

LE NANOPARTICELLE PER LA BIOMEDICINA

La sfida nei prossimi decenni della scienza della vita sarà effettuare analisi in-situ ed in vivo al livello micro, individuare il legame tra le molecole biologiche e la loro funzione ed intervenire su di esse per il miglioramento della salute dell'uomo. Poiché le nanoparticelle possono giungere ad avere dimensioni molto prossime a quelle delle biomolecole (vedi fig. 1), il loro uso può essere molto importante per vincere questa sfida. Vi è un vasto campo della loro applicazione in medicina e biotecnologia, nella diagnostica delle malattie, il rilascio di medicinali, la riparazione di geni, la gene terapia, ecc. .

In anni recenti le nanoparticelle del tipo core-shell biocompatibili hanno avuto un notevole sviluppo ed attratto interesse da parte della comunità scientifica internazionale operante nella chimica analitica, nell'ambito di una collaborazione multidisciplinare tra ricercatori operanti nelle nanotecnologie, nella chimica, nei materiali e nella biotecnologia.

Le nanoparticelle core-shell possono essere utilizzate nella biochimica analitica, nella separazione delle biomolecole e per eseguire delle immagini bio.

1. Configurazione di nanoparticelle core-shell

Queste nanoparticelle hanno dimensioni tra 1 e 100 nanometri e sono costituite da una parte interna funzionalizzata all'interno di una struttura esterna (shell) modificabile e delle biomolecole sulla superficie esterna per rendere le particelle biocompatibili (vedi fig. 2). Tutte queste tre parti svolgono un ruolo determinante sulla funzione assegnata alla nano particella.

La parte interna della nano particella (cuore) può essere preparata con differenti materiali, termici, luminescenti, elettronici, magnetici, ecc., sicché la funzionalità che le particelle possono svolgere spazia in un vasto campo di applicazioni della biomedicina. Ad esempio le nanoparticelle aventi all'interno dei coloranti fluorescenti possono essere usati per individuare mediante la tecnica della fluorescenza numerose biomolecole e tessuti. Nanoparticelle aventi nel cuore dei semiconduttori quali CdSe, chiamati anche quantum dots, sono utilizzate per sensori grazie al fatto che i quantum dots possono emettere segnali in una banda di luminescenza molto stretta in funzione della dimensione della loro dimensione. Se nel cuore delle nanoparticelle è presente la magnetite $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, le nanoparticelle possono essere utilizzate per la separazione e l'arricchimento di molecole biologiche da analizzare, infine ponendo all'interno del cuore un medicinale è possibile trasportare tale medicinale incapsulato in struttura esterna sino al tessuto dove deve avvenire la somministrazione, ovviamente con grande efficienza curativa.

Per quanto riguarda la struttura esterna (shell) essa può essere costituita da materiale inorganico, organico (polimeri). Il materiale inorganico più utilizzato è l'ossido di silicio. Se viene confrontato con un materiale organico di tipo biologico, i liposomi, esso presenta caratteristiche superiori in quanto non è soggetto ad attacchi microbici, è resistente ai sali presenti nella bile ed alla lipasi presente nelle vie gastrointestinali e può resistere a trattamenti in autoclave. Inoltre, l'ossido di silicio è chimicamente inerte e quindi non compromette reazioni di ossido-riduzione che possono avvenire in superficie. Quale shell organico viene spesso utilizzato il chitosano, il materiale costituente la parte esterna dei crostacei, in quanto esso è solubile in acqua, molto stabile e biocompatibile.

La biocompatibilità delle nanoparticelle, atta a garantirne la funzionalità, è affidata a molecole che vengono adsorbite sulla superficie della struttura esterna. In particolare biomolecole modificate

possono svolgere un importante ruolo nelle applicazioni biologiche. In tal senso possono esser utilizzate proteine che includono anticorpi o antigeni, enzimi, DNA o RNA. La funzione che ha la sostanza posta all'esterna della nano particella è il riconoscimento è la tracciabilità del tessuto con cui la nano particella viene in contatto. Alcuni esempi di nanoparticelle core-shell con il cuore magnetico sono riportate in Tabella 1.

