

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE DEI MATERIALI

INKJET PRINTING DI PROTEINE PER LA PREPARAZIONE DI SPOTS  
ANTIGENICI

Relatore: Prof. Moreno Meneghetti

Correlatore: Prof. Marina Gobbo

Controrelatore: Prof. Filippo Romanato

Laureando: Mattia Pallone

Anno Accademico 2022/2023



## Indice

<b>1.Introduzione.....</b>	<b>1</b>
1.1 Nanomedicina.....	1
1.1.1 Nanoparticelle Plasmoniche.....	2
1.1.2 ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.....	4
1.1.3 Interazione PD1-PDL1.....	5
1.2 Tecnica dell'inkjet Printing 2D.....	6
1.2.1 Funzionamento e principi fisici .....	6
1.2.2 Bioinkjet Printing.....	10
1.3 Spettroscopia Raman e tecnica SERS.....	13
1.3.1 Uso delle tecniche SERS per la rivelazione delle biomolecole.....	17
1.4 Spettroscopia di fluorescenza.....	18
1.5 Interazione Avidina-Biotina.....	20
<b>2.Scopo della tesi.....</b>	<b>22</b>
<b>3.Risultati e discussione.....</b>	<b>24</b>
3.1 Processo di stampa.....	24
3.1.1 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro.....	24
3.1.2 Formulazione e caratterizzazione dell'inchiostro.....	28
3.1.3 Stampa e waveform utilizzate.....	36
3.2 Riconoscimento della Neutravidina con tecnica SERS sugli spots stampati.....	40
3.2.1 Sintesi di NPAu funzionalizzate con peptide biotinilato e Texas Red.....	40
3.2.2 Stima della concentrazione di peptide nella soluzione delle NP funzionalizzate.....	44
3.2.3 Analisi Raman degli spot incubati con NPAu funzionalizzate.....	47
3.3 Riconoscimento della Neutravidina sugli spot stampati con report fluorescente.....	54
3.3.1 Preparazione della soluzione di Atto biotina 590.....	54
3.3.2 Analisi al fluorimetro degli spot incubati con la soluzione di Atto biotina 590.....	56

<b>4. Conclusioni e sviluppi futuri.....</b>	<b>58</b>
<b>5. Materiali e metodi.....</b>	<b>60</b>
5.1 Reagenti.....	60
5.2 Strumentazione.....	60
5.3 Ottimizzazione del processo di stampa.....	62
5.3.1 Prove di stampa.....	62
5.3.2 Caratterizzazione fisica dell'inchiostro.....	64
5.4 Ottimizzazione del protocollo per la preparazione delle particelle biotinilate con attività SERS.....	67
5.4.1 Taratura di Ellman.....	67
5.4.2 Ottimizzazione del protocollo di incubazione .....	69
<b>Bibliografia.....</b>	<b>71</b>

# **1.Introduzione**

## **1.1 Nanomedicina**

La nanomedicina è una branca della medicina in cui i nanomateriali vengono utilizzati per fini diagnostici o terapeutici. Le nanoparticelle giocano un ruolo chiave per via delle loro caratteristiche: elevata attività dovuta ad un'alta energia superficiale; facilità di funzionalizzazione con diversi ligandi, che consente, per esempio, la modulazione della solubilità in diversi solventi; proprietà meccaniche, elettriche ed ottiche che dipendono dalle loro dimensioni.<sup>1</sup>

Le nanoparticelle possono essere utilizzate come vettori di agenti molecolari,<sup>2</sup> che vengono inclusi nelle nanostrutture per poi essere rilasciati sul sito designato, o come efficienti sonde di imaging. I nanovettori presentano diversi vantaggi rispetto agli agenti molecolari convenzionalmente usati in medicina. Importante è per esempio la capacità di creare dispersioni acquose stabili di molecole idrofobe, ottenendo agenti molecolari attivi nell'ambiente biologico. Questi nanosistemi mostrano di essere resistenti alla degradazione dovuta a vari meccanismi di difesa endogeni (degradazione enzimatica) e inoltre possono essere creati per un trasporto mirato non solo su specifici organi e tessuti del corpo, ma anche su unità cellulari o subcellulari.

Le principali tipologie di nanovettori utilizzati sono a base polimerica, lipidica o inorganica (figura 1).<sup>2</sup>

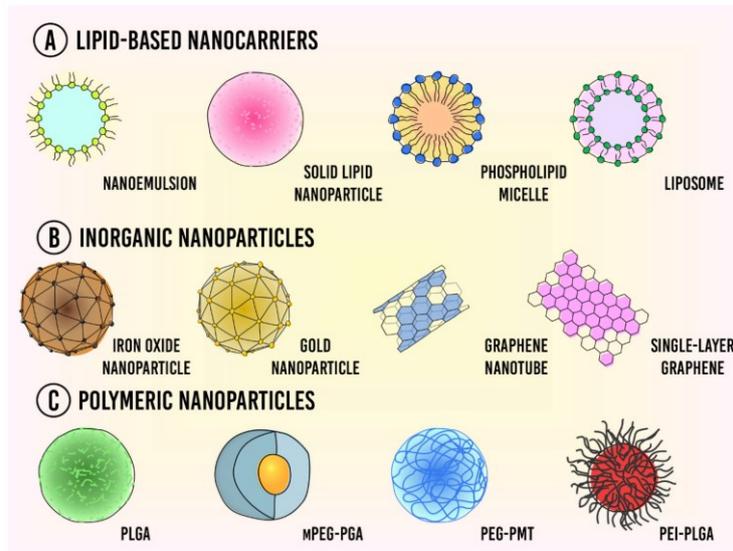


Figura 1. Rappresentazione dei differenti tipi di nanovettori utilizzati in nanomedicina.<sup>2</sup>

I nanocluster inorganici presentano il vantaggio di essere estremamente robusti, molto stabili con caratteristiche ottiche e magnetiche interessanti. I sistemi metallici plasmonici, in particolare, presentano numerose potenzialità per la nanomedicina. Essi rendono possibile la realizzazione di saggi immunologici diagnostici per le cellule tumorali e, attraverso lo sfruttamento della loro risonanza plasmonica consentono di utilizzare anche altre tecniche per l'imaging come la tecnica SERS (surface enhanced Raman scattering

### 1.1.1 Nanoparticelle plasmoniche

Le nanoparticelle ottenute con materiali metallici sono interessanti in particolar modo per il loro elevato coefficiente di estinzione e, soprattutto, per il forte assorbimento da loro esibito anche nel visibile e nel NIR. Esso è dovuto alla risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR). La LSPR si verifica quando le oscillazioni degli elettroni della banda di conduzione del materiale plasmonico entrano in risonanza con il campo elettromagnetico di una radiazione luminosa incidente, generando un'oscillazione collettiva che segue la componente elettrica incidente (figura 2). Questo processo si osserva in particolar modo quando le dimensioni della nanoparticella sono minori della lunghezza d'onda della radiazione incidente ( $\lambda > 2r$ , con  $r$  = raggio della nanoparticella).

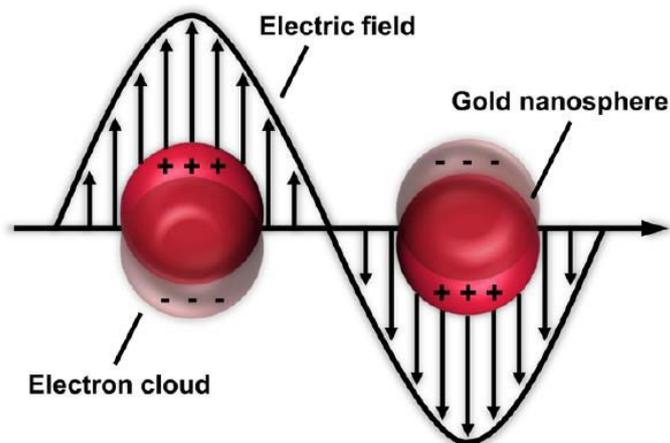


Figura 2. Rappresentazione grafica del fenomeno della risonanza plasmonica dato da nanoparticelle d'oro.

Grazie a tale fenomeno è possibile osservare un picco nello spettro di estinzione, che, nel caso di nanoparticelle metalliche può ricadere nel visibile, generando molte volte delle soluzioni colorate. Il colore di tali soluzioni è importante perché è indicativo di dimensioni, forme o eventuali clusterizzazioni delle nanoparticelle.<sup>3</sup>

Le nanoparticelle d'oro (di cui in figura 3 sono riportate le variazioni delle sezioni d'urto di assorbimento, scattering ed estinzione in relazione al diametro delle nanoparticelle, 20-40-80 nm)<sup>3</sup> presentano un'elevata stabilità chimico-fisica e una reattività/tossicità molto bassa. Possono facilmente essere funzionalizzate con molecole biologiche attraverso la formazione di legami con gruppi carbossilici, amminici e in particolare tiolici. Per questo, esse si dimostrano dei supporti altamente biocompatibili e, di conseguenza, sono molto utilizzate nell'ambito della nanomedicina, specialmente, come si vedrà in dettaglio più avanti, per la diagnostica in cui si sfrutta appunto il fenomeno della LSPR. Per questa loro stabilità e facilità di funzionalizzazione, le nanoparticelle d'oro sono state utilizzate in questo lavoro di tesi.

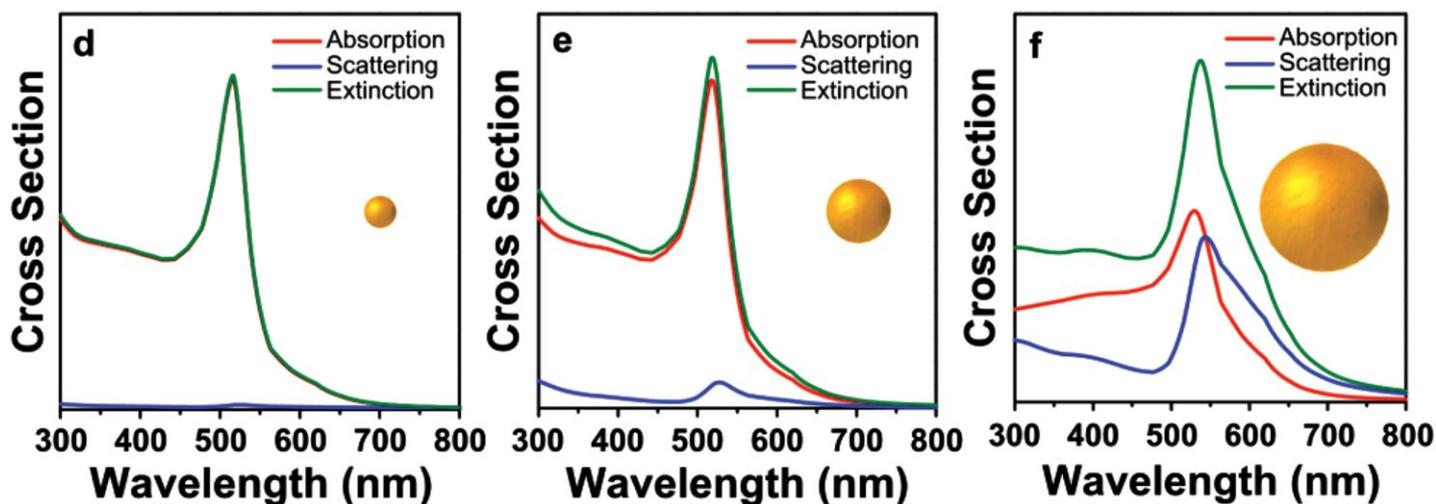


Figura 3. Variazione delle sezioni d'urto di assorbimento, scattering ed estinzione di Nanoparticelle d'oro al variare della taglia.<sup>3</sup>

### 1.1.2 ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Il test ELISA è un saggio immunologico realizzato su fase solida utilizzato per rilevare la presenza in modo qualitativo e quantitativo di un particolare ligando e viene comunemente utilizzato per identificare la presenza di particolari antigeni o anticorpi.<sup>4</sup> Nel dettaglio, il funzionamento di tale test si basa su tre step fondamentali (figura 4):

1. Assorbimento passivo dell'antigene specifico su una serie di pozzetti disposti su un supporto solido mediante incubazione (figura 4.a). Dopo l'incubazione, ogni antigene non legato al pozzetto viene rimosso attraverso lavaggio, lasciando il pozzetto rivestito selettivamente dell'antigene specifico (figura 4.b).
2. Incubazione del pozzetto con una soluzione contenente un ligando specifico in grado di legarsi con l'antigene immobilizzato (figura 4.c). Successivo lavaggio del pozzetto che consente di togliere tutti i ligandi non legati (figura 4.d). In questo passaggio, il ligando può essere marcato con un gruppo fluorescente o un marker Raman (figura 4.e).
3. Verifica della presenza dell'antigene sui pozzetti mediante analisi spettrofotometrica, Raman o analisi colorimetrica (dipende dal ligando utilizzato nella fase 2).

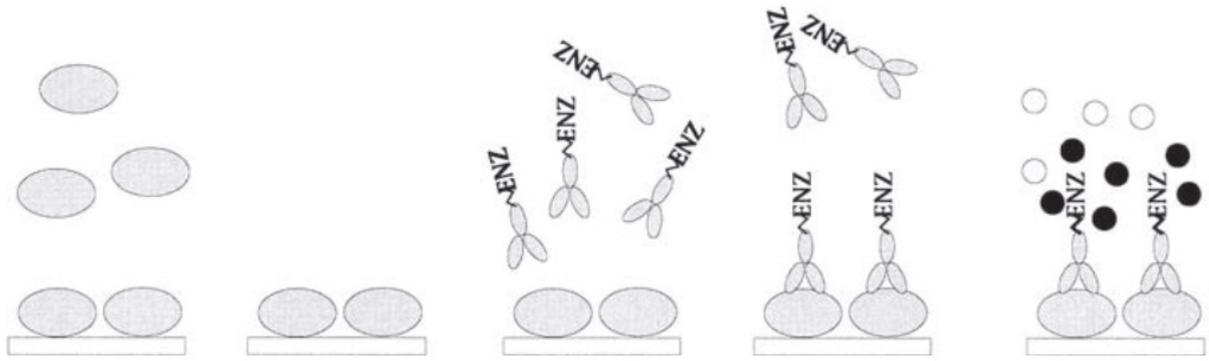


Figura 4. Rappresentazione grafica del funzionamento del test ELISA. a) assorbimento passivo dell'antigene; b) lavaggio del pozzetto; c) incubazione del pozzetto con il ligando specifico; d) eliminazione dei ligandi non legati mediante lavaggio; e) ligando con marker Raman o fluorescente.

Tale metodologia di lavoro può dunque risultare molto utile per la realizzazione di antigen spots, ovvero dei supporti solidi in cui è possibile avere degli antigeni tumorali assorbiti in maniera selettiva.<sup>5</sup> Un antigene tumorale è una molecola espressa su cellule tumorali. È chiaro come la possibilità di avere degli antigeni tumorali presenti in maniera selettiva su un supporto solido sia un passo molto importante verso il monitoraggio e il trattamento non invasivo dell'evoluzione dinamica dei tumori.

### 1.1.3. Interazione PD1-PDL1

Un antigene tumorale di grande interesse è PD-L1 (Programmed Death Ligand 1), un antigene sovraespresso sulla superficie delle cellule tumorali che è in grado di interagire con la proteina PD-1 (Programmed Death-1) presente sulla membrana dei linfociti T, cellule killer del sistema immunitario. Tale interazione porta alla soppressione dell'attivazione dei linfociti T, permettendo così alle cellule tumorali di eludere la sorveglianza del sistema immunitario e di proliferare.<sup>6</sup>

È di particolare interesse avere sistemi cellulari che sovresprimono PD-L1 per poter verificare l'efficacia di nanosistemi che lo possono riconoscere. Parallelamente, si possono però costruire anche dei dispositivi in cui la proteina viene spazialmente confinata per esempio su una superficie. Questo può essere ottenuto per esempio stampando la proteina con una stampante 2D. Questo sarà lo scopo principale del lavoro di tesi.

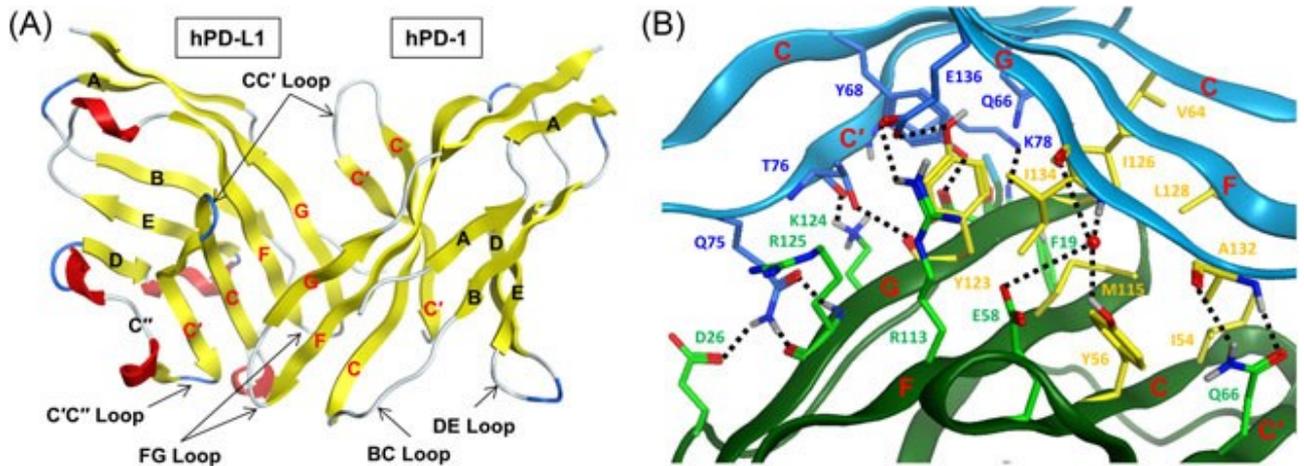


Figura 5. Rappresentazione strutturale dell'interazione tra PD-L1 e PD-1 nel suo insieme (A) e nel sito specifico (B).<sup>6</sup>

## 1.2. Tecnica dell'inkjet printing 2D

### 1.2.1. Funzionamento e principi fisici

Nel corso degli ultimi anni la tecnica dell'inkjet printing è stata esplorata come un metodo innovativo ed efficace per poter depositare piccole molecole sopra un determinato substrato. Tale tecnica si basa sulla deposizione di gocce di un "inchiostro" in cui viene disperso il materiale da depositare. Una volta avvenuta la deposizione si ha l'evaporazione del solvente contenuto nell'inchiostro e quindi la deposizione selettiva del materiale non evaporato (figura 6). Tale tecnica offre svariati vantaggi pratici, quali bassi costi di processo, velocità di stampa, produzione minima di materiali di scarto e possibilità di processare differenti tipi di sostanze. Esistono due diversi meccanismi con cui è possibile generare gocce: Drop on demand (DOD) e getto d'inchiostro continuo (CIJ). La prima metodologia di stampa permette di generare gocce con un diametro inferiore, riuscendo dunque ad ottenere una risoluzione di stampa elevata: per questo motivo è largamente utilizzata.

