso vicino) viene assorbita da tumore ed emette ultrasuoni e si riscalda.

Gli infrarossi prendono il nome a seconda della lunghezza d'onda.

Il NIR o infrarosso vicino ha quindi una lunghezza d'onda piccola infatti è compresa tra 0.75 micron e 1,4 micron.

LE NANOPARTICELLE COME RAGGIUNGONO IL TUMORE?

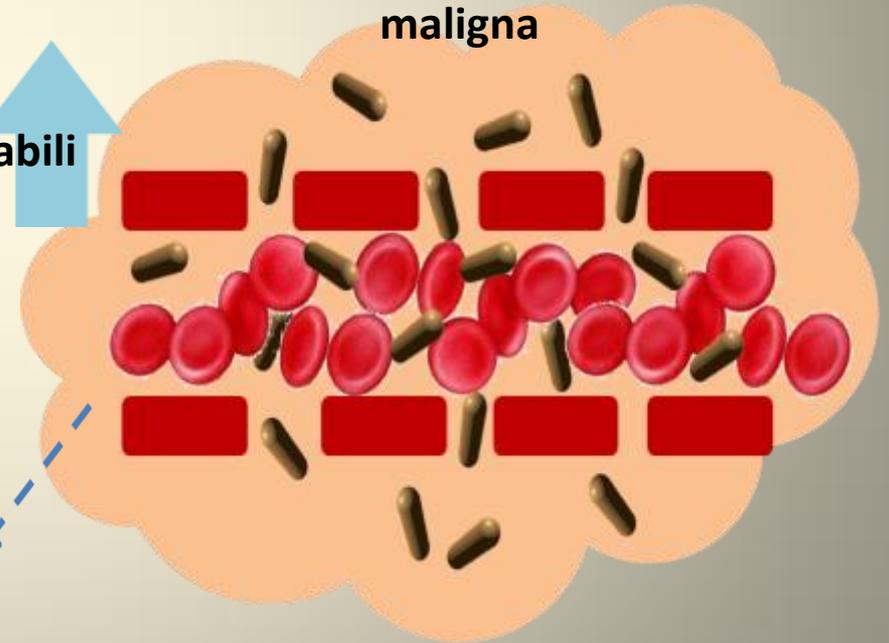
Tessuto sano



Crescendo un tumore produce una vascolarizzazione difettosa e un drenaggio linfatico carente.