2. Sintesi delle nanoparticelle core-shell biocompatibili

La nanoparticelle dovranno avere una dimensione tra 1 e 100 nm ed una distribuzione granulometrica stretta. La produzione avviene in tre fasi:

1. Generazione per nucleazione della nanoparticelle presenti nel cuore
2. Formazione dello shell per coating
3. Modificazione biologica della superficie

Com'è noto vi sono molte tecniche per produrre **nanoparticelle, che costituiranno il cuore** delle nanoparticelle core-shell: da fase gas, liquida, da sol gel, etc. . La tecnica più adatta è in questo caso quella di microemulsione o emulsione inversa. Le goccioline delle nanoparticelle, disperse in un sistema organico in cui sono immiscibili, contengono all'interno il materiale che deve originare le nanoparticelle del cuore (vedi fig. 3) e funzionano come un nano reattore che successivamente comporta la formazione della struttura esterna. La dimensione delle goccioline, determinata da un opportuno sistema per la formazione delle emulsioni, controlla la dimensione e la distribuzione granulometrica della nanoparticelle prodotte. Attraverso questa tecnica si ottengono particelle molto uniformi per forma e dimensioni, infatti tale tecnica viene adottata per produrre il cuore di nanoparticelle con quantum dots, materiale magnetico, medicinale, etc. .

La **configurazione esterna (lo shell)** è realizzato per coating sopra le particelle precedentemente ottenute per aumentare la stabilità chimica, migliorare la biocompatibilità e la resistenza meccanica delle particelle presenti nel cuore. Si possono usare materiali inorganici ed organici. Un tipico esempio sono le particelle che hanno un coating di ossido di silicio biocompatibile. La tecnica consiste, in questo caso, nel trattare le goccioline emulsionate con tetraetossidosilano (TEOS) che viene idrolizzato sulla superficie delle goccioline stesse, in presenza di ammoniaca come catalizzatore di idrolisi (vedi fig. 4). Nel nanoreattore costituito dalle goccioline microemulsionate è possibile anche porre le molecole di TEOS funzionalizzate con terminali vinilici, amminici o di altro tipo per l'uso delle particelle in biomedicina. In fig. 5 sono riportate le immagine delle particelle prodotte con questa tecnologia. Ad esempio le nanoparticelle di ossido di silicio modificato con il gruppo amminico può essere sintetizzato direttamente mediante idrolisi sincrona di TEOS e AEAPS - N-(β-ammonoetile- γ-aminopropiltriethossilano) nelle goccioline emulsionate in olio

Nel caso in cui si ha un cuore magnetico si può adottare la seguente procedura:

- 1) si fa avvenire la precipitazione tra cloruro di ferro e solfito di sodio, in presenza di ammoniaca, ottenendo idrossido di ferro, $\text{Fe}(\text{OH})_3$;
- 2) viene evaporata l'acqua e si ottiene l'ossido idrato e per riscaldamento la sua forma anidra;
- 3) calcinando a 1400 °C si ottiene la magnetite $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$;
- 4) le particelle così ottenute si pongono in una soluzione acquosa agitata contenente il 3 % di silicato di sodio 3%, ottenendo così la precipitazione dell'ossido di silicio sulle particelle di magnetite;
- 5) le nanoparticelle possono essere poste in stufa ad essiccare.

La **modifica biologica delle nanoparticelle** è fondamentale per legare le nanoparticelle alle molecole biologiche che fanno parte delle cellule da analizzare o individuare. Ad esempio quantum dots modificati possono dare evidenza delle particelle a cui si legano con un cambiamento di colore o diffrazione della luce e quindi possono essere utilizzati come biosensori. Ma i quantum dots hanno una bassa biocompatibilità e devono essere assolutamente modificati per ridurre la loro citotossicità in vitro ed in vivo.

Per modificare biologicamente le nanoparticelle vi sono tre metodi:

La modifica può avvenire in situ durante l'operazione di sintesi. Come sopra descritto per l'ossido di silicio, la sintesi contemporanea di TEOS e AEAPS che comporta un coating del cuore con un ossido di silicio modificato con un gruppo amminico.