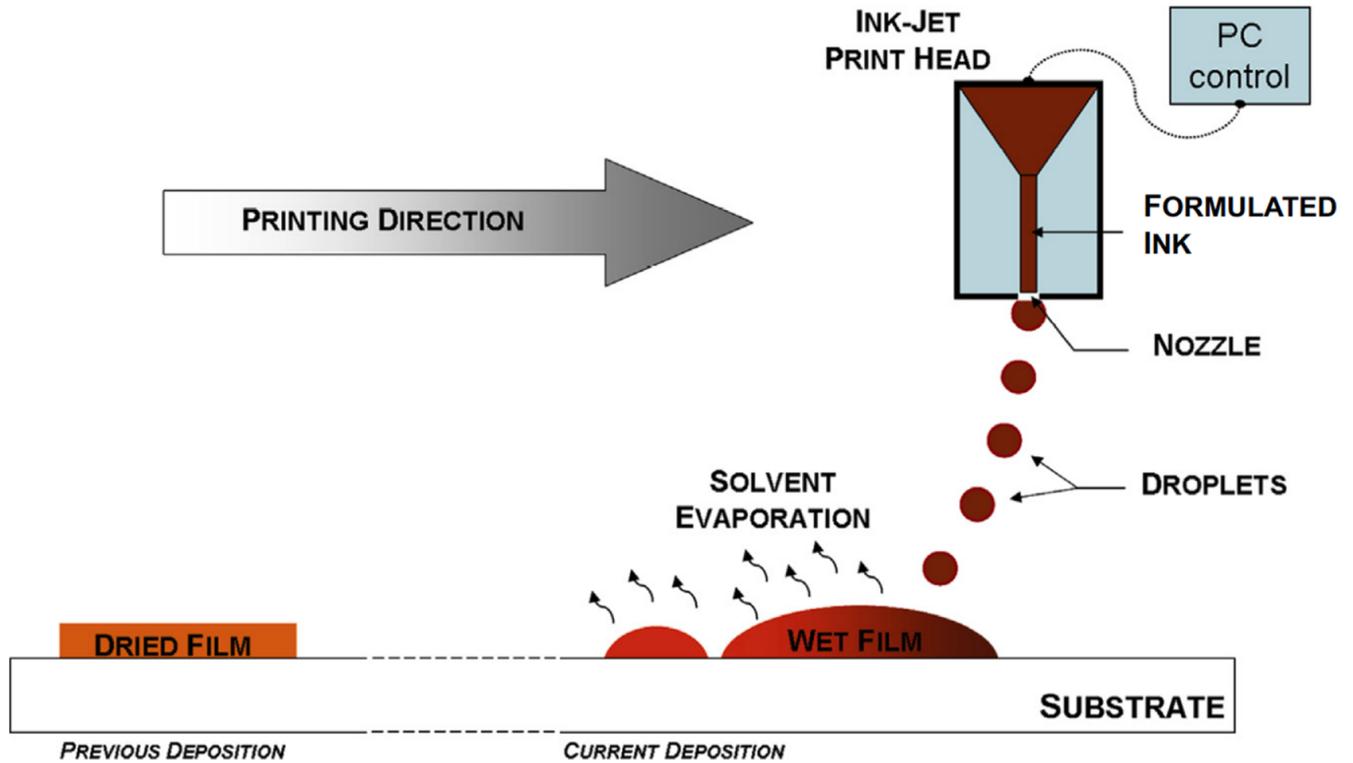


Figura 6. Rappresentazione schematica del funzionamento della tecnica dell'inkjet printing.

Gli elementi che compongono l'apparato sperimentale di tale tecnica sono:

- Camera contenente l'inchiostro.
- Cartuccia della stampante.
- Sistema di trasporto del fluido dalla camera alla cartuccia.
- Supporto per il substrato.
- Camera per l'allineamento tra il substrato e la cartuccia.

Di particolare importanza è la cartuccia, che controlla la formazione e l'espulsione delle gocce d'inchiostro; essa deve essere composta di un materiale che le permetta di resistere ad un ampio range di solventi. La cartuccia viene caratterizzata dal numero di ugelli che possiede e dal volume delle gocce che può generare.

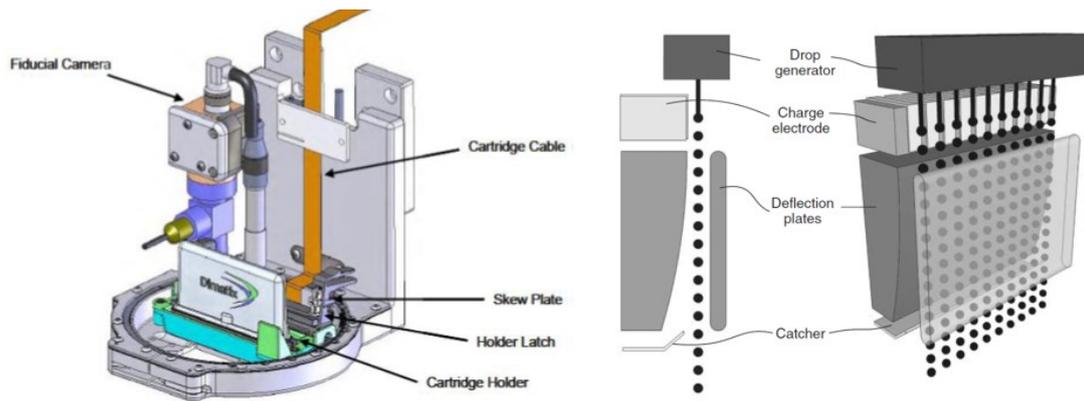


Figura 7. a) Rappresentazione di tutti gli elementi che consentono il funzionamento della cartuccia nella tecnica dell'inkjet printing; b) rappresentazione della fuoriuscita dell'inchiostro dagli ugelli nella tecnica DOD

Il sistema che permette la formazione delle gocce all'interno della cartuccia viene governato da dei movimentatori piezoelettrici che, deformandosi meccanicamente in risposta all'applicazione di una tensione, sono in grado di modulare la quantità di inchiostro che entra nella cartuccia e l'espulsione della goccia.

La tensione applicata al materiale piezoelettrico in funzione del tempo (waveform) di deposizione è uno dei parametri fondamentali da gestire per poter ottenere una stampa uniforme. In particolare, la waveform si divide in quattro fasi:

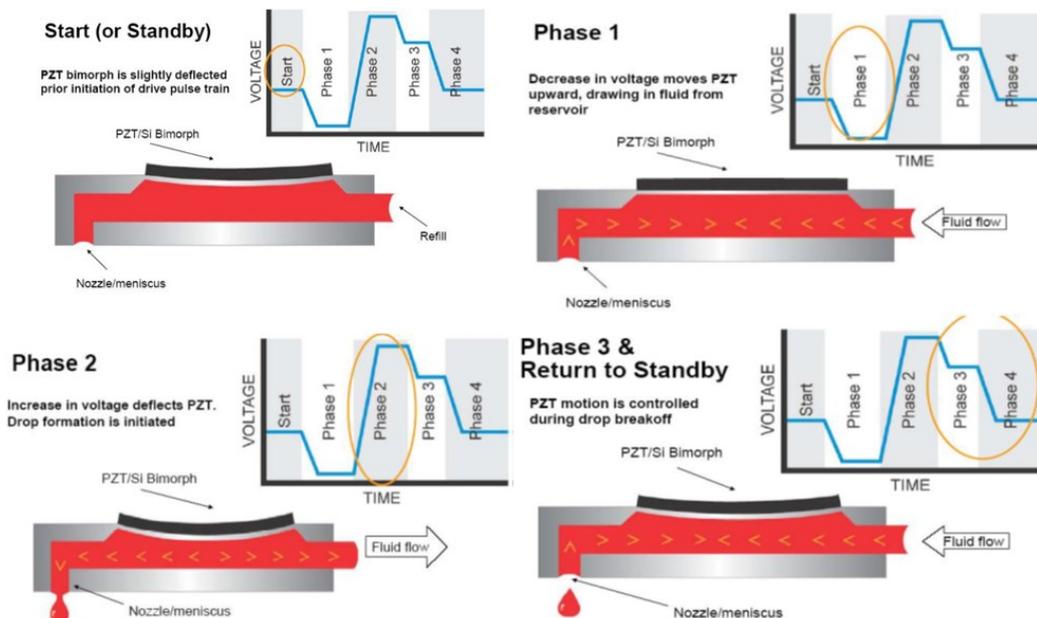


Figura 8. Rappresentazione schematica del funzionamento dei movimentatori piezoelettrici durante il processo di stampa. Start: situazione iniziale in cui il movimentatore non è deformato; fase 1: diminuzione del voltaggio che consente l'ingresso dell'inchiostro nella camera della cartuccia; fase 2: rapido incremento

*del voltaggio, che fa fuoriuscire l'inchiostro dalla camera e che permette la formazione della goccia; fase 3: decremento del voltaggio, che fa fuoriuscire la goccia permettendone la deposizione.*

La scelta della giusta waveform da utilizzare durante il processo di stampa dipende dalle caratteristiche fisiche dell'inchiostro; in particolare, sono tre i parametri fondamentali utilizzati per caratterizzare l'inchiostro: tensione superficiale ( $\gamma$ ), viscosità dinamica ( $\eta$ ) e densità ( $\rho$ ). Partendo da queste grandezze è stato possibile identificare un parametro sperimentale ( $Z$ ) che serve ad indicare la possibilità di utilizzare un determinato liquido come inchiostro per la tecnica dell'inkjet printing. Tale parametro tiene conto anche del diametro dell'ugello utilizzato ( $\alpha$ ) ed è definito come l'inverso del numero di Ohnesorge ( $Oh$ ); nel dettaglio:

$$N_{Re} = \frac{v\alpha\rho}{\eta}$$

*Eq. 1*

$$N_{We} = \frac{v^2\alpha\rho}{\gamma}$$

*Eq. 2*

$$Oh = \frac{\sqrt{N_{We}}}{N_{Re}}$$

*Eq. 3*

$$Z = \frac{1}{Oh} = \frac{\sqrt{\gamma\rho\alpha}}{\eta}$$

*Eq. 4*

Dove:  $v$  è la velocità del flusso;  $N_{Re}$  è il numero di Reynolds;  $N_{We}$  è il numero di Weber.

Generalmente,  $10 > Z > 1$  è l'intervallo adatto per la generazione di gocce stabili. Per  $Z < 1$ , la dissipazione viscosa impedisce l'espulsione della goccia. Per  $Z > 10$ , l'inchiostro viene espulso fluentemente dall'ugello, ma la goccia possiede un'energia cinetica troppo elevata che porta alla rottura del filamento e alla formazione di gocce satelliti,<sup>7</sup> Alcuni studi dimostrano la possibilità di ottenere con successo una stampa anche con valori di  $Z > 10$ .<sup>8</sup> Sebbene la stampabilità di un fluido possa essere valutata dal suo numero di Ohnesorge, ci sono altri fattori che influenzano la formazione della goccia, come la barriera di tensione

superficiale fluido-aria in corrispondenza dell'ugello. Infatti, affinché la goccia sia espulsa, bisogna raggiungere una velocità minima di espulsione che permetta di superare tala barriera.<sup>8</sup> La velocità minima è data da:

$$v_{min} = \left(\frac{4\gamma}{\rho\alpha}\right)^{1/2}$$

Eq. 5

### 1.2.2. Bioinkjet printing

Come accennato nella sezione precedente, la tecnica dell'inkjet printing e, più nello specifico, la modalità drop on demand, consentono la deposizione di un'ampia varietà di materiali, compresi quelli di matrice biologica; da qui nasce il nome di bioinkjet printing. Gli inchiostri utilizzabili per questo tipo di tecnica devono rispettare determinate caratteristiche oltre al requisito base dei biomateriali, e cioè la loro biocompatibilità. Per la tecnica del bioinkjet printing sono consigliati i seguenti intervalli di valori:<sup>9</sup>

- viscosità dinamica nell'intervallo di 3-30 mPa s;
- tensione superficiale di 20-70 mJ m<sup>-2</sup>;
- densità di circa 1000 kg m<sup>-3</sup>.

Un altro particolare elemento che bisogna considerare è che il diametro di particelle sospese nell'inchiostro, se presenti, deve essere molto minore del diametro dell'ugello presente in una cartuccia, altrimenti si rischia l'otturazione. L'applicazione di biomateriali nell'inkjet printing consente di poter ampliare gli ambiti in cui è possibile agire con questa tecnica, come la verifica di attività farmacologiche (drug screening), la modellazione di biomateriali e la fabbricazione di cell-free scaffold.<sup>9</sup>

I principali biomateriali utilizzati nell'inkjet bioprinting sono:

- Idrogel, utilizzati poiché la loro viscosità può essere facilmente controllata e la loro capacità di mimare il microambiente può essere utile per avere l'adesione, la proliferazione o la migrazione di cellule.
- Polimeri, ampiamente utilizzati nelle applicazioni biomediche grazie alla loro facilità di lavorazione, leggerezza, flessibilità, elevata resistenza specifica ed elevata disponibilità.
- Piccole molecole disciolte o sospese negli inchiostri (soluzioni acquose o organiche). Le microgocce generate dalla stampante fungono da eccellenti vettori

per queste piccole molecole. La viscosità di questo tipo di inchiostri può essere regolata aggiungendo alcuni modificatori, tra cui glicoli, glicerolo, mentre i tensioattivi vengono solitamente aggiunti per ridurre la tensione superficiale per facilitare la stampa.

Attraverso la tecnica dell'inkjet printing è dunque possibile effettuare la stampa di diversi inchiostri contenenti alcune proteine. In figura 9 e in figura 10 vengono mostrati i risultati ottenuti con inchiostri contenenti BSA (Albumina di siero bovino) e alcune aggiunte per provare a migliorare le proprietà aerologiche del fluido, come la carbossimetilcellulosa (CMC).<sup>7</sup> Tale studio riesce a dare l'idea di come sia possibile variare le caratteristiche di un bioink utilizzando molecole per la modifica delle viscosità e tensioattivi per la modifica di tensione superficiale e di come questi vadano ad influire sul risultato di stampa.

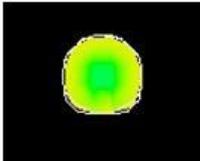
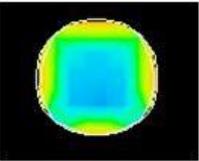
Description	(a) BSA bio-ink 1 (BSA + No modifier)	(b) BSA bio-ink 2 (BSA + CMC)	(c) BSA bio-ink 3 (BSA + Triton X-100)	(d) BSA bio-ink 4 (BSA + CMC + Triton X-100)
Droplet Spread				
Droplet Diameter	26 $\mu\text{m}$	16 $\mu\text{m}$	31 $\mu\text{m}$	33 $\mu\text{m}$

Figura 9. Differenza della forma e del diametro di gocce formate da 4 differenti inchiostri contenenti BSA e opportunamente modificati per migliorare la stampa.<sup>7</sup>

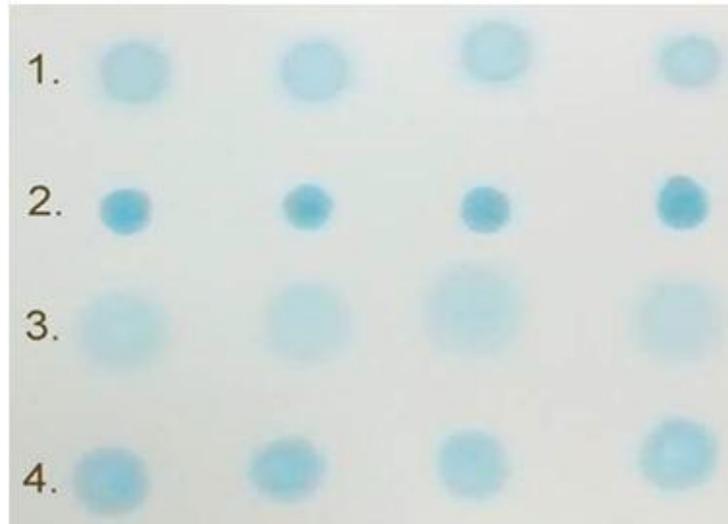


Figura 10. Risultato della stampa ottenuta con i vari inchiostri contenenti BSA. 1(BSA); 2(BSA+CMC); 3(BSA+Triton X-100); 4(BSA+CMC+Triton X-100).<sup>7</sup>

Un'altra interessante applicazione offerta da questa tecnica risiede nella possibilità di stampare direttamente cellule sul substrato. In figura 11 viene mostrato il risultato di un lavoro in cui si è effettuata la stampa cellulare con la tecnica del DOD con un ugello da 30  $\mu\text{m}$ .<sup>10</sup> Da questo lavoro si nota come i parametri di stampa vadano ad influenzare fortemente i risultati ottenuti; infatti, si nota come le dimensioni dell'ugello e le concentrazioni delle cellule all'interno dell'inchiostro influiscano fortemente sul numero di cellule 3T3 stampate. Tale risultato, dunque, sottolinea come questa tecnica sia utilizzabile anche per stampare cellule viventi con una precisione dell'ordine di grandezza cellulare (30  $\mu\text{m}$ ).

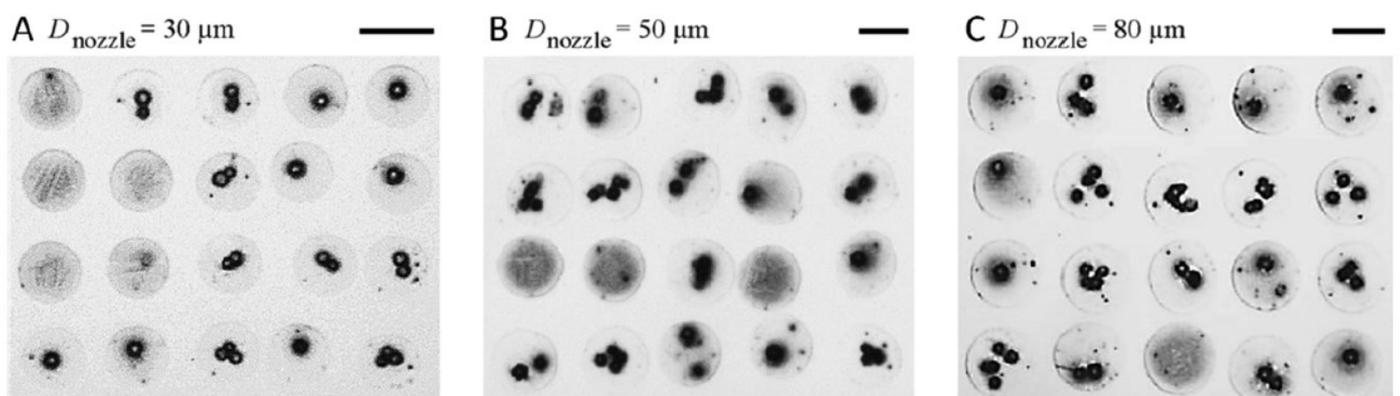


Figura 11. Distribuzione del numero di cellule 3T3 stampate con la tecnica dell'inkjet printing utilizzando ugelli con differente diametro.<sup>10</sup>

### 1.3 Spettroscopia Raman e tecnica SERS

Le deposizioni che verranno realizzate con la stampa saranno caratterizzate al microscopio ottico, avendo dimensioni di qualche decina di  $\mu\text{m}$ . Inoltre, verrà utilizzata la tecnica Raman per l'identificazione molecolare.

La spettroscopia Raman è una tecnica di caratterizzazione di materiali basata sullo scattering, noto come effetto Raman. Questo si verifica quando una radiazione luminosa, di data frequenza ( $\nu_0$ ), interagisce con un campione e viene diffusa in maniera anelastica, ovvero ad una frequenza differente ( $\nu$ ); si ha lo scattering di Stokes quando la frequenza diffusa è minore di quella incidente, e scattering di anti-Stokes quando la frequenza è maggiore. Figura 12.

La differenza di energia tra i fotoni incidenti e quelli diffusi anelasticsearchamente corrisponde a livelli energetici vibrazionali della molecola che ha interagito con la radiazione, per cui l'analisi spettrale dovuta all'effetto Raman offre informazioni sulla struttura molecolare e quindi sulla composizione del campione. La differenza di energia dei fotoni iniziali e scatterati, che corrisponde a energie vibrazionali, viene espressa in numeri d'onda (Raman Shift,  $\text{cm}^{-1}$ ).

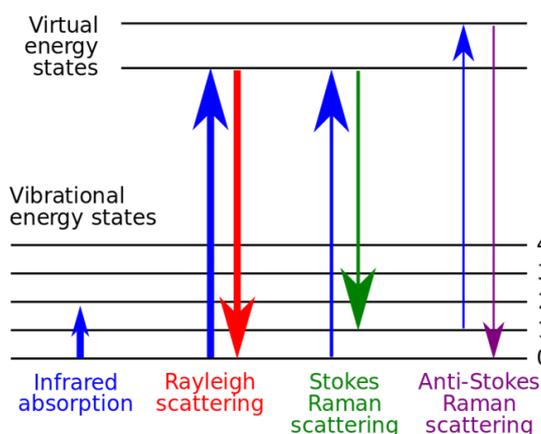


Figura 12. Rappresentazione grafica degli scattering di Rayleigh, Stokes e anti-Stokes.