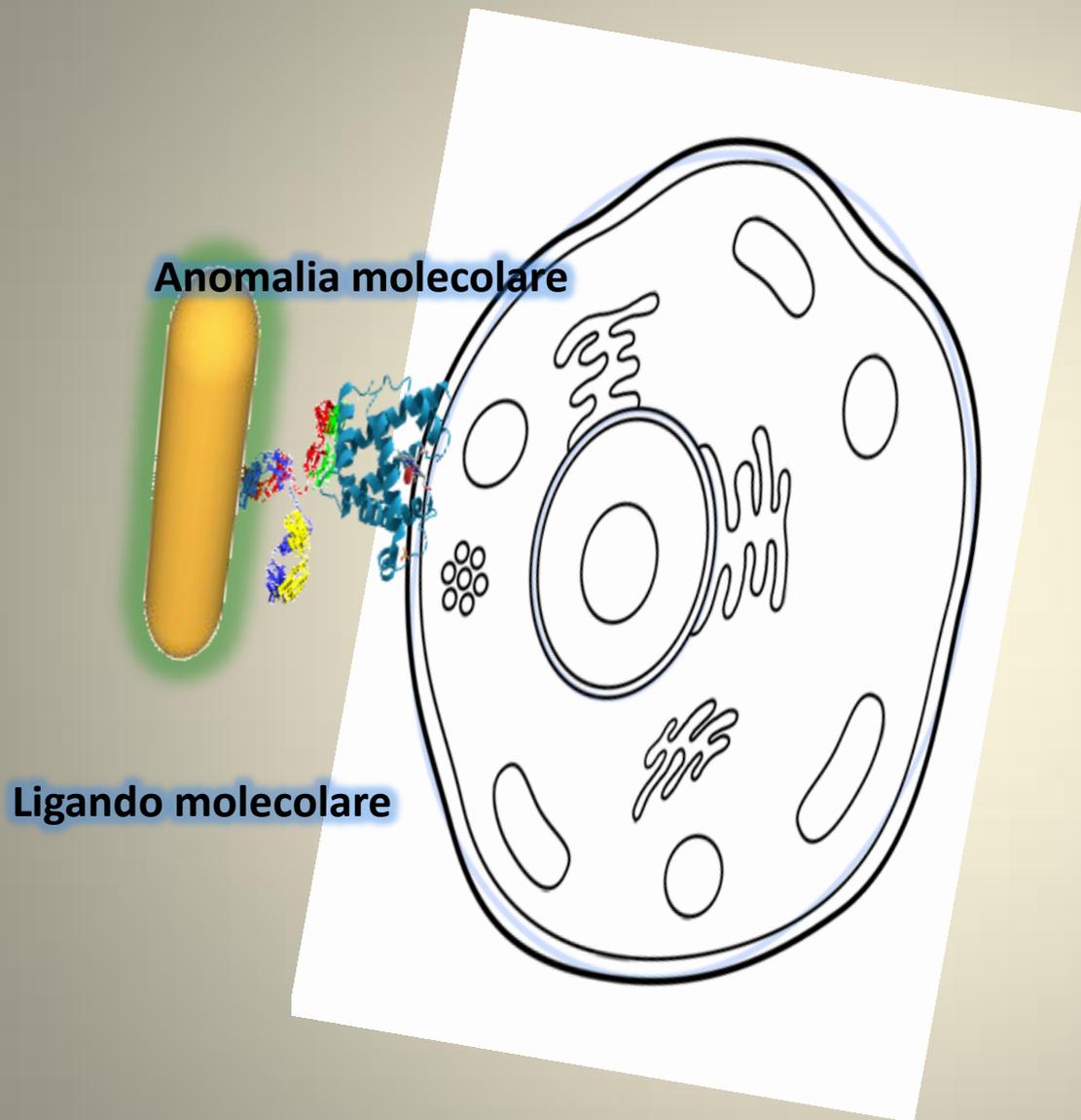
Lesione maligna

Vasi permeabili



Il tumore trattiene ed assorbe le particelle.

Drenaggio carente



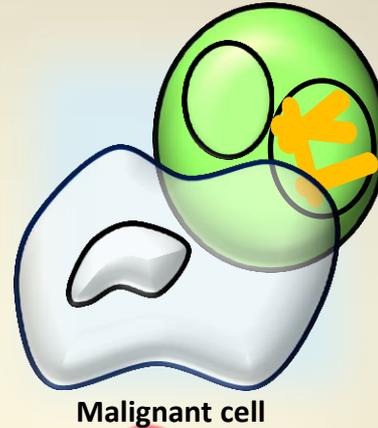
Enfatizzazione effetto EPR :

Target molecolari associati
alle mutazioni maligne

Target molecolari associati
al microambiente tumorale

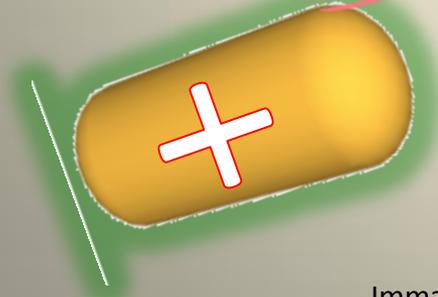
I VETTORI CELLULARI

Le anomalie del microambiente tumorale richiamano diverse cellule immunitarie



COATING:
globuli rossi, bianchi e cellule immunitarie.

Le particelle vengono modificate per caricare le cellule immunitarie in vitro.