Il secondo metodo consiste nel far adsorbire una biomolecola sulla superficie della nano particella, stabilendo un legame di tipo fisico. Questa tecnica può però portare al distacco della biomolecola dalla superficie della nano particella.

Il metodo più utilizzato è quello di definire un legame di tipo chimico tra il gruppo funzionale già fissato sulla nano particella ad una biomolecola. In fig. 6 sono riportate svariate reazioni che portano a legare una molecola biologica che ha un terminale in grado di reagire con un terminale presente sulla superficie esterna delle nanoparticelle, detto legante. Le coppie di legante-recettore più comuni sono: biotina-avidina, anticorpo-antigene, etc.

3. Applicazioni delle nanoparticelle core-shell

Le applicazioni possono essere le più varie nel campo della biomedicina. Le più frequenti sono in campo analitico, ma vi sono anche applicazioni quale rilascio di medicinale, in quest'ultimo caso, però la particella composita presenta spesso una configurazione esterna di materiale organico, tipicamente il chitosano.

In campo analitico una delle applicazioni più frequenti è quella riguardante la metodica analitica basata sulla fluorescenza. Vi sono dei prodotti chimici che attribuiscono fluorescenza all'interno o all'esterno di cellule con cui si legano, riuscendo a fornire indicazioni importanti per una diagnosi precoce. Purtroppo questi prodotti hanno delle limitazioni sia in quanto possono subire una parziale eliminazione delle loro qualità riducendo l'intensità della fluorescenza, sia perché in quantità significative possono essere tossici. Le nanoparticelle con quantum dots forniscono intensità di fluorescenza molto più elevata (vedi fig. 7). Ad esempio nanoparticelle di CdSe ricoperte con ZnS presentano rispetto al colorante rodamina una luminescenza 20 volte più elevata e una stabilità 100 volte superiore rispetto ad agenti che riducono la fluorescenza.

Le nanoparticelle immesse nell'organismo individuano e si legano alle cellule da individuare attraverso i loro leganti (vedi fig. 8).

Tabella 1 : Esempi di particelle core-shell con cuore magnetico

Materiale dello shell	Modificazione superficiale	Applicazione
SiO ₂	DNA	Separazione DNA
Chitosano	Enzimi	Purificazione di enzimi
Acido polilattico	Medicinale antinoplastico	Individuazione di celle cancerogene