Lo scattering di Rayleigh (scattering elastico) è la transizione ampiamente più probabile. In questo caso non si verifica alcun cambiamento nello stato vibrazionale della molecola che interagisce con i fotoni. La transizione anelastica di tipo anti-Stokes è meno comune, in quanto richiede che la molecola si trovi in uno stato vibrazionale eccitato prima che il fotone incida su di essa. Generalmente, nelle misurazioni Raman viene utilizzato solo lo scattering di Stokes. In figura 13 si raffigurano le intensità relative dei diversi tipi di scattering.<sup>11</sup>

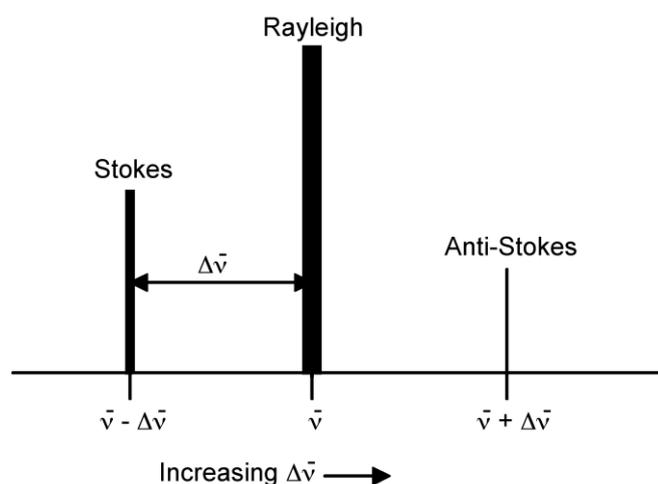


Figura 13. Rappresentazione grafica delle frequenze e delle intensità dei vari tipi di scattering.<sup>11</sup>

Il manifestarsi dell'effetto Raman è strettamente legato al grado di polarizzabilità delle molecole del campione irraggiato, poiché lo scambio di energia tra la radiazione e la molecola avviene solo se c'è una variazione della distribuzione della nuvola elettronica dovuta al moto di vibrazione degli atomi rispetto alla posizione di equilibrio.<sup>11</sup>

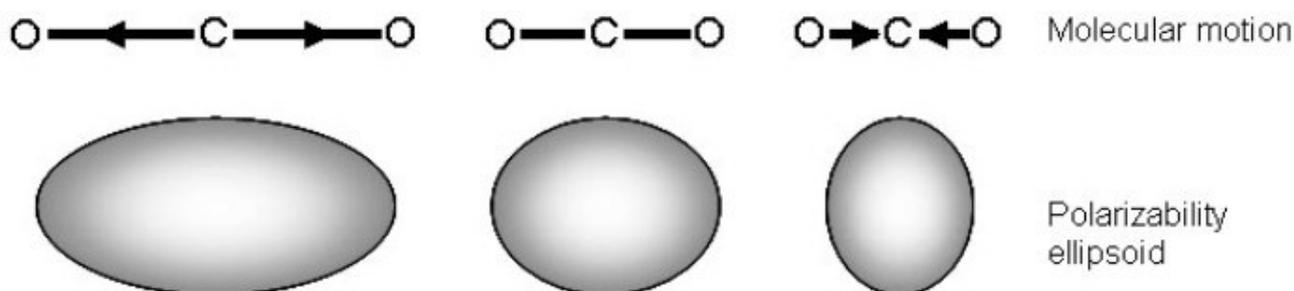


Figura 14. Variazione della polarizzabilità in una molecola di CO<sub>2</sub>.<sup>11</sup>

La spettroscopia Raman può fornire informazioni su specie chimiche sia organiche che inorganiche, specialmente su quelle che possiedono molti elettroni debolmente legati, che tendono perciò ad avere alte polarizzabilità. Essa è largamente utilizzata poiché è una tecnica non distruttiva, non richiede particolari condizioni per l'esecuzione della misura e può essere effettuata direttamente sul campione senza nessuna preparazione.

Il più grande svantaggio di tale tecnica spettroscopica risiede nel fatto che il segnale Raman è intrinsecamente debole (meno dello 0,001% dell'intensità della sorgente); per ovviare a tale problema si ricorre alla tecnica SERS (Surface Enhanced Raman Scattering). In questa

tecnica le molecole Raman vengono adsorbite sulla superficie di nanoparticelle plasmoniche con LSPR a lunghezze d'onda simili a quella della radiazione incidente. In questo modo si possono avere amplificazioni del segnale anche di circa  $10^9$  rispetto a quello normalmente osservato. I nanomateriali di metalli nobili sono perciò di particolare interesse per le loro proprietà ottiche, e sono perciò molto utilizzati per ottenere l'intensificazione dei segnali Raman.<sup>12</sup>

Le molecole presenti nelle vicinanze della superficie delle nanoparticelle plasmoniche risentono di un campo elettromagnetico amplificato ( $EF_{SERS}$ ) proporzionale alla quarta potenza del fattore di local field enhancement ( $f_e$ ) che rappresenta quanto il campo elettrico viene amplificato dalla presenza della nanoparticella.

$$EF_{SERS} \propto |f_e|^4 \tag{Eq. 6}$$

$$f_e = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \tag{Eq. 7}$$

$\varepsilon_m$ : costante dielettrica assoluta;

$\varepsilon$ : costante dielettrica del metallo di cui è composta la nanoparticella.

Si è soliti identificare l'amplificazione SERS come parte di due contributi: un contributo elettromagnetico, che è stato appena descritto, e un contributo chimico.

Nel contributo chimico si crea uno stato di trasferimento di carica (CT) tra il metallo e le molecole adsorbite; tuttavia, questo effetto crea di solito amplificazioni molto minori, dell'ordine di  $10$ - $10^2$ .

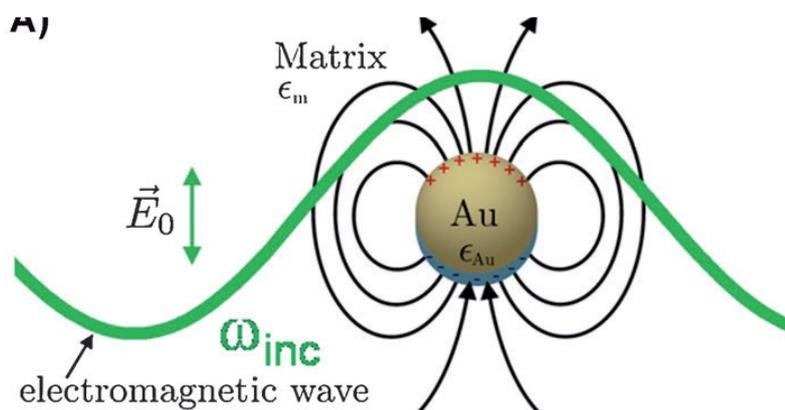


Figura 15. Effetto SERS elettromagnetico. La nanoparticella d'oro si comporta come amplificatore dopo l'eccitazione della LSPR.<sup>12</sup>

Inoltre, se le molecole Raman attive assorbite sulla superficie assorbono a lunghezze d'onda vicine a quelle della radiazione incidente si ha l'aumento della sezione d'urto di scattering, che si traduce in un'amplificazione ancora maggiore del segnale Raman - in tal caso, si parla di SERRS (Surface Enhanced Resonant Raman scattering). Tale tecnica può essere utilizzata per la caratterizzazione di una densità di molecole molto bassa. In tali condizioni si può avere un'amplificazione del segnale fino a  $10^{15}$  volte rispetto al segnale non amplificato.<sup>12</sup>

Ci sono, inoltre, diversi fattori che possono portare all'aumento dell'intensità del segnale Raman vicino a una superficie metallica:<sup>11</sup>

- Distanza della molecola dalla superficie metallica: la molecola di interesse deve essere vicina alla superficie affinché si verifichi il potenziamento del segnale.
- Morfologia e rugosità della superficie metallica: questa caratteristica permette di ottenere strutture geometriche con possibili valori di grande amplificazione.
- Proprietà del metallo: la massima amplificazione del segnale si ottiene quando la lunghezza d'onda di eccitazione è simile alla frequenza della risonanza plasmonica del metallo.

### 1.3.1 Uso delle tecniche SERS per la rilevazione delle biomolecole

Non avendo problemi di fotobleaching e di fotodegradazione - fenomeni che si riscontrano in altre tecniche di imaging come la fluorescenza - la tecnica Raman SERRS può essere utilizzata con lunghi tempi di rilevazione. Questa possibilità, unita a quella di distinguere in modo preciso i segnali vibrazionali, rende questa tecnica di particolare interesse per rilevare la presenza di biomolecole associate a particolari funzioni cellulari o rilevanti nell'insorgere di fenomeni patologici.

Un aspetto di cui, però, bisogna tener conto risiede nella scarsa attività SERS delle strutture proteiche: ciò si traduce in un'efficienza di scattering relativamente modesta che comporta la nascita di spettri complessi e spesso non riproducibili.<sup>13</sup> Per tale motivo la tecnica SERRS viene utilizzata in maniera indiretta combinando una molecola con intensi segnali Raman ben distinguibili (SERS reporter) ad una biomolecola in grado di riconoscere in maniera specifica la proteina di interesse, entrambe legate ad una nanoparticella plasmonica.

Un colorante molto utilizzato come SERRS reporter, vista la possibilità di funzionalizzarlo per legarlo a nanoparticelle metalliche, è la molecola di Texas Red (sulforhodamine 101 con funzioni tioliche), di cui in figura 16 viene mostrata la struttura chimica e lo spettro Raman e in figura 17 lo spettro Raman.

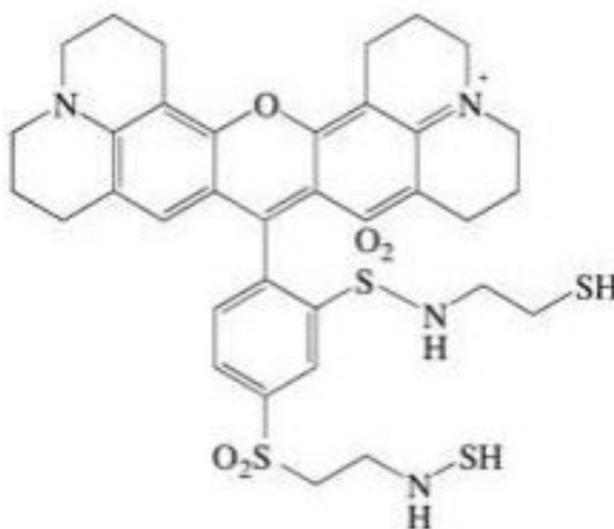


Figura 16. Struttura chimica del Texas Red.<sup>14</sup>

Una difficoltà nell'utilizzo di questa tecnica risiede nella preparazione delle nanostrutture SERS, le quali devono essere in grado di riconoscere specifici marcatori proteici. Tali nanostrutture richiedono di essere progettate e, in genere, sono necessarie diverse prove per

poter identificare la struttura ottimale del nanosistema. Il laboratorio in cui ho svolto il lavoro di tesi, il Nanostructures and Optics Laboratory del Dipartimento di Scienze Chimiche, si occupa da anni di nanostrutture SERS, che vengono funzionalizzate con peptidi e che si configurano come agenti di targeting per recettori proteici sovraespressi su cellule tumorali.<sup>15</sup> Nel lavoro di tesi verranno costruiti dei nanosistemi SERS per rivelare la presenza di proteine.

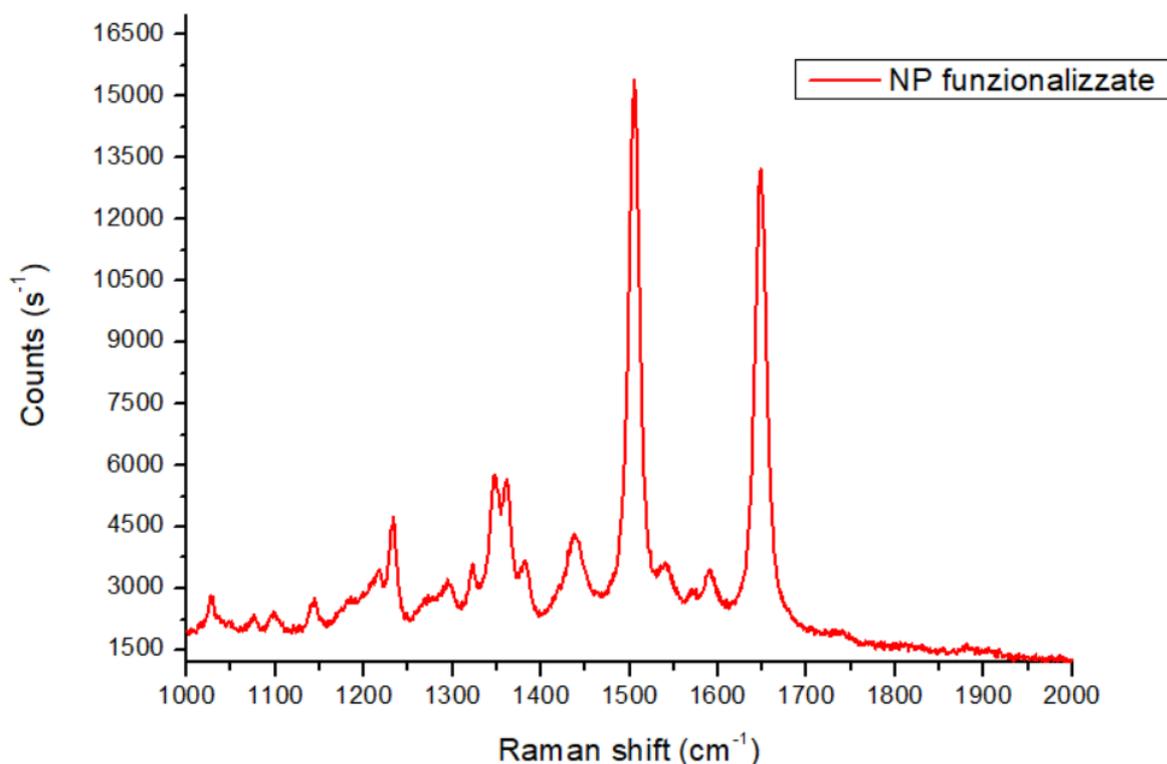


Figura 17. Spettro SERS delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate con il Texas Red.

#### 1.4 Spettroscopia di fluorescenza

Il metodo usuale per la rivelazione di proteine è quello di utilizzare la fluorescenza. Come sopra si è detto in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati segnali SERS, ma per avere una prova indipendente della presenza di una proteina negli spots stampati, è stata utilizzata anche la tecnica più tradizionale che è quella dei segnali fluorescenti.

L'interazione radiazione-materia provoca l'eccitazione della materia quando gli stati energetici di quest'ultima entrano in risonanza con la radiazione. L'eccitazione può essere descritta come una transizione da una distribuzione elettronica di stato fondamentale ad una

in cui gli elettroni del materiale occupano degli stati ad energia superiore. Il rilassamento degli stati eccitati può avvenire con l'emissione di fotoni. Nel caso in cui questa emissione coinvolga uno stato eccitato di singoletto, si verifica il fenomeno della fluorescenza, mentre se viene coinvolto lo stato eccitato di tripletto, si parla di fosforescenza. Il tempo di vita della fluorescenza, ovvero il tempo in cui la molecola si trova nello stato eccitato, è dell'ordine dei nanosecondi mentre risulta più lungo, dell'ordine dei microsecondi, il processo della fosforescenza.<sup>16</sup> La molecola con proprietà fluorescenti prende il nome di fluoroforo.

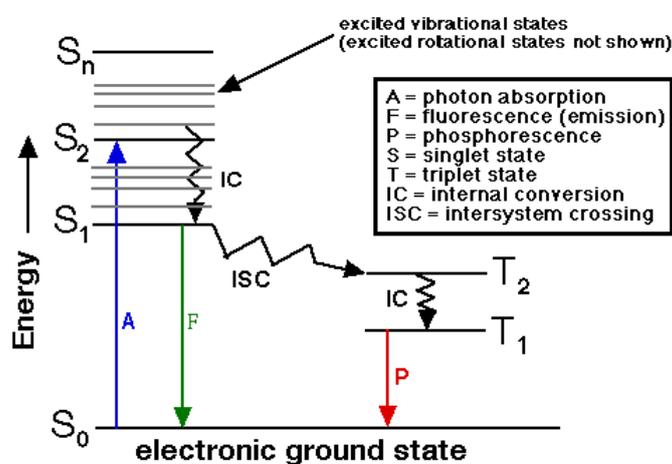


Figura 18. Diagramma di Jablonski

Il diagramma di Jablonski, riportato in figura 18, è uno schema che consente di visualizzare i fenomeni di assorbimento e di emissione.

La spettroscopia di fluorescenza può essere utilizzata come tecnica di imaging - in maniera analoga alla tecnica SERS - sfruttando, in maniera indiretta, la fluorescenza di un fluoroforo legato ad una molecola che riconosce la proteina da rivelare. A differenza della tecnica SERS, gli spettri di fluorescenza hanno larghezze di banda che sono molto più larghe e spesso, come accennato nel paragrafo precedente, i fluorofori presentano problemi di fotobleaching e fotodegradazione che rischiano di compromettere la misura. Inoltre, i sistemi biologici mostrano fenomeni di autofluorescenza che interferiscono con i segnali dei fluorofori. Un fattore a favore di questa tecnica è il fatto che molti sistemi fluorescenti sono già disponibili commercialmente. Comunque, l'uso di entrambe le tecniche per la rilevazione di biomolecole su un qualsiasi sistema si rivela molto utile per poter aver dei riscontri che siano i più accurati possibili.

Il marcatore fluorescente che verrà utilizzato in questa tesi è l'Atto 590, la cui struttura molecolare è mostrata in figura 19 a. Tale molecola ha una resa quantica molto elevata e gode di un'elevata stabilità termica e fotochimica, per tale motivo è particolarmente adatto per il rilevamento di singole molecole o per tecniche di microscopia ad alta risoluzione.<sup>17</sup> In figura 19 b viene mostrato lo spettro di assorbimento e di emissione di tale molecola: il picco di assorbimento mostra un massimo a 593 nm e quello di emissione a 622 nm.<sup>18</sup>

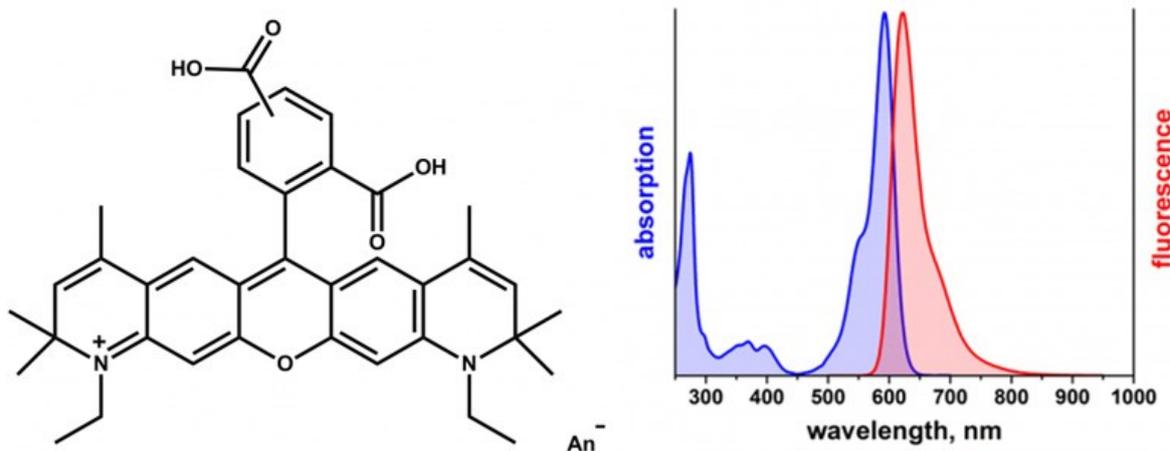


Figura 19. A sinistra viene mostrata la struttura molecolare del fluoroforo Atto 590,<sup>17</sup> a destra lo spettro di eccitazione e di emissione.<sup>18</sup>

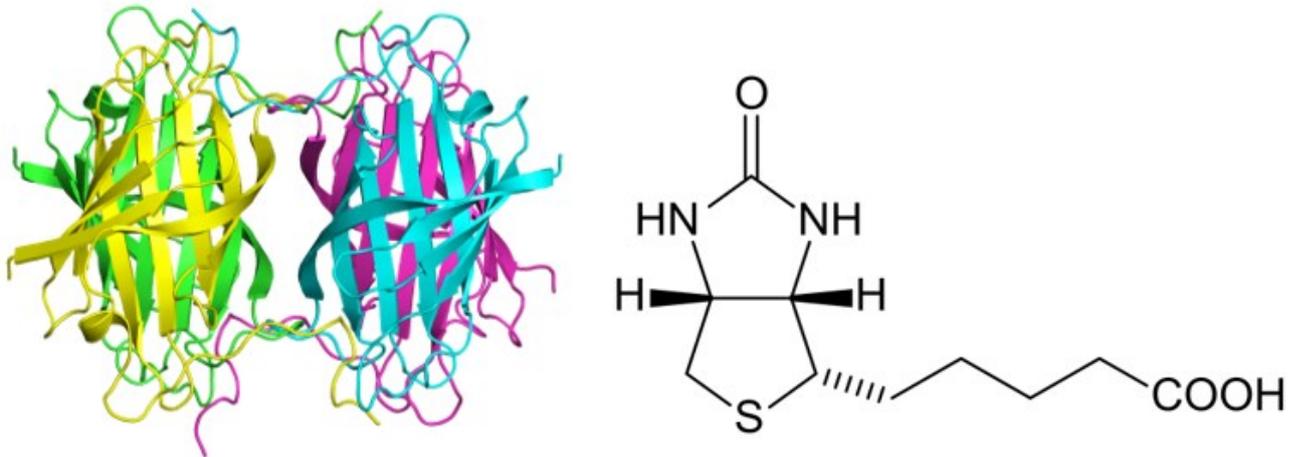
## 1.5 Interazione Avidina-Biotina

In questo lavoro di tesi le tecniche SERS e di fluorescenza serviranno a mettere in evidenza la presenza di neutravidina negli spot stampati.