11 Marzo 2015: SIMULAZIONE al CNR

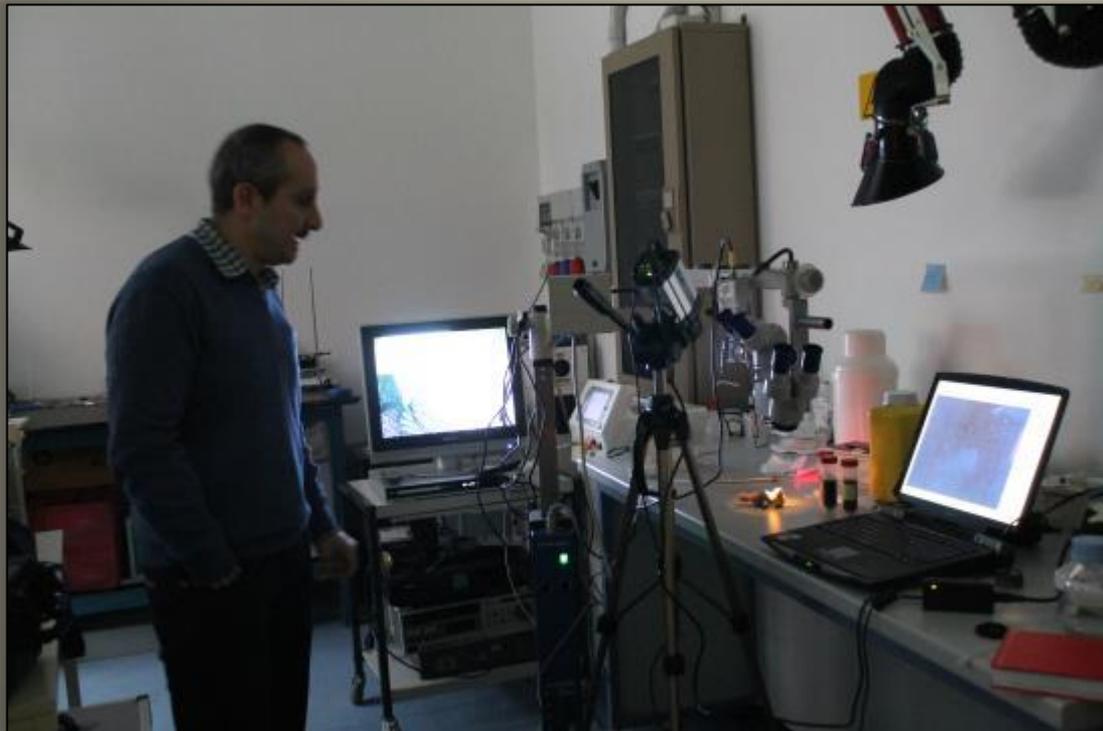
Strumentazione:

Petto di pollo

Laser (NIR)

Telecamera termica

Nanoparticelle d'oro



Procedura:

Iniettare nanoparticelle d'oro nel pollo.

Stimolare le nanoparticelle d'oro con il laser (NIR).

Le particelle emettono ultrasuoni e si riscaldano (come si vede dalla telecamera termica).

Per uccidere il tumore basta alzare la temperatura a 43°C quando le cellule muoiono per apoptosi temperatura maggiore per ottenere un effetto visibile sul pollo.

Durante i laboratori sono state adottate tutte le norme di sicurezza del caso:

**camice, occhiali, guanti di protezione, uso delle cappe aspiranti.....
e corretto smaltimento di tutti i materiali.**

COORDINATORE PLS-AREA CHIMICA FIRENZE

**Prof.ssa Claudia Giorgi – Dipartimento di Chimica “Ugo Schiff”
Università degli Studi di Firenze**

Dott.ssa Elisabetta Lottini – Laboratory of Molecular Magnetism (LAMM)

Dott. Martin Albino - Laboratory of Molecular Magnetism (LAMM)

Dott.ssa Lucia Cavigli –  IFAC CNR Dott. Fulvio Ratto –  IFAC CNR

Classe 4C

Alice Berti
Alessia Cioni
Alessandro Emo
Anna Gallo
Alessandro Giuricin
Sofia Nicolai
Gianluca Peri
Sara Secci
Gabriele Sirotti
Giada Tortorelli
Elena Vannini

Classe 4 E

Sara Fratini
Laura Gorrone
Simone Lombardi
Matteo Miniati
Alessio Vannucci

Classe 4F

Barbara Argetta
Ilaria Fibbi
Gabriele Rocchi
Maximilian Trama

Fotografie:



Sara Fratini 4E

**Prof.ssa Sandra Focardi
Prof. Gianluca Giorgi**