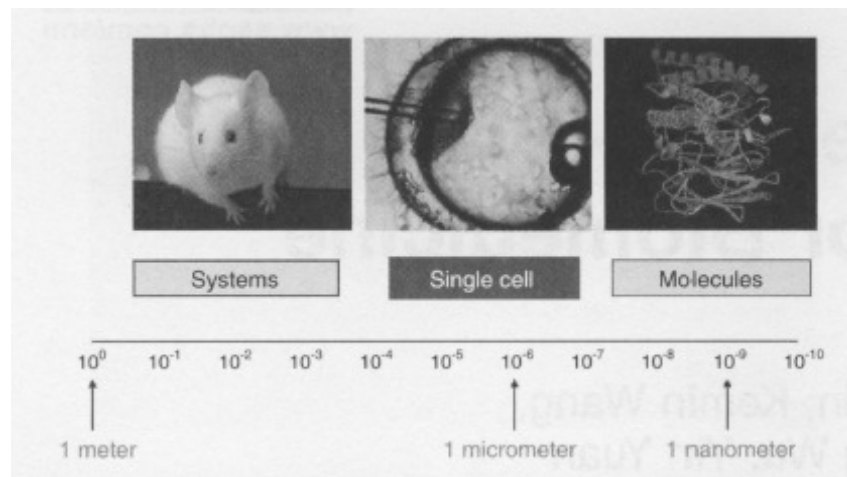


Figura 1 Dimensioni di diversi oggetti da considerare in biomedicina

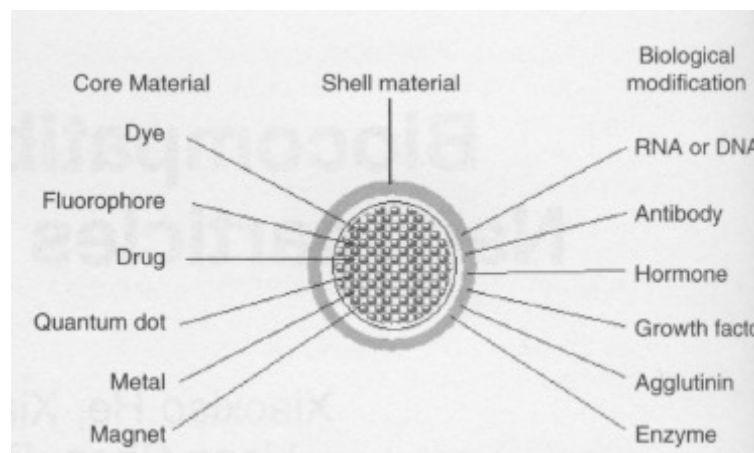


Figura 2 Nanoparticelle core-shell e loro uso

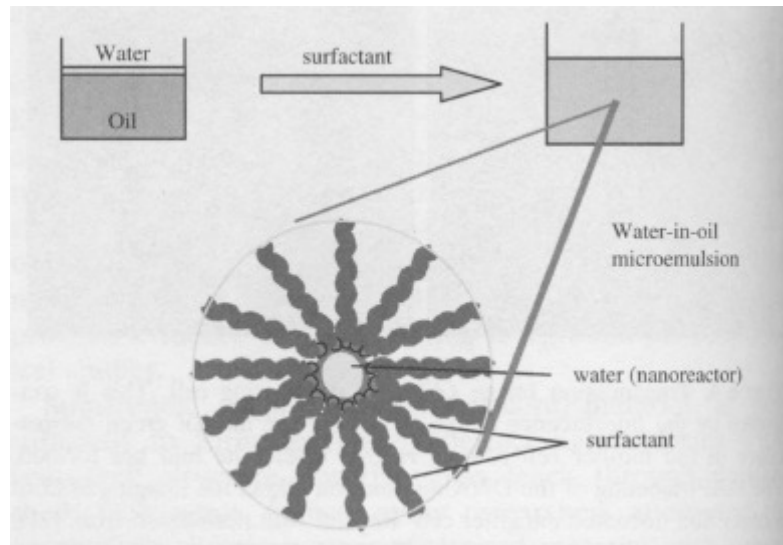


Figura 3 Produzione delle nanoparticelle core-shell per microemulsione

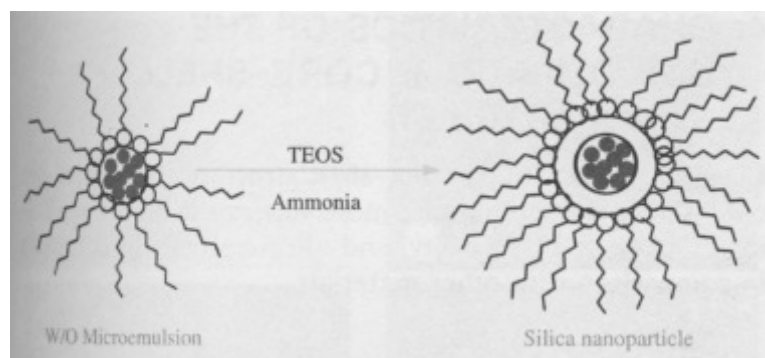


Figura 4 Creazione dello shell delle nanoparticelle core-shell