L'Avidina è una glicoproteina tetramerica (66 kDa) che si trova nell'albume d'uovo di alcune specie di rettili e uccelli, la cui funzione è quella di trasportare la vitamina H (biotina) (vedi figura 20). L'interazione fra Avidina e biotina, pur non essendo di tipo covalente, è estremamente forte (la costante di dissociazione è dell'ordine di  $10^{-15}$  M) ed è estremamente rapida. Questa caratteristica rende l'Avidina estremamente interessante per le sue applicazioni sia in vitro che in vivo: in vitro nella purificazione delle proteine e in altre tecniche di biologia molecolare, in vivo nel targeting dei tumori solidi.<sup>19</sup>

L'Avidina è formata da 4 subunità in ognuna delle quali risiede il sito di Binding per la biotina, che si trova a 9 Å sotto la superficie della proteina. Una volta che la biotina è legata all'Avidina risulta completamente immersa nella proteina, lasciando esposta la catena contenente il gruppo carbossilico,<sup>20</sup> che può essere così modificato per sintetizzare dei

derivati biotinilati. Poiché ligandi di grandi dimensioni possono impedire stericamente l'interazione tra biotina e i siti di binding dell'Avidina, vengono utilizzati degli spaziatori tra il ligando e il sistema biciclico responsabile del legame.



*Figura 20. A sinistra viene presentata la struttura dell'Avidina<sup>21</sup>, a destra la struttura molecolare della Biotina.*

In questo lavoro di tesi verrà usata la neutravidina che è un'avidina deglicosilata, la quale mostra le stesse caratteristiche di binding della biotina mostrate dall'avidina, ma meno interazioni aspecifiche.

## **2. Scopo della tesi**

In questo lavoro di tesi si propone lo sviluppo di un protocollo riproducibile per poter realizzare, mediante la tecnica dell'inkjet printing, degli spots antigenici, cioè degli spot di qualche decina di micrometri con delle proteine antigeniche localizzate spazialmente. Questo scopo viene realizzato con la stampa di una proteina come la neutravidina che può essere riconosciuta da una piccola molecola come la biotina. Quest'ultima verrà utilizzata per funzionalizzare nanostrutture SERS o molecole fluorescenti che consentiranno perciò di rivelare la presenza e l'attività della neutravidina. Il lavoro di tesi mostrerà come realizzare gli spots micrometrici con la presenza di questa proteina. Gli spots saranno quindi la base per localizzare spazialmente qualsiasi altra proteina che sia funzionalizzata con la biotina. La biotilazione è molto comune tra i derivati antigenici come le proteine sovraesprese dai tumori. In ultima analisi, si riuscirà ad ottenere degli spots che serviranno a localizzare proteine antigeniche di interesse per lo studio delle espressioni antigeniche dei tumori.

Come primo passaggio verrà realizzato un inchiostro contenente neutravidina che permetta di ottenere una stampa ben definita e riproducibile, su un substrato vetroso, di una serie di spots con dimensioni micrometriche, simili a quelle di una cellula. L'inchiostro formulato conterrà nanoparticelle d'oro in una soluzione acquosa in cui verrà disciolta la proteina. È risultato necessario sviluppare formulazioni d'inchiostro con caratteristiche adatte per essere utilizzato con le cartucce della stampante 2D Dimatix. Il parametro Z (vedi Eq. n. 4), sarà importante per ottenere un inchiostro stampabile.

L'attività della neutravidina, presente negli spots stampati, è stata poi verificata utilizzando la tecnica SERRS e la spettroscopia di fluorescenza con dei vettori funzionalizzati con biotina. Verranno preparate delle nanostrutture SERS basate su nanoparticelle d'oro in cui si utilizzerà come SERS reporter la molecola del Texas Red. Le nanostrutture verranno funzionalizzate con un peptide biotilato (MB01) in grado di legarsi in maniera efficiente con la neutravidina stampata. Sfruttando il funzionamento di un protocollo simile all'ELISA verranno ottimizzati protocolli di incubazione e lavaggio, così da poter rivelare la presenza della neutravidina (vedi figura 21).

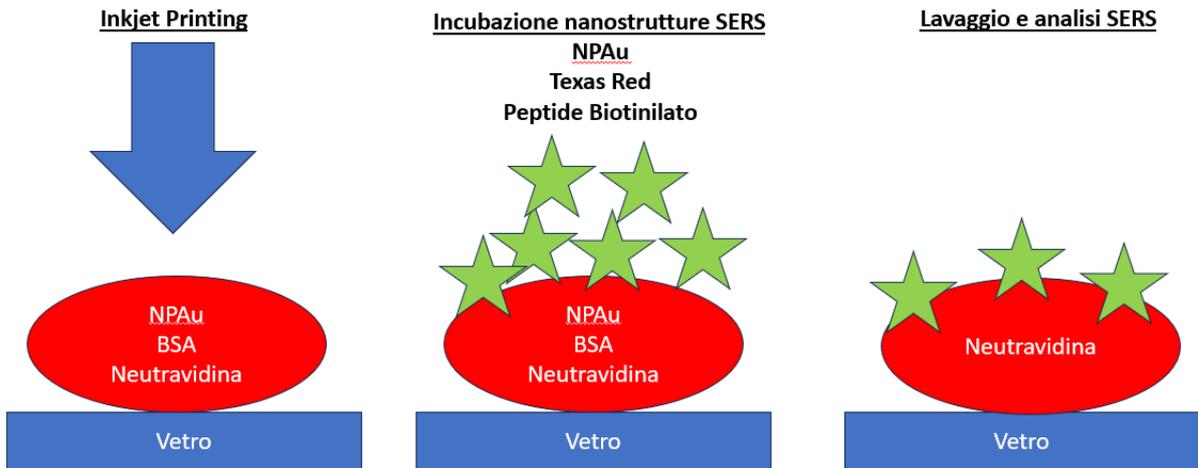


Figura 21. Rappresentazione grafica dei procedimenti di stampa e caratterizzazione SERS basata sul funzionamento del test ELISA

Una verifica parallela a quella ottenuta con le nanostrutture SERS sarà ottenuta mediante l'incubazione degli spots contenenti la neutravidina con una soluzione di un fluoroforo biotinilato, in particolare l'Atto biotina 590. Utilizzando il protocollo di incubazione e lavaggio definito con le strutture SERS sarà verificata la presenza della neutravidina mediante misure di fluorescenza. (vedi figura 22).

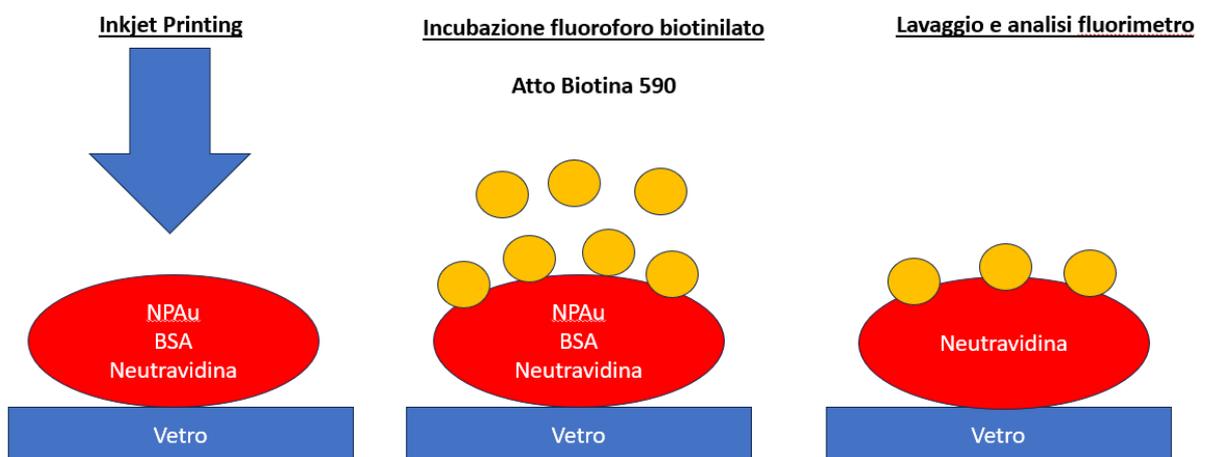


Figura 22 . Rappresentazione grafica dei procedimenti di stampa e caratterizzazione di fluorescenza basata sul funzionamento del test ELISA

I risultati mostreranno come gli spots creati potranno essere utilizzati per localizzare antigeni biotinilati come la proteina PD-L1 che consentirà nel prossimo futuro di verificare l'attività di targeting di nanostrutture realizzate nel laboratorio ospitante verso questa proteina, importante per il sistema immunitario

### **3. Risultati e discussione**

#### **3.1. Processo di Stampa**

##### **3.1.1 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro**

Per sintetizzare le nanoparticelle d'oro da utilizzare per la formulazione dell'inchiostro è stata utilizzata la tecnica top-down dell'ablazione laser in soluzione (LASiS-Laser Ablation Synthesis in Solution). Tale tecnica è stata scelta per la sua semplicità di operazione e per la possibilità di ottenere soluzioni colloidali di NP di metalli nobili in acqua o solventi organici, senza la necessità di utilizzare stabilizzanti.<sup>22</sup> Nello specifico, un raggio laser viene focalizzato su un target d'oro immerso in una soluzione di sodio cloruro micromolare; nel momento in cui il laser interagisce con il target d'oro, l'energia dei fotoni viene assorbita generando un plasma localizzato. Quest'ultimo sarà responsabile della formazione delle nanoparticelle d'oro (vedi figura 23). Le nanoparticelle così sintetizzate risultano stabili senza agenti stabilizzanti, grazie ad una carica negativa superficiale che ne evita l'aggregazione. In questo lavoro, è stato utilizzato un laser Nd:YAG a 1064 nm in grado di generare impulsi di 9 ns con una frequenza di ripetizione di 10 Hz e una fluenza di 10 J cm<sup>2</sup>. Gestire la potenza del laser (variando il tempo tra l'accensione delle flash lamps e il tempo di Q-switch in cui si apre la cavità del laser) e la superficie di impatto sul target d'oro (variando il fuoco del fascio) permette di aumentare l'efficienza del processo, così da ottenere particelle ablate in minor tempo, senza modificare eccessivamente le condizioni sperimentali.

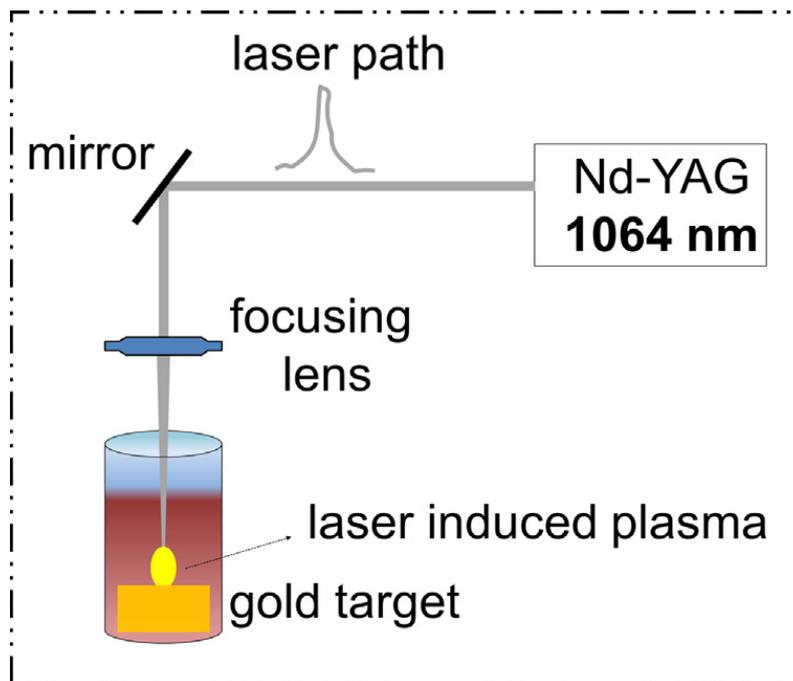


Figura 23. Rappresentazione schematica della tecnica LASIS di nanoparticelle d'oro.<sup>22</sup>

Le nanoparticelle di oro risultano avere dimensioni medie di 25 nm e una carica superficiale che genera un potenziale  $\zeta$  di qualche decina di mV: ciò rende le particelle stabili in soluzione per lungo tempo. La concentrazione di particelle d'oro nelle soluzioni è dell'ordine del nanomolare.

Per ottenere una formulazione ottimale dell'inchiostro – il quale necessita di un'alta concentrazione di particelle, da dieci a cento nanomolare – è necessario che le nanoparticelle non siano aggregate. Per tale motivo, durante il processo di ablazione lo stato di aggregazione viene monitorato attraverso lo spettro di estinzione (assorbimento più scattering) compreso tra i 500 e 700 nm. Infatti, a 520 nm si trova il picco dovuto all'eccitazione del plasmon dell'oro causato dall'oscillazione dipolare. Se è presente solo questo segnale, le nanoparticelle sono di piccole dimensioni (taglia inferiore a 40-50 nm di diametro) e non sono aggregate. L'estinzione a lunghezze d'onda maggiori e una banda più larga suggeriscono, invece, la formazione di aggregati, essendo generati da multipoli dovuti agli accoppiamenti tra i plasmoni superficiali delle particelle presenti nell'aggregato. In figura 24 si mettono a confronto due spettri di estinzione di nanoparticelle - aggregate e non aggregate.

È possibile misurare la concentrazione delle particelle in soluzione ottenendo il fit dello spettro di estinzione mediante il programma MATLAB FitSpettri, elaborato nel laboratorio ospitante. Tale programma si basa su simulazioni BEM (Boundary Elements Method:

calcolo ad elementi finiti dell'interazione tra radiazione elettromagnetica e nanoparticelle, considerando in particolare elementi della superficie delle nanoparticelle), che permettono di monitorare anche lo stato di aggregazione delle nanoparticelle d'oro. In figura 25 vengono riportate le indicazioni che si possono ottenere mediante tale software sullo stato di aggregazione e la concentrazione di nanoparticelle.

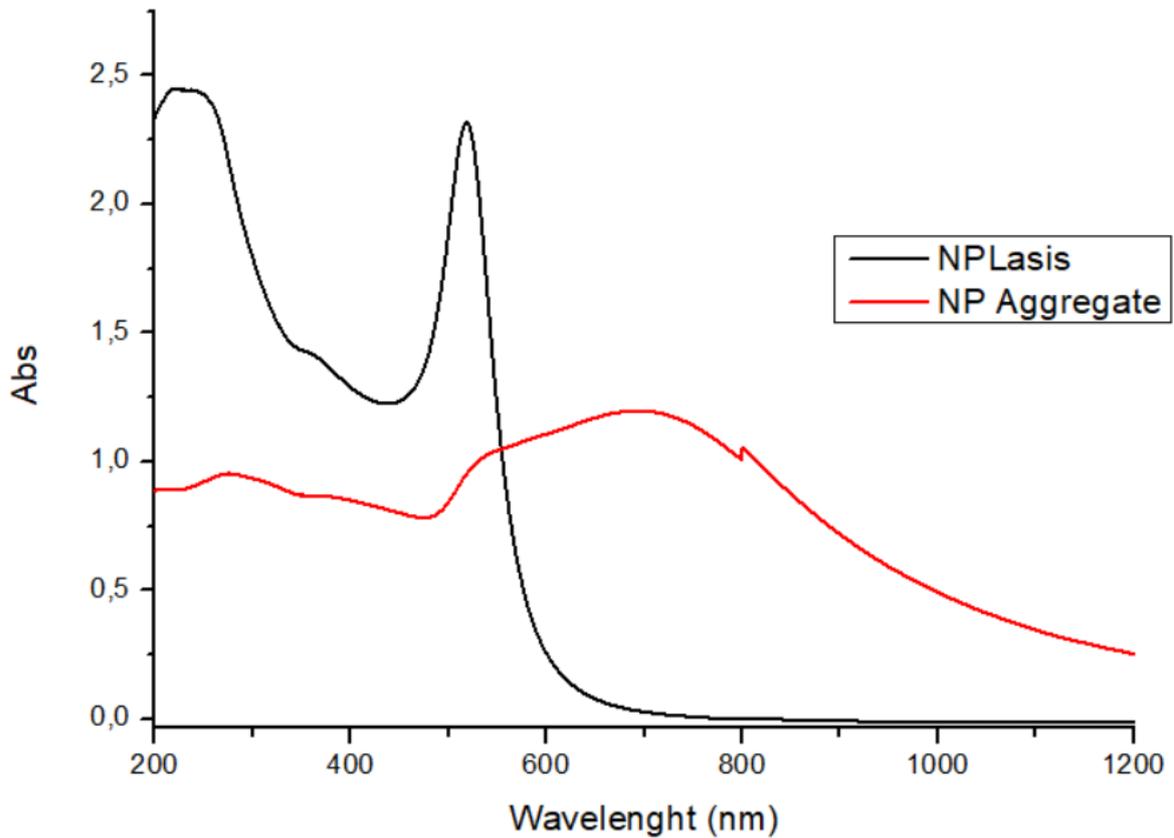


Figura 24. Confronto degli spettri di estinzioni di una soluzione contenente nanoparticelle d'oro aggregate (rosso) e una contenente nanoparticelle d'oro non aggregate (nero)

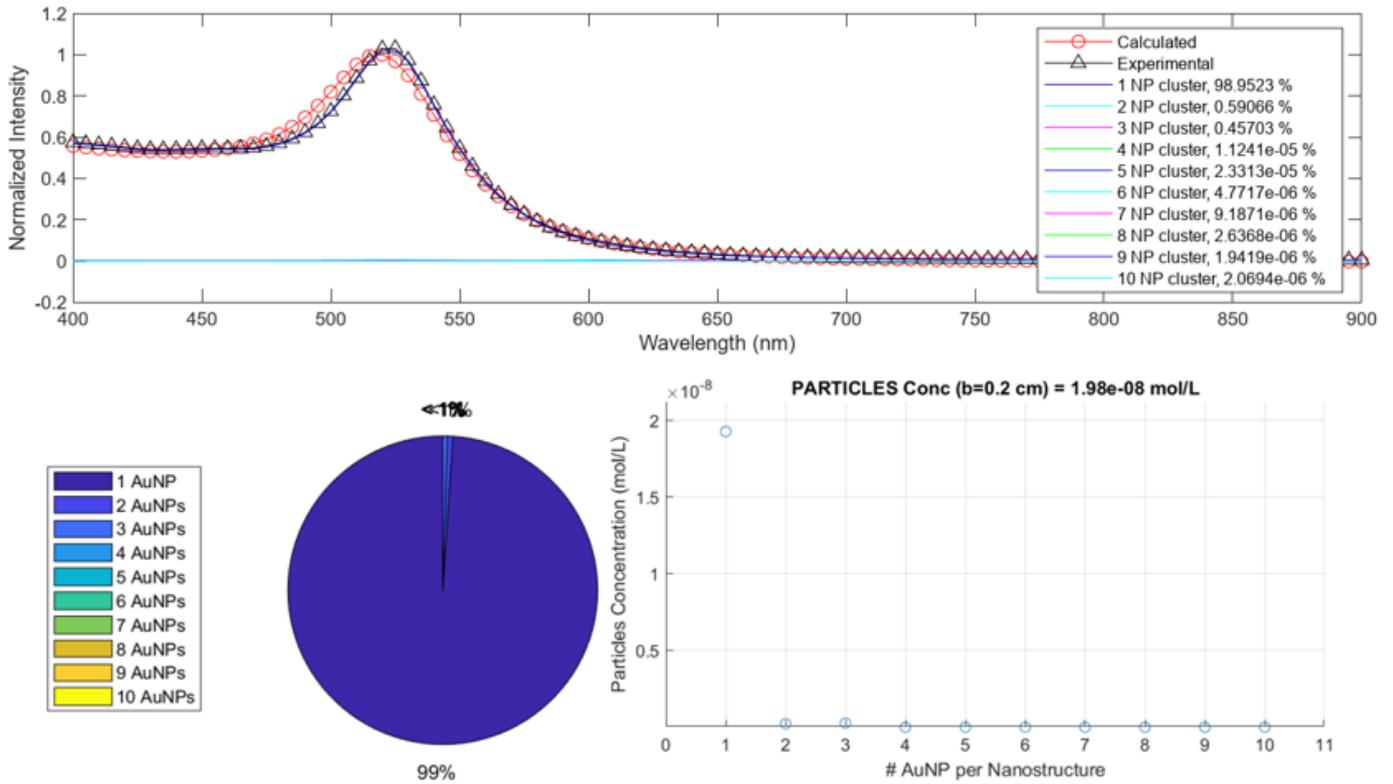


Figura 25. Informazioni ottenute mediante il programma FitSpettri MATLAB. In alto viene mostrato lo spettro di assorbimento delle NPLasis e l'elaborazione del fit. In basso a sinistra viene riportato un grafico a torta che riporta la percentuale di nanostrutture aggregate presenti in soluzione. In basso a destra viene espressa la concentrazione di NP in mol/L

Per monitorare la concentrazione delle nanoparticelle in soluzione, dopo averla determinata una prima volta con il fitting della soluzione ottenuta per ablazione, si può registrare l'estinzione a 400 nm, che, trovandosi nella zona delle transizioni interbanda e non essendo perciò influenzata dalla risonanza plasmonica e dalla presenza di aggregati permette di avere un dato proporzionale alla concentrazione di oro in soluzione.

### 3.1.2 Formulazione e caratterizzazione dell'inchiostro

Una volta ottenuta una soluzione colloidale contenente NP non aggregate si è proceduto con la formulazione dell'inchiostro contenente la Neutravidina. Per mettere a punto questo procedimento è stato necessario realizzare diverse prove (vedi paragrafo 5.1), dalle quali si è potuto dedurre che ottenere una elevata concentrazione di particelle, senza causarne aggregazione, che ne avrebbe quindi impedito la stampa, era necessario utilizzare un elevato quantitativo di proteina. In particolare, si è trovato che il quantitativo minimo di proteina per non avere aggregazione era di 2 mg di proteina per ogni mL di soluzione colloidale. Infatti, i gruppi carbossilici e amminici presenti sulla proteina consentono di ottenere un legame debole con le nanoparticelle, e una concentrazione elevata della proteina è necessaria per la loro stabilizzazione quando la soluzione colloidale viene concentrata (vedi di seguito). Poiché il costo della Neutravidina è piuttosto elevato, si è deciso di miscelare assieme ad essa la BSA (bovin serum albumine), una proteina che ha un peso atomico molto simile a quello della Neutravidina (66 kDa per la BSA, 60 kDa per la Neutravidina). In figura 26, si vede come l'aggiunta delle due proteine alla soluzione colloidale (per ogni mL di soluzione colloidale sono stati disciolti 1,5 mg di BSA e 0,5 mg di neutravidina) non crei un'aggregazione delle particelle nell'inchiostro quando queste vengono concentrate, visto che i due spettri sono sovrapponibili.

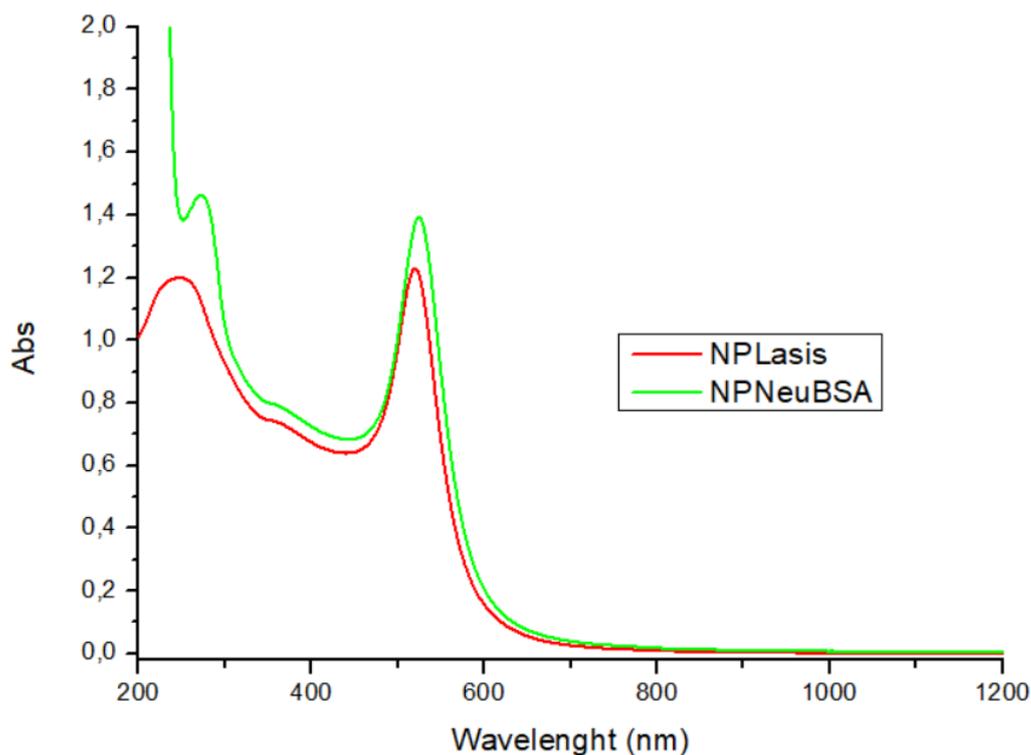


Figura 26. Confronto dello spettro di assorbimento della soluzione con (verde) e senza (rosso) l'aggiunta di Neutravidina e BSA. La soluzione contenente le proteine è stata diluita 10 volte per poter essere confrontata con quella iniziale.

Durante le varie prove effettuate si è constatato come un buon risultato di stampa fosse ottenibile con concentrazioni di nanoparticelle superiori a 50 nM per la cartuccia da 10 pL e 100 nM per le cartucce da 2,5 e 1 pL. La concentrazione delle particelle è stata ottenuta con la centrifugazione della soluzione. In questo modo le particelle venivano depositate sul fondo della provetta e, eliminando il surnatante, potevano essere risospese in un volume molto inferiore. Tale procedimento può in ogni caso provocare un'aggregazione delle nanostrutture, pur in presenza delle proteine e, per questo motivo, è stato effettuato un filtraggio con un filtro di cellulosa con pori da 0,44  $\mu\text{m}$ , così da eliminare eventuali aggregati di grosse dimensioni. Una volta ottenuta una concentrazione elevata si è proceduto con la formulazione effettiva dell'inchiostro, controllando la viscosità e la tensione superficiale del liquido, che, come visto nel capitolo 1.2, sono i parametri critici dell'ink che influenzano il parametro Z. Questi parametri sono stati variati con l'aggiunta all'inchiostro di Etilen Glicole (EG). Di seguito viene riportato il protocollo completo di formulazione dell'inchiostro che riporta tutti i procedimenti effettuati.

- Alla soluzione iniziale contenente NPAu, di cui si monitorano la concentrazione e lo stato di aggregazione mediante il fitting dello spettro di estinzione, si aggiungono 1,5 mg di BSA e 0,5mg di Neutravidina ogni millilitro di soluzione.
- Si centrifuga per 30 minuti a 3000 rcf e si recuperano i precipitati per aumentare la concentrazione di nanoparticelle.
- Filtraggio su filtro di cellulosa (0,44 µm) per la rimozione degli aggregati di grosse dimensioni.
- Aggiunta del quantitativo adatto di Etilen Glicole per poter ottenere un inchiostro dalla viscosità ideale per l'inkjet printing e valutazione della concentrazione di nanoparticelle ottenute all'interno dell'inchiostro mediante analisi dello spettro di estinzione a 400 nm.

Il quantitativo di EG da inserire nell'inchiostro è stato oggetto di numerose prove. L'influenza di nanoparticelle nell'inchiostro risultava essere un'incognita del comportamento dell'ink e la quantità di EG da aggiungere è stata definita verificando la qualità delle stampe ottenute nelle varie prove. Definita la quantità ottimale di EG (circa il 33% del volume finale dell'inchiostro è composto da Etilen Glicole), sono stati realizzati 1,5 mL di inchiostro, finalizzati non alla stampa, ma alla misura di viscosità, densità e tensione superficiale.

Per l'analisi della viscosità è stato utilizzato un reometro rotazionale con una geometria a cono-piatta avente il diametro pari a 40 mm e l'angolo del cono di 4 °. In figura 27 viene riportato uno schema esplicativo del funzionamento della tecnica.<sup>23</sup> Tale strumento permette la misura delle proprietà reologiche di sistemi di fluidi non newtoniani. In particolare, il campione viene posto tra due superfici, una delle quali viene messa in rotazione. In questo modo, controllando la velocità di taglio ( $v_c$ ) applicata dal rotore al campione è possibile misurare lo sforzo di taglio ( $\tau$ ). Il rapporto di queste due grandezze permette di ricavare la viscosità (eq. 8).

$$\eta = \frac{\tau}{v_c}$$

*Eq. 8*

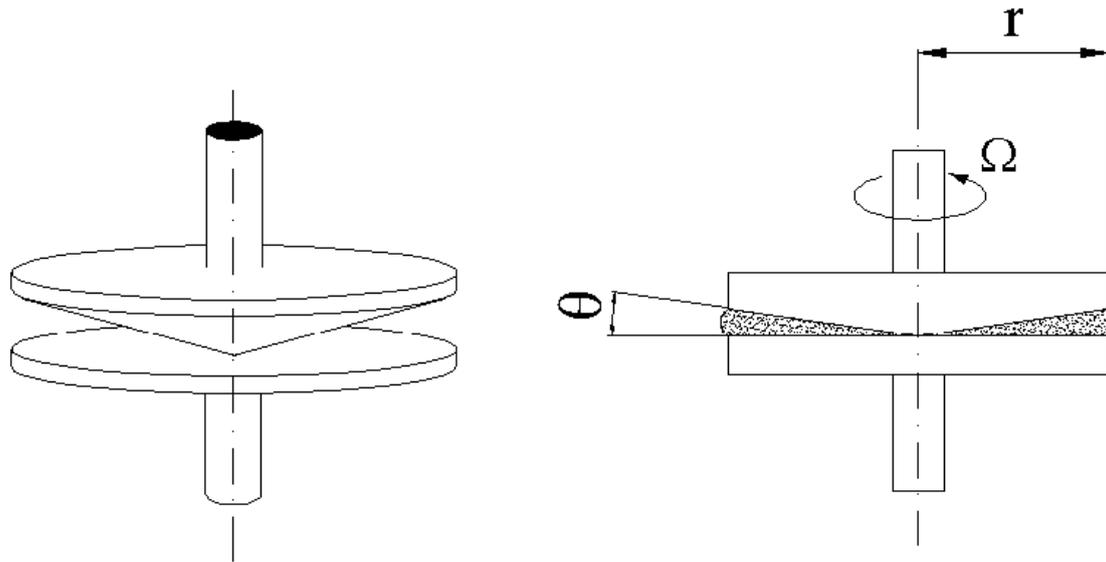


Figura 27. Schema esplicativo della configurazione di reometro rotazionale con geometria cono-piatto.<sup>23</sup>

Nello specifico, la misura è stata registrata a 25° C applicando una velocità di taglio crescente nell'intervallo tra 0.1 e 100 s<sup>-1</sup>. Il valore della viscosità è stato estrapolato facendo una media dei risultati ottenuti alle diverse velocità di taglio; nella sezione 5.3.2 vengono riportati i risultati ottenuti. Lo spessore del campione, in corrispondenza della punta del cono troncato, è stato fissato a 150 μm.

La misura di tensione superficiale è stata svolta in collaborazione con il dipartimento di Fisica dell'Università di Padova (Prof. Matteo Pierno). È stata utilizzata la tecnica del pendant drop, nella quale si misura il raggio di curvatura di una goccia d'inchiostro che si forma facendo passare il fluido per un ago: mediante tale analisi geometrica della goccia è possibile risalire alla tensione superficiale. L'apparato sperimentale di tale tecnica è dunque composto da una sorgente luminosa che illumina la goccia, un ago da cui fuoriesce il fluido e una macchina fotografica che registra l'immagine della goccia - in figura 28.a viene mostrato lo schema dell'apparato sperimentale<sup>24</sup>. In tale tecnica, è necessario che la luce diffusa dalla sorgente luminosa non provochi aberrazioni ottiche sulla superficie della goccia e che non si verificano fenomeni di distorsione da parte delle lenti della fotocamera nel momento in cui si registra l'immagine. Altro elemento fondamentale è il posizionamento dell'ago da cui fuoriesce la goccia: esso deve essere perfettamente verticale, quindi parallelo alla forza di gravità, per evitare eventuali deformazioni sulla goccia che potrebbero inficiare la qualità della misura<sup>24</sup>.

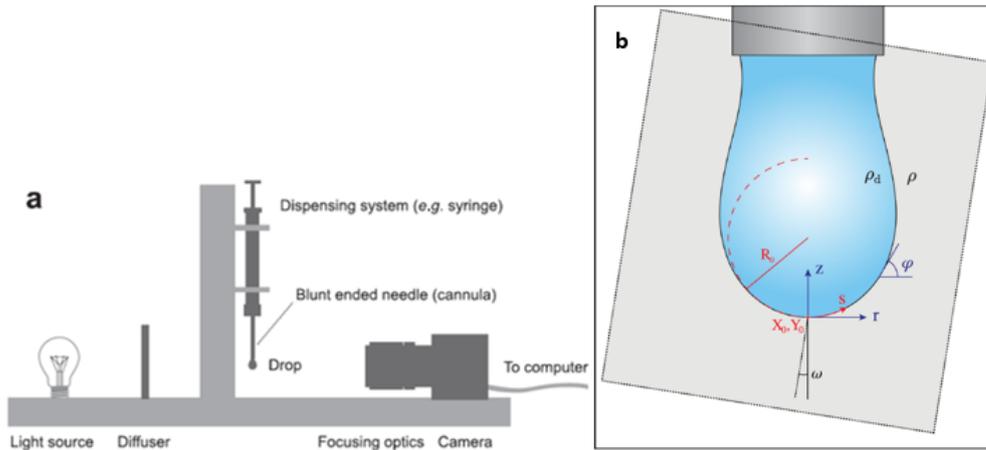


Figura 28. a) schema del setup sperimentale della misura di pendant drop; b) schema grafico dell'elaborazione del raggio di curvatura della goccia analizzata.<sup>24</sup>

Il principio teorico su cui si basa il funzionamento di tale tecnica è dato dal fatto che una goccia pendente all'equilibrio obbedisce all'equazione di Young-Laplace (eq.9), che mette in relazione la pressione di Laplace esercitata sulla superficie della goccia con il raggio di curvatura e la tensione superficiale, vedi figura 27.b.

$$\gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P \equiv \Delta P_0 - \Delta \rho g z$$

Eq. 9

- $R_1$  e  $R_2$  che indicano i principali raggi di curvatura, che in questo caso sono uguali a  $R_0$  (raggio di curvatura all'apice della goccia);
- $\Delta P \equiv P_{in} - P_{out}$  pressione di Laplace;
- Il termine  $\Delta P_0 - \Delta \rho g z$  viene usato per tenere conto della differenza di densità tra le due fasi  $\Delta \rho = \rho_d - \rho$ ;
- $\Delta P_0 =$  pressione di riferimento con  $z=0$ ;
- $\Delta \rho g z =$  pressione idrostatica.

L'equazione 9 può essere esplicitata in coordinate polari considerando l'angolo tangente alla superficie della goccia  $\phi$ . Quindi, l'equazione di Young-Laplace può essere espressa come un insieme di equazioni differenziali adimensionali in termini di lunghezza d'arco ( $s$ ) misurata dalla punta della goccia (tutte le variabili sono definite in figura 28.b).<sup>24</sup>

$$\frac{d\varphi}{d\bar{s}} = 2 - Bo\bar{z} - \frac{\sin\varphi}{\bar{r}}$$

Eq. 10

$$\frac{d\bar{r}}{d\bar{s}} = \cos\varphi$$

Eq. 11

$$\frac{d\bar{z}}{d\bar{s}} = \sin\varphi$$

Eq. 12

L'equazione può essere risolta numericamente nel caso in cui non ci troviamo di fronte ad una goccia dal profilo di forma sferica (in cui avremmo  $\gamma \rightarrow \infty$ ). Nell'equazione 9 compare il *Bond number* (Bo) che esprime il rapporto tra la forza di gravità e la forza di superficie e viene definito come:

$$Bo = \frac{\Delta\rho g R_0^2}{\gamma}$$

Eq. 13

Le condizioni al contorno associate sono:

$$\text{a } \bar{s} = 0 \rightarrow \begin{cases} \bar{r} = 0 \\ \bar{z} = 0 \\ \varphi = 0 \end{cases}$$

Bo rappresenta una grandezza molto importante perché permette di esprimere la forma della goccia attraverso un'unica quantità adimensionale. Per cui, se tale grandezza può essere determinata insieme al raggio  $R_0$  la tensione superficiale è facilmente ottenibile dall'equazione 13.