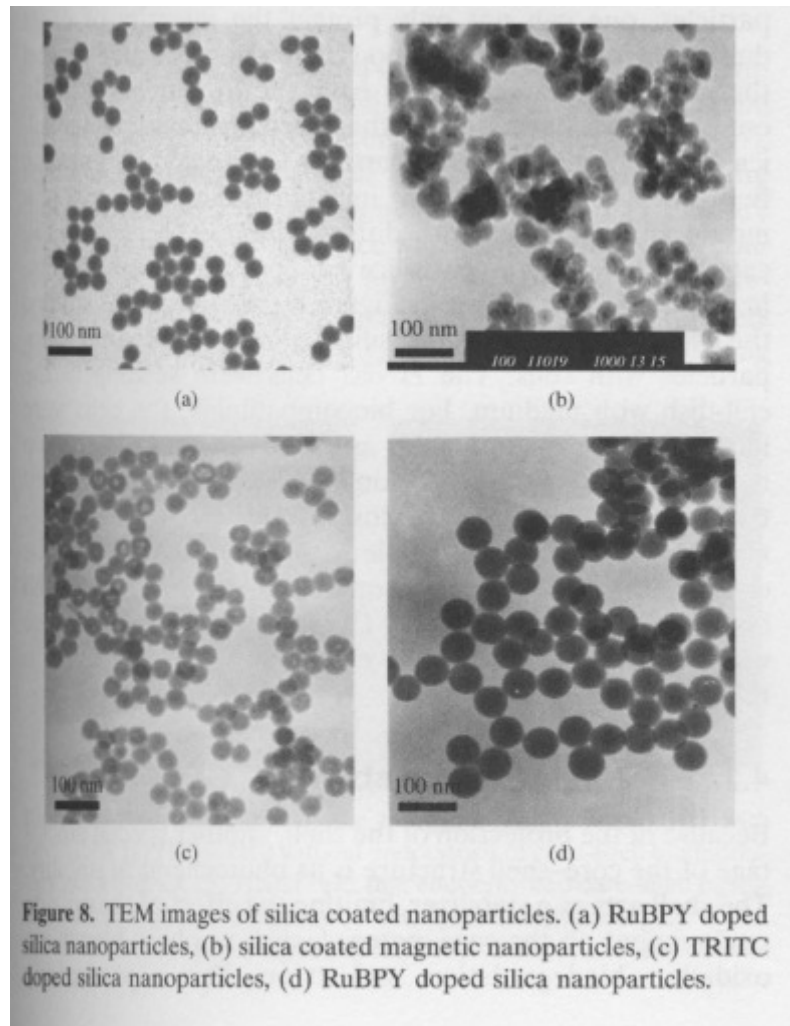


Figure 8. TEM images of silica coated nanoparticles. (a) RuBPY doped silica nanoparticles, (b) silica coated magnetic nanoparticles, (c) TRITC doped silica nanoparticles, (d) RuBPY doped silica nanoparticles.

Figura 5 Immagini al TEM di nanoparticelle core-shell con la ricopertura in ossido di silicio funzionalizzato