L'adattamento dell'equazione di Young-Laplace ad un'immagine sperimentale richiede un approccio computazionale. Tale procedura può essere suddivisa in due step: in primo luogo il profilo della goccia viene estratto dall'immagine analizzata, successivamente l'equazione di Young-Laplace viene risolta in modo iterativo così da avere un fit sperimentale in grado di riprodurre la forma della goccia. Questo permette di trovarne i parametri fisici che ne descrivono il profilo. In figura 29 viene mostrato uno schema esplicativo di questi passaggi.<sup>24</sup>

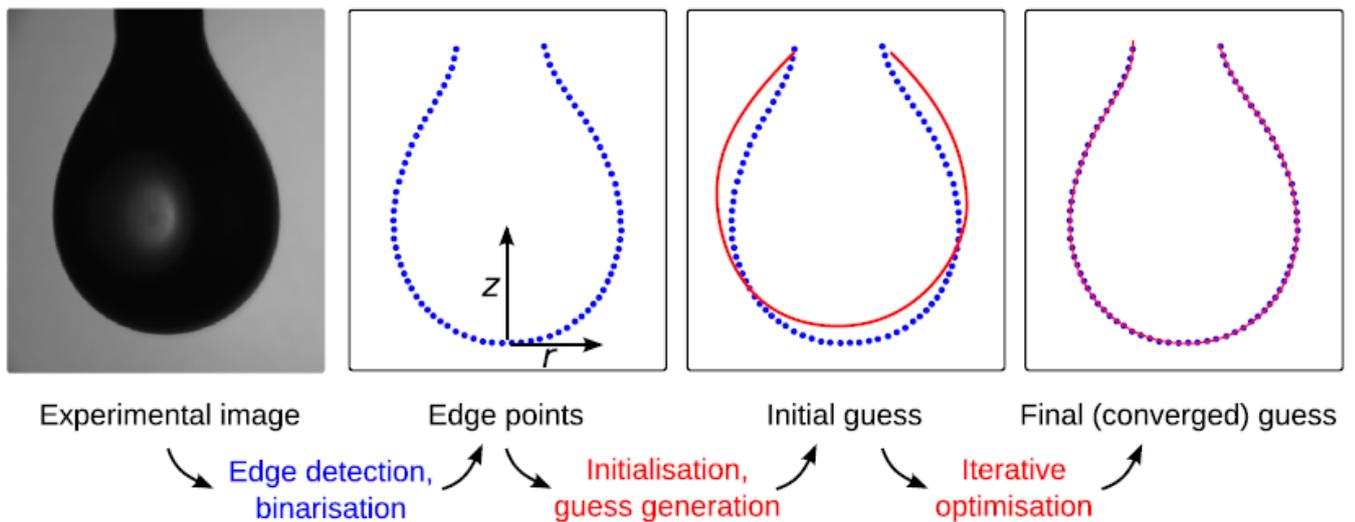
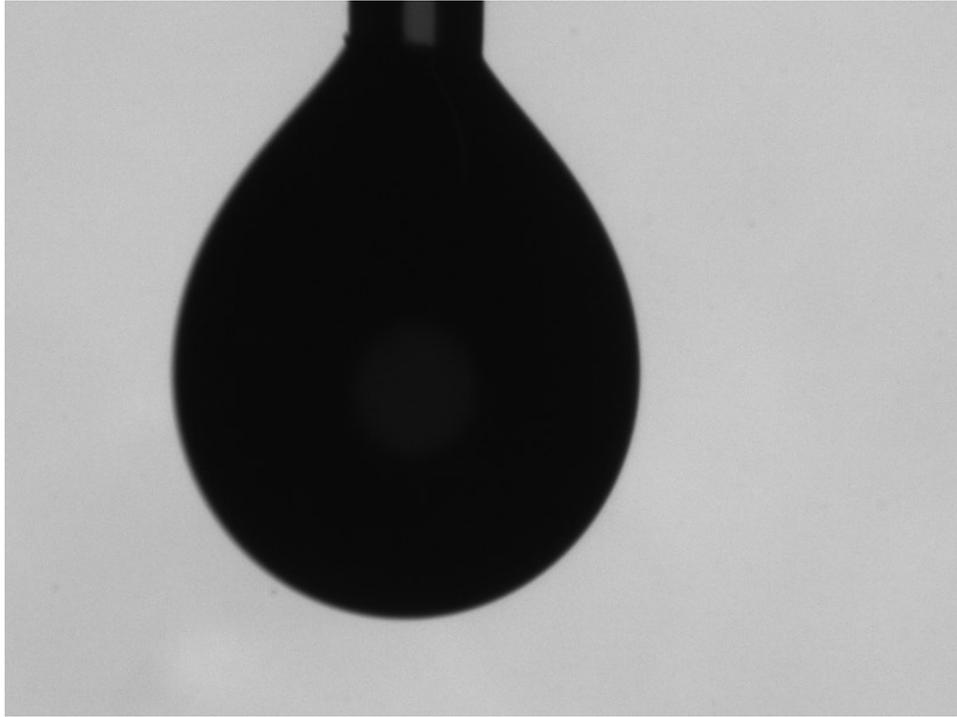


Figura 29. Schema del processo di misura della tensione superficiale mediante la tecnica pendant drop. Dall'immagine ottenuta sperimentalmente si procede con il fitting dell'equazione di Young-Laplace così da poter estrapolare  $\gamma$ .<sup>24</sup>

Il valore di tensione superficiale è stato estrapolato facendo la media del risultato ottenuto da 10 gocce d'inchiostro. Nel capitolo 5 vengono riportate le misure effettuate. In figura 30 viene riportata l'immagine di una goccia di inchiostro utilizzata per misurare la tensione superficiale mediante la tecnica di pendant drop.



*Figura 30. Immagine di una goccia d'inchiostro registrata per la misura della tensione superficiale.*

Il valore di densità è stato stimato pesando per 10 volte un volume noto di inchiostro di 100  $\mu\text{L}$ , Dal rapporto di massa su volume è stata ricavata la densità e mediando i risultati è stata stimata la densità dell'inchiostro.

Le misure hanno consentito di ottenere, per l'ink che poteva essere stampato, i seguenti valori:

- Tensione superficiale ( $\gamma$ ): **42,8  $\pm$  0,5 mN/m.**
- Viscosità dinamica ( $\eta$ ): **5,4  $\pm$  0,1 mPa s.**
- Densità ( $\rho$ ): **970 kg/m<sup>3</sup>.**

Grazie a questi dati è stato possibile stimare il parametro Z (vedi Eq. n. 4) per tutte le cartucce utilizzate in questo lavoro di tesi, tenendo conto del diametro degli ugelli ( $\alpha$ ):

- Z per la cartuccia da 10 pL ( $\alpha$ : 22  $\mu\text{m}$ ): **5,6**
- Z per la cartuccia da 2,5 pL ( $\alpha$ : 15  $\mu\text{m}$ ): **4,6**
- Z per la cartuccia da 1 pL; ( $\alpha$ : 10  $\mu\text{m}$ ): **3,7**

### 3.1.3 Stampa e waveform utilizzate

L'inchiostro realizzato consente una buona fuoriuscita dagli ugelli e una formazione omogenea delle gocce durante il processo di stampa. In figura 31 viene mostrata la fuoriuscita di una goccia di inchiostro da un ugello della cartuccia da 10 pL, si può notare l'assenza di gocce satellite e la buona forma della goccia nel momento in cui è stata completamente espulsa dall'ugello.



*Figura 31. Immagine dei vari step di fuoriuscita dell'inchiostro ricavata durante il processo di stampa.*

Di seguito, in figura 32, viene mostrata la waveform utilizzata per la stampa con la cartuccia da 10 e da 1 pL che permette di avere una fuoriuscita omogenea delle gocce d'inchiostro come quella vista in figura 31. In figura 33, invece, quella utilizzata con la cartuccia da 2,5 pL. I valori di tensione applicati non vengono riportati in questo tipo di grafici poiché tale quantità è variabile durante il processo di stampa, poiché può dipendere sia dallo stato dell'inchiostro utilizzato e sia dallo stato della cartuccia utilizzata, causato dall'intasamento degli ugelli. Generalmente, però, il picco di voltaggio raggiunto durante la stampa con la cartuccia da 10 pL ricade nell'intervallo compreso tra i 18-22 V, mentre per le cartucce da 1 e 2,5 pL ricade tra 7-10 V.

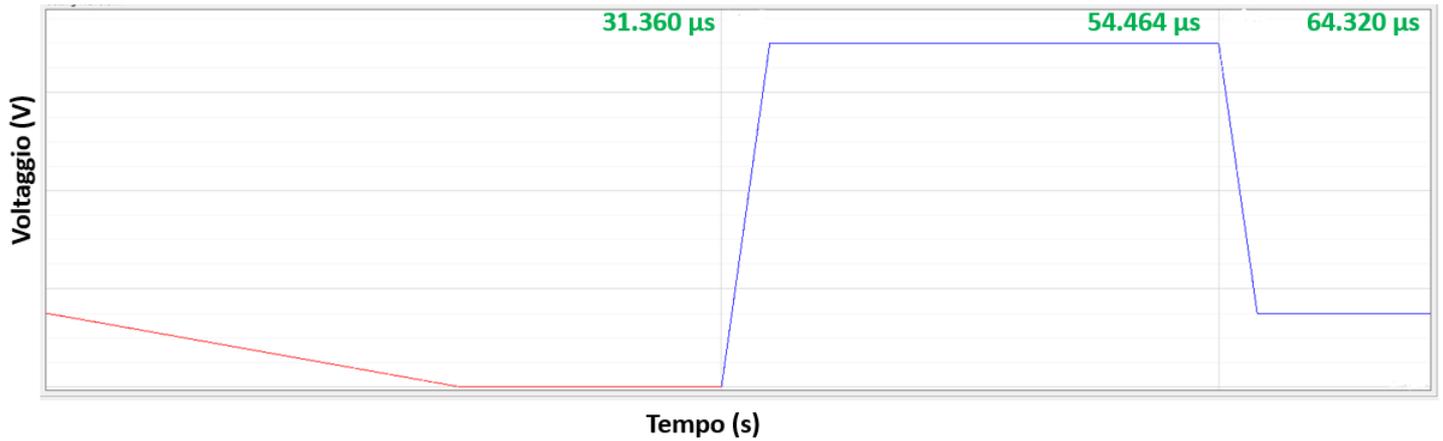


Figura 32 Waveform utilizzata per la stampa con la cartuccia da 1 e 10 pL

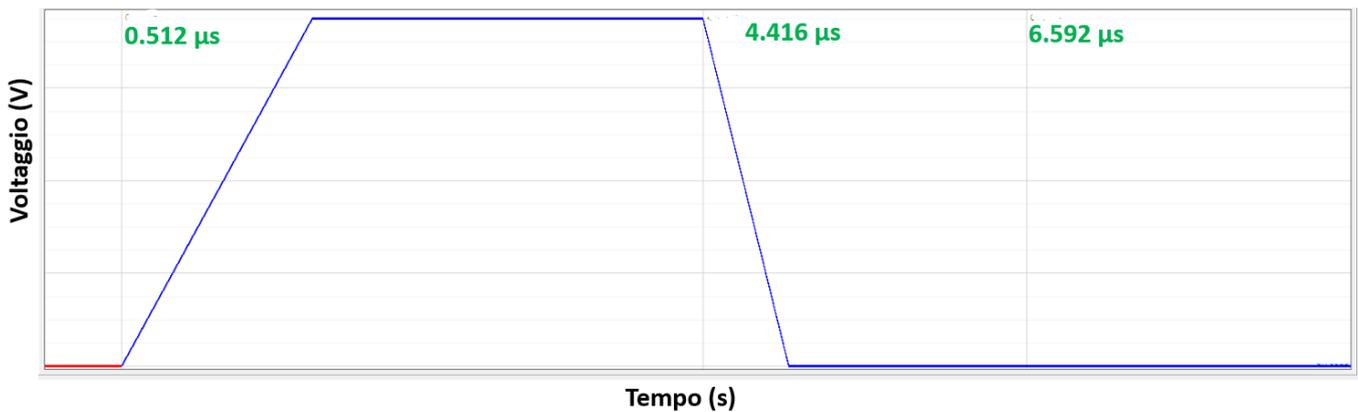
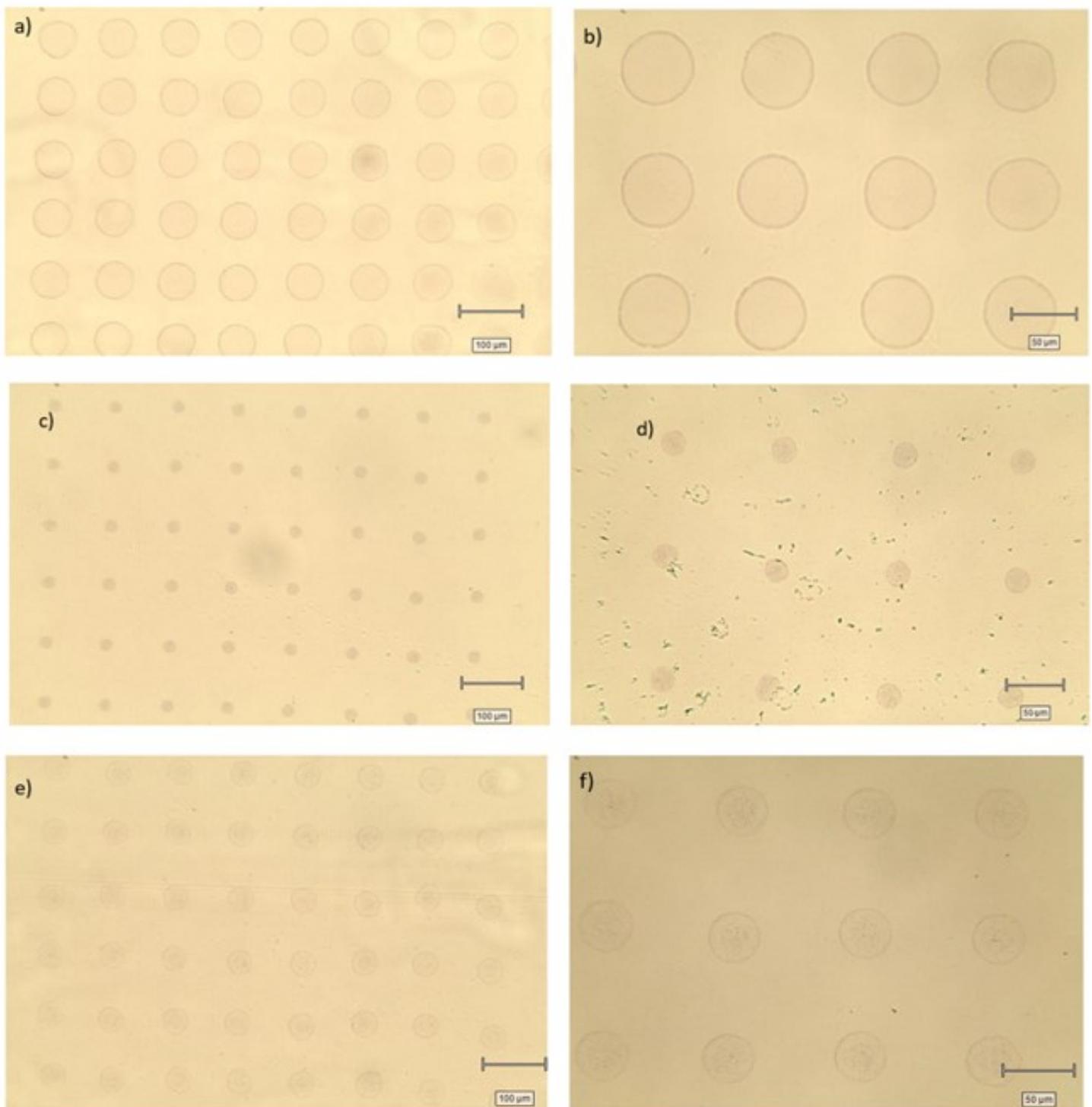


Figura 33. Waveform utilizzata per la stampa con la cartuccia da 2,5 pL.

Una volta ottenuti l'inchiostro e la waveform ottimale, si può dunque procedere con la stampa. Nel dettaglio, il pattern di stampa è formato da una matrice di spots 10x10, ognuno dei quali deve essere di dimensioni simili alle dimensioni di una cellula, così da poter costruire degli antigen spots in grado di simulare il più possibile la risposta cellulare (10-20μm). Di seguito, in figura 34, vengono mostrate le immagini, ottenute mediante microscopio ottico, delle stampe ottenute con le varie cartucce.



*Figura 34. a) Immagine ottenuta con obiettivo 10x della stampa effettuata con la cartuccia da 10 pL; b) immagine ottenuta con obiettivo 20x. c) Immagine ottenuta con obiettivo 10x della stampa effettuata con la cartuccia da 2,5 pL; d) immagine ottenuta con obiettivo 20x. e) Immagine ottenuta con obiettivo 10x della stampa effettuata con la cartuccia da 1 pL; f) immagine ottenuta con obiettivo 20x*

L'inchiostro formulato permette di ottenere una stampa ben definita di tutta la matrice 10x10 di spots indipendentemente dalle dimensioni degli ugelli delle cartucce utilizzate. Le dimensioni degli spots ottenuti con la cartuccia da 10 pL sono di circa 50  $\mu\text{m}$ , mentre quelle ottenute con le cartucce di 2,5 pL e 1 pL sono di circa 10  $\mu\text{m}$ . La similitudine tra il diametro degli spots stampati con la cartuccia da 2,5 e 1 pL suggeriscono che sia possibile un'ulteriore ottimizzazione della waveform utilizzata nel processo di stampa, specialmente per quella riguardante la cartuccia da 2,5 pL. Attraverso ulteriori prove, infatti, presumibilmente sarebbe possibile riuscire a stampare spots di dimensioni un po' più grandi, dell'ordine dei 15-20  $\mu\text{m}$ . Questo potrebbe essere fatto andando a variare nello specifico la prima fase della waveform, quella che riguarda il riempimento della cartuccia, così da permettere la fuoriuscita di gocce con un maggior volume.

La maggiore dimensioni degli ugelli contenuti nella cartuccia da 10 pL permette di depositare più inchiostro sul substrato e ciò si traduce nel fatto che gli spots ottenuti con tale cartuccia risultano essere i più definiti. Tenendo conto del quantitativo di neutravidina utilizzato nella formulazione d'inchiostro e il volume dello stesso che viene depositato dagli ugelli, è possibile stimare il numero di moli della proteina presente su ogni spot, tale risultato indica la presenza di  $10^{-18}$  moli di neutravidina per spot.

Se si tiene conto del fatto che l'utilizzo della cartuccia da 2,5 pL è ancora ottimizzabile si evince che gli spots ottenuti con la cartuccia da 1 pL risultano quelli che si avvicinano maggiormente alle dimensioni desiderate, in quanto mostrano un diametro simile a quello di una cellula. Si è stimato che ogni spot ottenuto con tale cartuccia presenta  $10^{-19}$  moli di neutravidina.

In tutte le stampe effettuate vi si possono notare dei difetti dovuti alla presenza del *coffee ring effect* sugli spots, ovvero la presenza maggiore di inchiostro ai bordi della stampa; tale difetto non comporta nessun problema per gli scopi preposti in questo lavoro di tesi.

## 3.2. Riconoscimento della Neutravidina con tecnica SERS sugli spots stampati

### 3.2.1. Sintesi di NPAu funzionalizzate con peptide biotinilato e Texas Red

Per verificare la presenza e il riconoscimento di Neutravidina sugli spots stampati sono state utilizzate delle nanoparticelle di oro funzionalizzate con il TR come SERS reporter e un peptide biotinilato (MB01) in modo che i segnali SERS possano essere utilizzati per verificare l'interazione tra la biotina e la Neutravidina. Il peptide è servito per legare la biotina alle particelle di oro e come spaziatore per evitare un impedimento sterico tra il sistema biciclico della biotina e i siti di binding della Neutravidina. Il peptide sintetizzato presenta la seguente sequenza: Biotina-O<sub>2</sub>oc-Gly-Ser-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, (O<sub>2</sub>oc rappresenta un oligoetilene). Una estremità del peptide è caratterizzata dalla presenza dell'amminoacido cisteina (Cys), la cui struttura è rappresentata in figura 35. Questo amminoacido, tramite il gruppo -SH della catena laterale, è responsabile del legame covalente tra le nanoparticelle d'oro e il peptide.

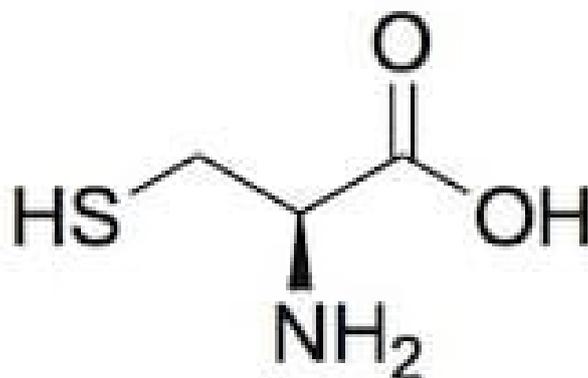


Figura 35. Struttura chimica della cisteina.

Le nanoparticelle di oro utilizzate in questa sintesi sono state sintetizzate in maniera analoga a quelle utilizzate per formulare l'inchiostro. La concentrazione di nanoparticelle in soluzione (misurata anche in questo caso mediante il programma MATLAB FitSpetri) è di 19,8 nM. Anche nel procedimento di funzionalizzazione risulta fondamentale controllare lo stato di aggregazione delle nanoparticelle, che in questo caso è necessario per ottenere dei segnali SERS intensi. In figura 36 viene mostrato il confronto tra lo spettro di assorbimento delle nanoparticelle LASiS e quello delle Nanoparticelle legate al SERS reporter. Lo spettro

delle particelle aggregate mostra, oltre al picco a 525 nm anche un altro picco a 680 nm che è indicazione dell'aggregazione delle particelle. Importante, in questo spettro è che l'estinzione a 1200 nm sia bassa poiché questo sta ad indicare che l'aggregazione è contenuta.

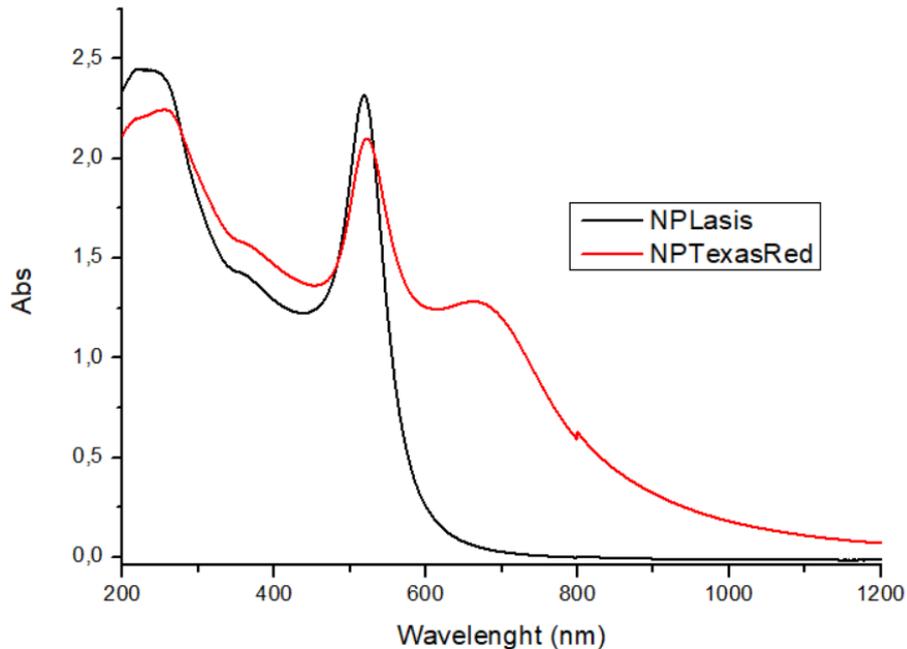


Figura 36. Confronto tra lo spettro di assorbimento delle soluzioni di Np d'oro e le Np d'oro con l'aggiunta di Texas Red

Una volta ottenute le nanoparticelle con il Texas Red si procede con una centrifugazione e il precipitato recuperato viene unito ad una soluzione contenente il peptide biotilato. Anche in questo processo è fondamentale controllare l'aggregazione delle NP monitorando lo spettro di estinzione nel NIR. In figura 37 si vede come la funzionalizzazione con il peptide biotilato porta ad una ulteriore aggregazione che però rimane sempre limitata, vista l'estinzione a 1200 nm rispetto a quella del massimo dello spettro, ora a circa 700 nm. Alla soluzione viene quindi aggiunta della BSA e una ulteriore centrifugazione a bassi giri permette di eliminare eventuali aggregati di grandi dimensioni. In figura 37 viene mostrato anche lo spettro di estinzione delle Nanoparticelle dopo la centrifugazione in cui si può notare una parziale diminuzione dell'estinzione a grandi lunghezze d'onda che deriva dall'eliminazione di aggregati di grandi dimensioni. Tenendo conto del valore di assorbimento registrato a 400 nm (che è proporzionale alla concentrazione delle particelle ricavata mediante il programma FitSpettri di MATLAB per le particelle ablate) e quello

registrato dopo la centrifugazione effettuata a bassi giri, è possibile ricavare la concentrazione delle nanoparticelle presenti nella soluzione alla fine del processo di funzionalizzazione effettuando una proporzione:

$$Abs_{LASIS} : C_{LASIS} = Abs_{NPfunz} : C_{NPfunz}$$

$$C_{NPfunz} = \frac{C_{LASIS} * Abs_{NPfunz}}{Abs_{LASIS}} = \frac{19,8 \text{ nM} * 0,73}{1,25} = 11,5 \text{ nM}$$

Dalla concentrazione è possibile ricavare il numero di moli (n) di nanoparticelle presenti in soluzione considerandone il volume (1mL):

$$n = C * V = 11,5 \text{ pmol}$$

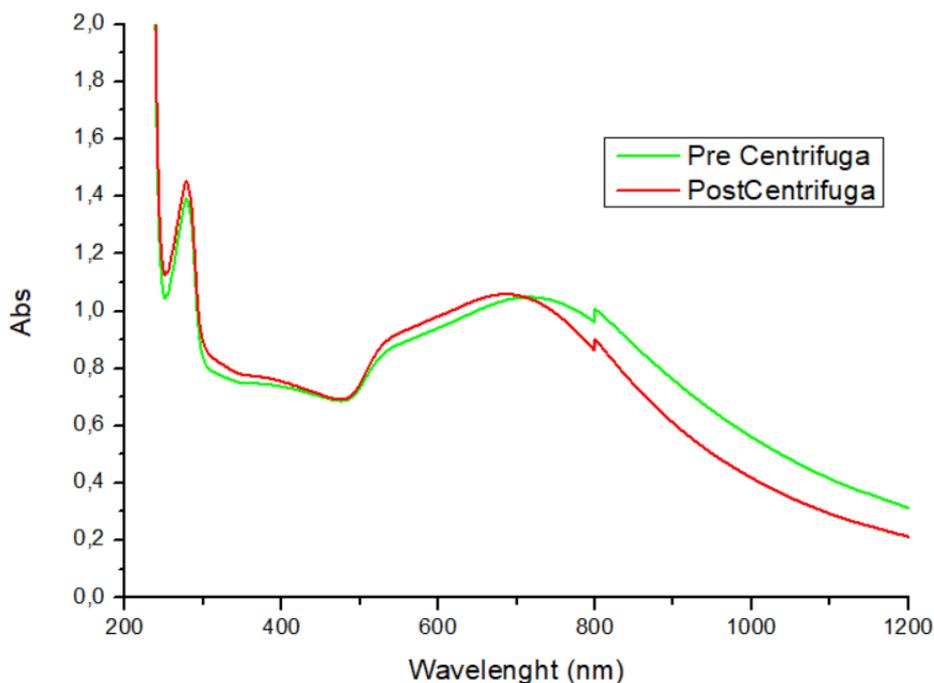


Figura 37. Confronto tra lo spettro di assorbimento della soluzione pre e post centrifuga utile per monitorare lo stato dell'aggregazione delle nanoparticelle.

Una volta ottenuta la soluzione di nanoparticelle funzionalizzate è stata verificata la presenza dei segnali SERS tramite uno spettro Raman. In figura 35 viene mostrato lo spettro Raman della soluzione ottenuto eccitando il campione a 633 nm, in cui si riscontra la presenza dei segnali SERS del Texas Red con la presenza dei picchi con Raman Shift a 1505  $\text{cm}^{-1}$  e 1650  $\text{cm}^{-1}$ .

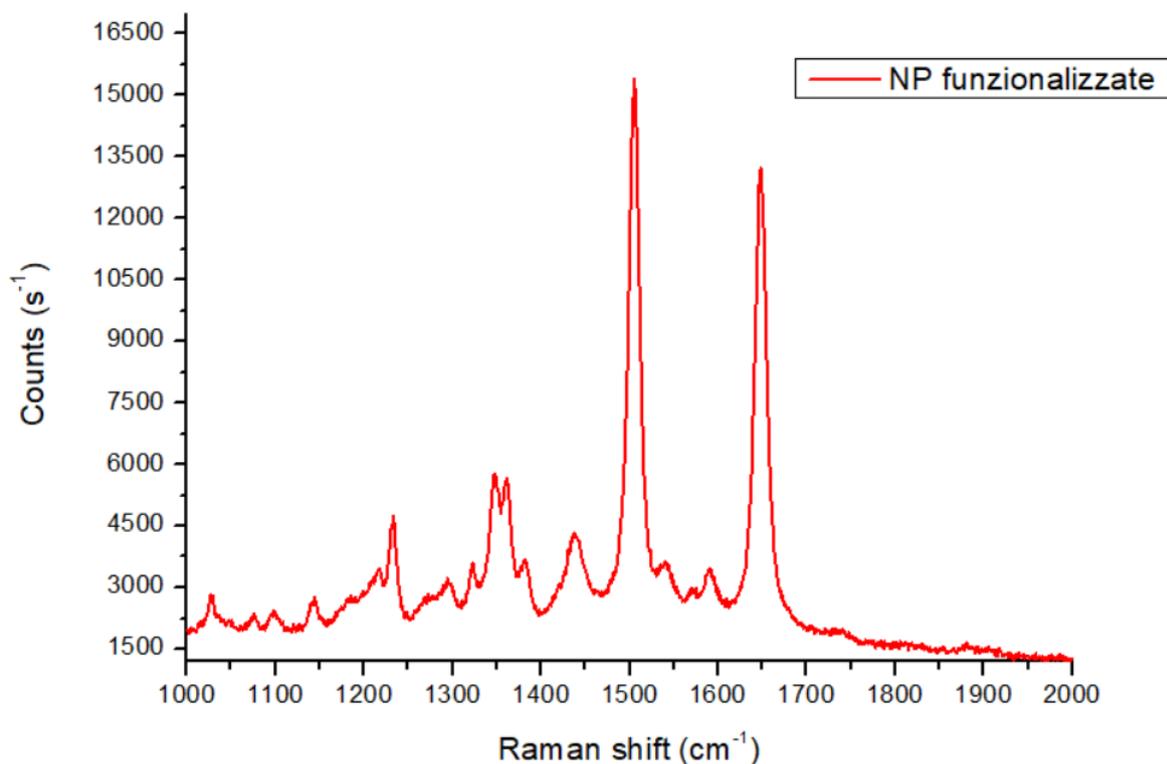


Figura 38. Spettro Raman della soluzione di Nanoparticelle d'oro funzionalizzate con peptide biotinilato e Texas Red.

Di seguito viene riportato il protocollo completo di funzionalizzazione delle nanoparticelle d'oro con il peptide biotinilato e Texas Red:

- A 1 mL di soluzione contenente NPAu vengono aggiunti 10  $\mu$ L di una soluzione di Texas Red (34  $\mu$ M in metanolo); viene controllato lo stato di aggregazione delle particelle mediante analisi dello spettro di estinzione.
- Centrifugazione a 500 rcf per 10 minuti e recupero dei precipitati.
- Aggiunta di 1 mL della soluzione contenente il peptide biotinilato e incubazione per 25 minuti.
- Centrifugazione a 500 rcf per 10 minuti e recupero dei precipitati.
- Aggiunta di 1 mL di acqua deareata.
- Aggiunta di 6 mg di BSA.
- Centrifugazione a 100 rcf per 3 minuti e verifica della presenza dei segnali SERS del Texas Red con uno spettro Raman.

### 3.2.2 Stima della concentrazione di peptide nella soluzione delle Np funzionalizzate

Il test di Ellman è un test spettrofotometrico per la determinazione della concentrazione di molecole tiolate in soluzione, ed è stato utilizzato per stimare il numero di moli di peptide biotinilato che ha funzionalizzato le nanoparticelle. Il test è stato effettuato sulla soluzione utilizzata per funzionalizzare le nanoparticelle e sul surnatante recuperato dalla centrifugazione effettuata dopo l'incubazione. La differenza tra le due concentrazioni determina la quantità di peptide biotinilato che si è legato alle nanoparticelle.

Il reattivo di Ellman è l'acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DNTB) e in figura 39 viene mostrata la reazione per la determinazione di tioli. Questa avviene con la rottura del legame disolfuro del reattivo di Ellman per lo scambio con un tiolo libero R-SH per formare due residui, l'acido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB), che presenta un elevato coefficiente di assorbimento molare ( $\epsilon$ ) a 412 nm (valore teorico di  $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e il disolfuro.

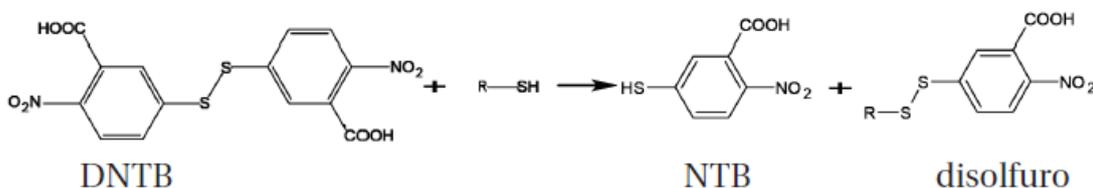


Figura 39. Schema di reazione del reattivo di Ellman con una molecola tiolata.

Osservando la variazione dello spettro di assorbimento a 412 nm che si registra prima e dopo la reazione con i tioli da determinare, si risale alla concentrazione dei tioli mediante lo spettro dell'NTB. È importante sottolineare che il test di Ellman non permette di distinguere la natura di diverse molecole tiolate, ma fornisce solamente la concentrazione totale dei tioli liberi in soluzione. Se i tioli in soluzione hanno dato luogo alla formazione di disolfuri, questi non potranno essere determinati con il test di Ellman.

La procedura generale utilizzata per effettuare il test di Ellman ha previsto la preparazione di un riferimento contenente il solo reattivo di Ellman, una soluzione con una molecola tiolata di controllo (cisteina in questo caso) e il campione da titolare (il peptide biotinilato). La soluzione di riferimento serve a determinare la degradazione nel tempo del reattivo mentre la soluzione di controllo permette di avere un'indicazione su eventuali errori sperimentali confrontandone la concentrazione teorica con quella sperimentale. Nel

paragrafo 5.4.1 vengono riportati i test di Ellman effettuati sulla soluzione di controllo e lo spettro del reattivo utilizzato. In questo paragrafo vengono riportati solo i risultati ottenuti sulla soluzione di peptide biotinilato utilizzata per la funzionalizzazione delle nanoparticelle.

Per prima cosa, quindi, è stato utilizzato il test di Ellman per poter stimare il numero di moli di peptide presente nella soluzione usata per funzionalizzare le nanoparticelle. Per fare ciò è stata preparata una soluzione contenente:

- 250  $\mu\text{L}$  di soluzione prelevati dalla soluzione di peptide usata per funzionalizzare le NP.
- 20  $\mu\text{L}$  di reattivo DTNB disciolti in tampone fosfato.
- 230  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato.

Successivamente è stato effettuato il test di Ellman sulla soluzione di surnatante ricavata a seguito della centrifugazione. Si è preparata la seguente soluzione:

- 250  $\mu\text{L}$  di surnatante.
- 20  $\mu\text{L}$  di reattivo DTNB in tampone fosfato.
- 230  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato.

In figura 40 viene riportato lo spettro di assorbimento dei test di Ellman. Si può osservare la presenza del picco di assorbimento a 324 nm riconducibile al reattivo DNTB. La presenza di tale massimo suggerisce una buona riuscita del test, poiché una mancata presenza avrebbe significato che il quantitativo di reattivo utilizzato era insufficiente.

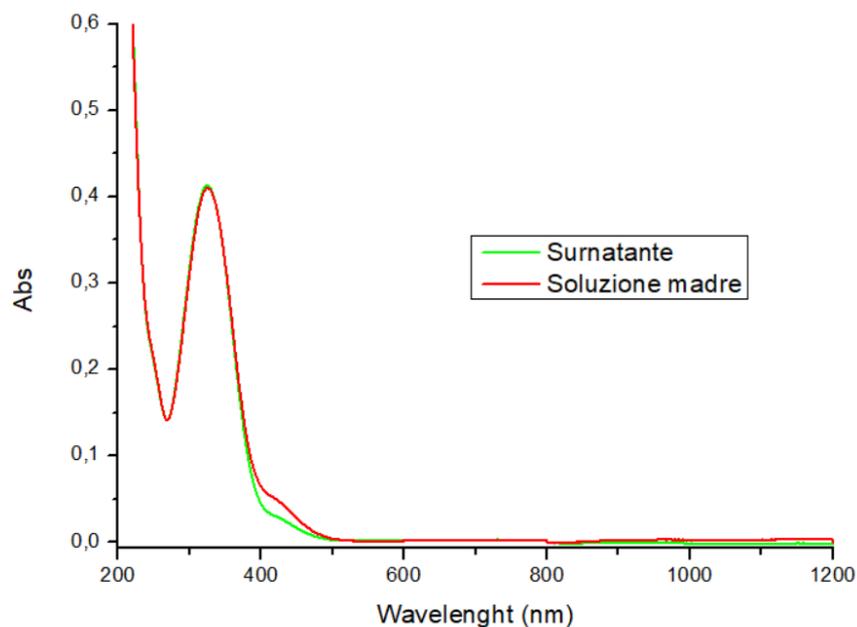


Figura 40. Spettro della soluzione madre utilizzato per l'incubazione delle nanoparticelle e del surnatante recuperato dopo la centrifuga, registrati dopo aver reagito con il reattivo di Ellman.

Estrapolando i valori di assorbimento registrati a 412 nm dai due spettri (0,051 per la soluzione madre, 0,036 per il surnatante) è possibile stimare il numero di moli ( $n$ ) del peptide presente nella soluzione utilizzata per la funzionalizzazione, utilizzando la legge di Lambert-Beer (eq. 14) per cui l'assorbanza di un campione è proporzionale alla concentrazione ( $C$ ) della soluzione:

$$A = b \varepsilon C$$

Eq. 14

In cui  $b$  è uguale al cammino ottico della cuvetta utilizzata per registrare lo spettro di assorbimento, 0,2 cm in questo caso.

Per cui:

$$n_{soluzione\ madre} = C * V = \left[ 2 \left( \frac{A}{\varepsilon b} \right) \right] * V = \left[ 2 \left( \frac{0,051}{11785\ M^{-1}cm^{-1} * 0,2\ cm} \right) \right] * 1\ mL = 43,2\ nmol$$

Analogamente, è stato possibile stimare il numero di moli del peptide biotinilato presente nel surnatante:

$$n_{surnatante} = C * V = \left[ 2 \left( \frac{A}{\epsilon b} \right) \right] * V = \left[ 2 \left( \frac{0,036}{11785 M^{-1}cm^{-1} * 0,2 cm} \right) \right] * 1mL = 30,6 nmol$$

V è il volume di soluzione di peptide biotinilato utilizzata per funzionalizzare le nanoparticelle. Il valore di assorbimento molare ( $\epsilon$ ) utilizzato è stato ricavato sperimentalmente attraverso il test di Ellman effettuato sulla soluzione di controllo contenente solo cisteina, vedi paragrafo 5.4.1.

Da questi due risultati è dunque possibile stimare il numero di moli di peptide che hanno funzionalizzato le nanoparticelle:

$$\Delta n = n_{soluzione\ madre} - n_{surnatante} = 12,6 nmol$$

Si può quindi ottenere il numero di moli di peptide che ha funzionalizzato in media le nanoparticelle:

$$\frac{\Delta n}{n_{NP}} = \frac{12,6 nmol}{11,5 pmol} = 1096$$

Il valore trovato risulta essere confrontabile con quello che usualmente viene determinato per la funzionalizzazione di nanoparticelle di oro.

### 3.2.3 Analisi Raman degli spots incubati con NPAu funzionalizzate

Una volta ottenuta la soluzione contenente le nanoparticelle funzionalizzate con Texas Red e il peptide biotinilato è stato possibile verificare la presenza di Neutravidina sugli spots stampati utilizzando la tecnica SERRS. Per fare ciò si è ricorsi ad una metodologia simile a quella utilizzata per il test ELISA. E' stato necessario sviluppare un protocollo di incubazione e di lavaggio adatto per il test SERRS. Le prove effettuate per poter raggiungere un risultato adeguato sono riportate nel paragrafo 5.4.2. In particolare, si è notato che un'incubazione preliminare degli spots con la Neutravidina con una soluzione contenente BSA disciolta in acqua (1mg di BSA in 1mL di acqua) permette di evitare binding aspecifici. Anche il protocollo di lavaggio è stato oggetto di numerose prove, in particolare si sono effettuati due lavaggi: uno con un tampone (Tris 25mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%,

pH 7,2) e uno con acqua per togliere eventuali residui di sali sul vetrino. Di seguito viene riportato nel dettaglio il protocollo di incubazione e di lavaggio utilizzato.

- Incubazione preliminare con 100  $\mu$ L di una soluzione contenente BSA (1 mg in 1 mL di acqua) per 30 minuti
- Rimozione della soluzione di BSA e incubazione per 2h con 100  $\mu$ L di soluzione di nanoparticelle funzionalizzate con Texas Red e peptide biotinilato
- Lavaggio con 200  $\mu$ L di tampone (Tris 25mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,2) e lavaggio con 200  $\mu$ L di acqua.

Una volta effettuata l'incubazione si può verificare la presenza di nanoparticelle funzionalizzate sui vetrini mediante la tecnica SERRS. La presenza dei segnali SERRS indica che è avvenuta l'interazione tra biotina e neutravidina.

Con la tecnica micro-Raman, che utilizza un microscopio ottico, si sono potuti registrare i segnali SERRS in una serie di punti individuati all'interno e all'esterno gli spots. L'obiettivo utilizzato ha consentito una risoluzione di circa 10  $\mu$ m. In figura 41 vengono riportati gli spettri registrati su una griglia di punti che comprendevano due spots stampati con la cartuccia da 10 pL, mentre in figura 42 sono riportati gli spettri registrati su una griglia che comprendeva tre spots stampati con la cartuccia da 1pL. Si può notare come in entrambi i casi sia possibile riconoscere la presenza del SERRS reporter Texas Red che presenta i picchi caratteristici a 1505 e 1650  $\text{cm}^{-1}$ .