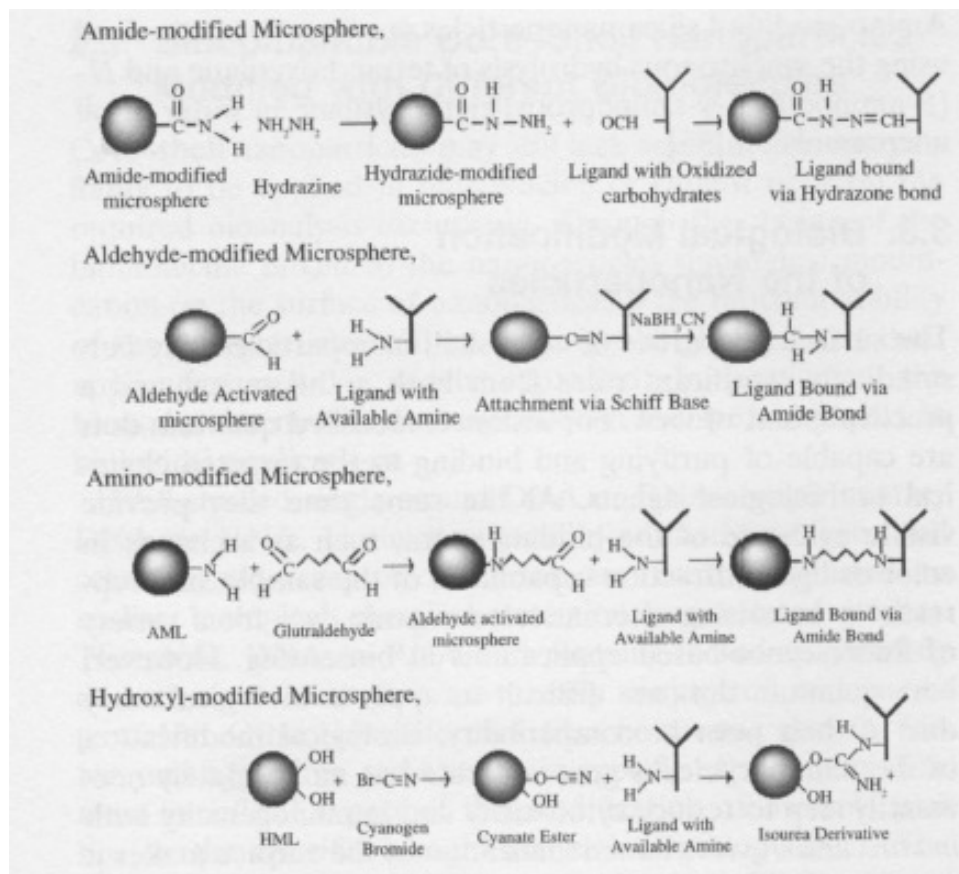


Figure 6 Modificazione biologica delle nanoparticelle

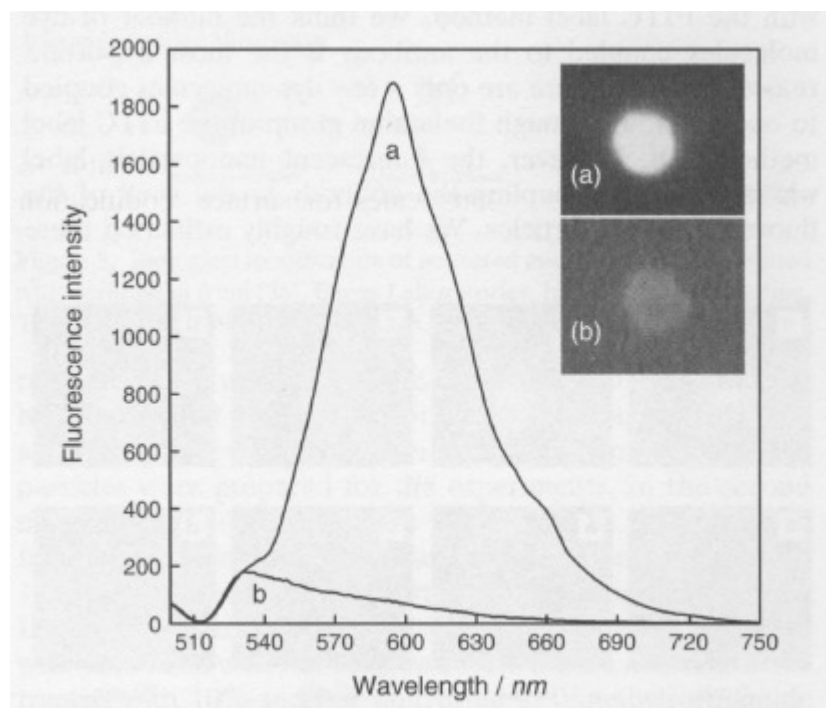


Figura 7 Emissione dello spettro ed immagini di linfociti: a) in presenza di nanoparticelle; b) in presenza di sostanze chimiche (FITC)

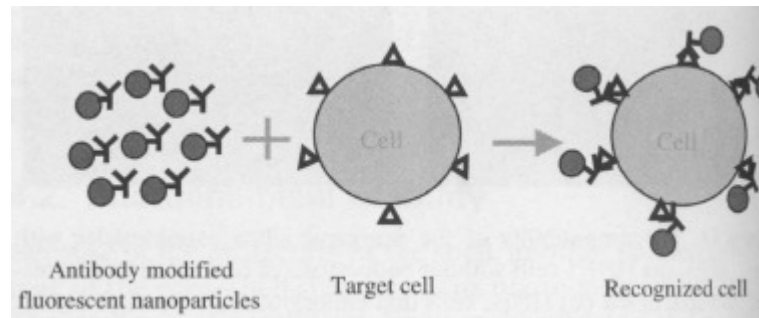


Figura 8: Legame tra nanoparticelle e cella da individuare