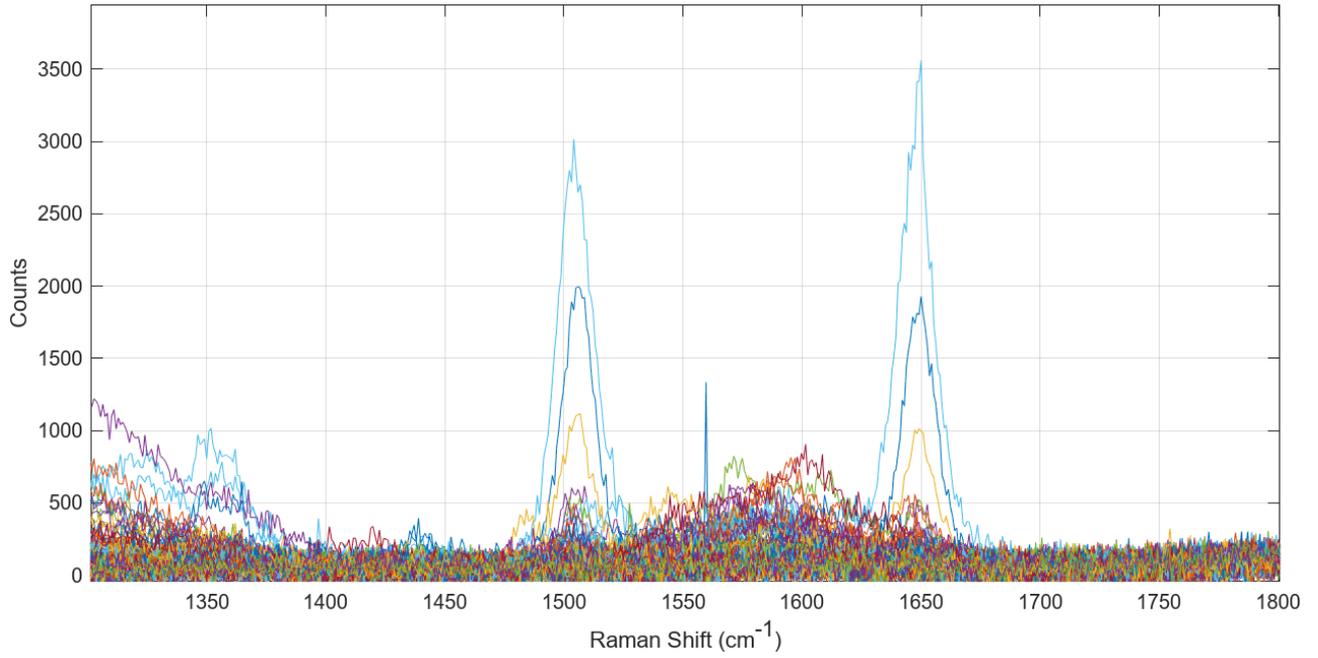


Figura 41. Immagine degli spettri SERS registrati sugli spots stampati con la cartuccia da 10 pL.

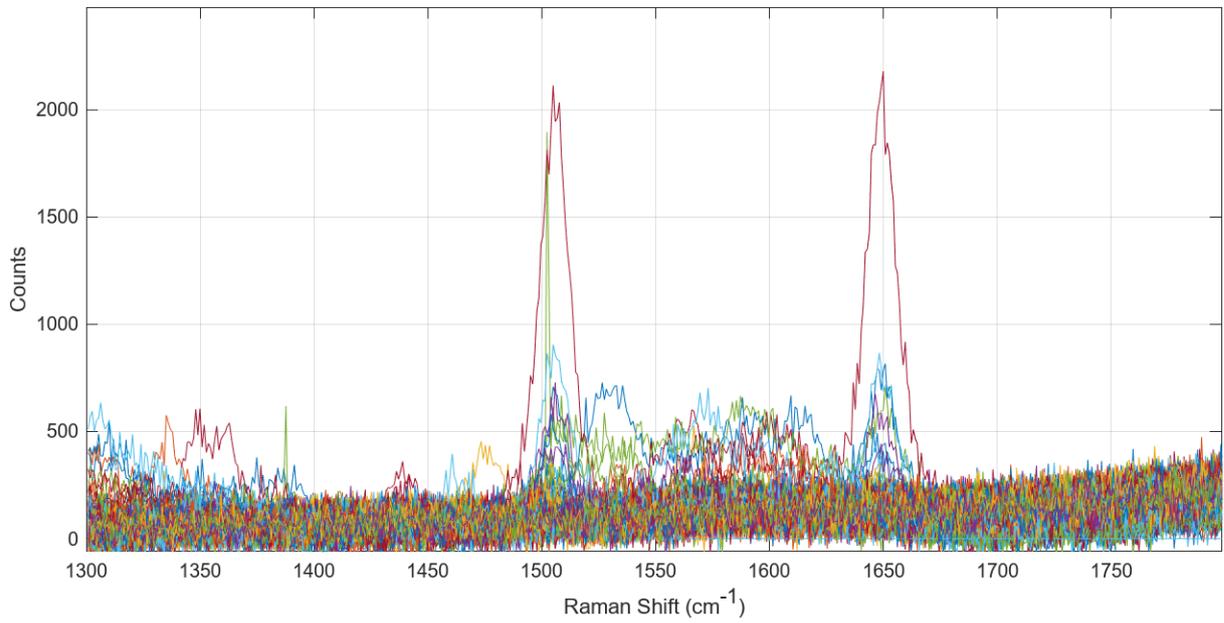


Figura 42. Immagine degli spettri SERS registrati sugli spots stampati con la cartuccia da 1 pL.

I dati sono stati quindi elaborati per ottenere una mappa dei segnali SERRS sulla griglia di registrazione evidenziando così i segnali all'interno e all'esterno degli spots stampati. Le mappe sono state realizzate utilizzando i valori dei coefficienti di correlazione di Pearson degli spettri rispetto ad uno spettro SERRS di riferimento del Texas Red (scala da 0 a 1; 0: nessun riconoscimento, 1: completo riconoscimento). Sovrapponendo i coefficienti degli spettri con le immagini degli spots registrate mediante microscopio ottico, è possibile costruire delle mappe che danno informazioni specifiche su dove tali segnali vengono espressi e perciò su dove le nanoparticelle hanno riconosciuto la presenza di Neutravidina. Di seguito vengono mostrati gli spettri e le mappe elaborate sugli spots stampati con la cartuccia da 10 pL (vedi figura 43 e 44) e da 1 pL (vedi figura 45).

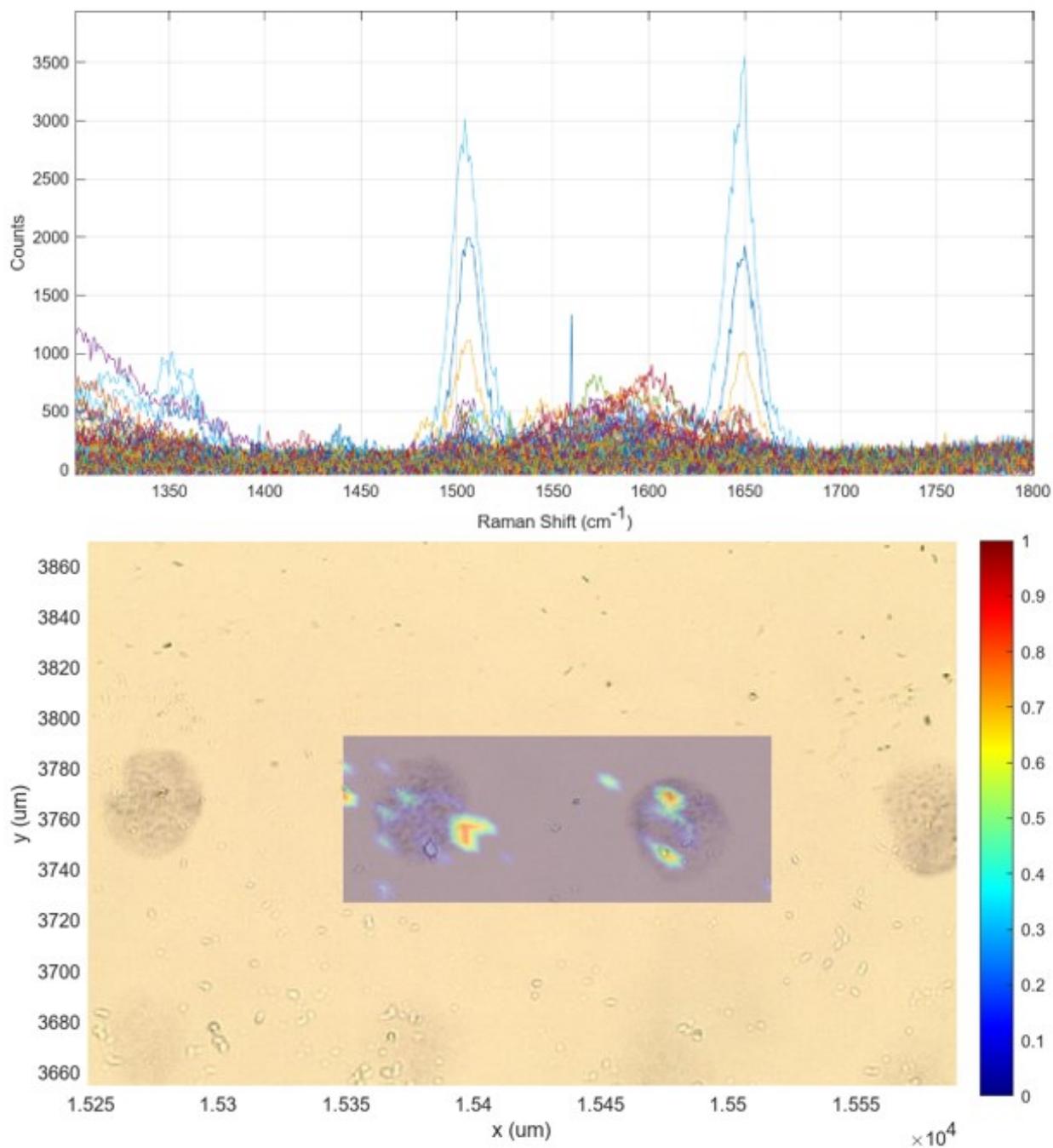


Figura 43. In alto sono riportati gli spettri SERS registrati su 2 spots stampati con la cartuccia da 10 pL. In basso la mappa elaborata mediante coefficiente di correlazione di Pearson.

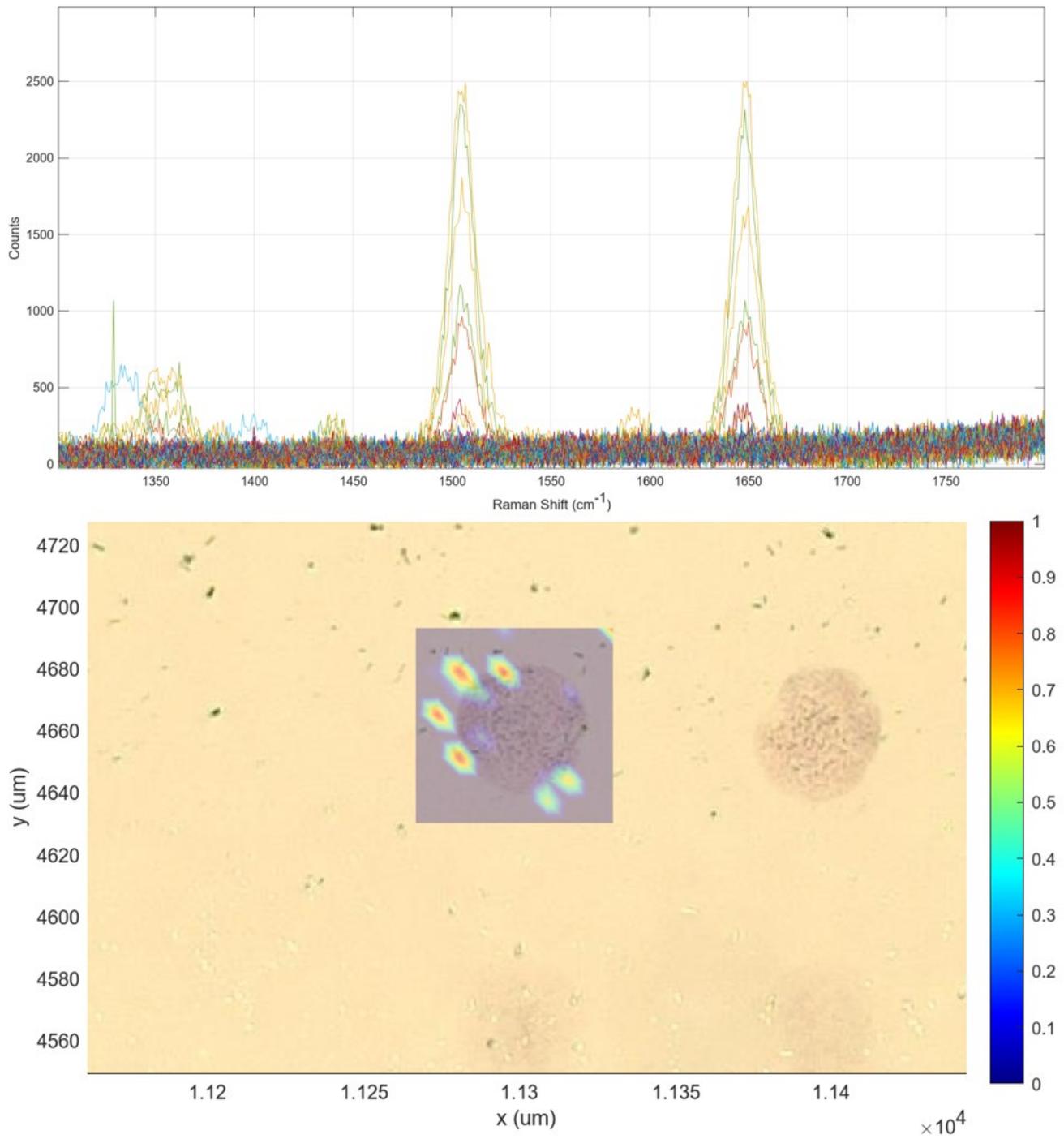


Figura 44. In alto sono riportati gli spettri SERS registrati su uno spot stampato con la cartuccia da 10 pL.  
In basso la mappa elaborata mediante coefficiente di correlazione di Pearson.

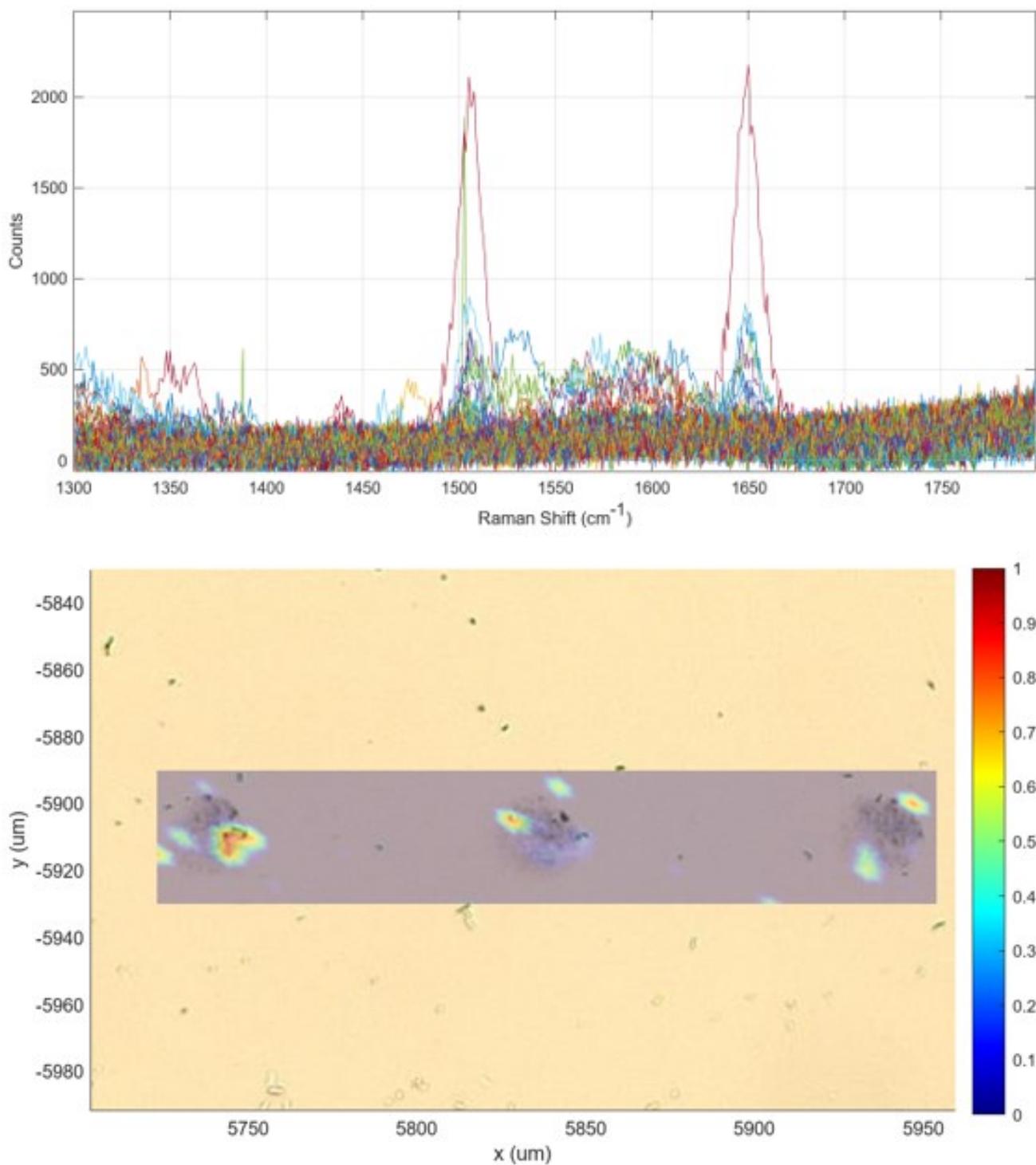


Figura 45. In alto sono riportati gli spettri SERS registrati su 3 spots stampati con la cartuccia da 1 pL. In basso la mappa elaborata mediante coefficiente di correlazione di Pearson.

Osservando le mappe registrate si può notare come gli spettri riconducibili agli spettri SERS del Texas Red si trovino in corrispondenza degli spots stampati, ovvero dove è presente la Neutravidina. Tale risultato dimostra sia la buona riuscita della stampa, poiché permette una buona localizzazione della neutravidina, sia la buona riuscita del protocollo di incubazione e lavaggio poiché i segnali si registrano sugli spots.

I protocolli definiti mostrano perciò la possibilità di ottenere degli spots di dimensioni simili a quelle cellulari, attraverso la tecnica dell'inkjet printing, in grado di localizzare proteine in modo specifico.

### **3.3 Riconoscimento della Neutravidina negli spots mediante spettroscopia di fluorescenza.**

#### **3.3.1. Preparazione della soluzione di Atto biotina 590**

Per poter avere un'ulteriore verifica dell'effettiva presenza di neutravidina sugli spots stampati e della capacità della proteina di legarsi con la biotina è stata utilizzata la spettroscopia di fluorescenza. In particolare, come marker fluorescente biotinilato è stata utilizzata la molecola di Atto biotina 590, la cui struttura è mostrata in figura 46 (lo spettro di assorbimento e di emissione sono analoghi a quelli della Atto 590 in figura 19). Anche in questo caso si è utilizzata la metodologia descritta dal test ELISA, per la quale è necessario preparare una soluzione contenente il fluoroforo per poter incubare gli spots stampati e successivamente lavare le molecole non legate. A differenza della metodologia SERS, la preparazione della soluzione da utilizzare per la spettroscopia di fluorescenza non richiede particolari passaggi di sintesi dato che la molecola è disponibile sul mercato. È stato necessario solamente diluire la molecola in opportuni solventi, così da far in modo che il volume per l'incubazione contenesse un numero di moli di fluorescente biotinilato confrontabile con il numero di moli di neutravidina presente negli spots ( $10^{-19}$  mol per uno spot) incubati. Di seguito viene riportato il protocollo utilizzato per preparare la soluzione:

- 0,32 mg di Atto biotina 590 vengono sciolti in 1,8 mL di dimetilsolfossido (DSMO), ottenendo una soluzione con concentrazione 0,18 mM.
- Tale soluzione viene diluita due volte, prima in acqua deaerata, ottenendo una concentrazione 180 nM, e successivamente in tampone fosfato (50 mM pH 7) e

Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 1mM), con concentrazione finale di 0,18 nM.

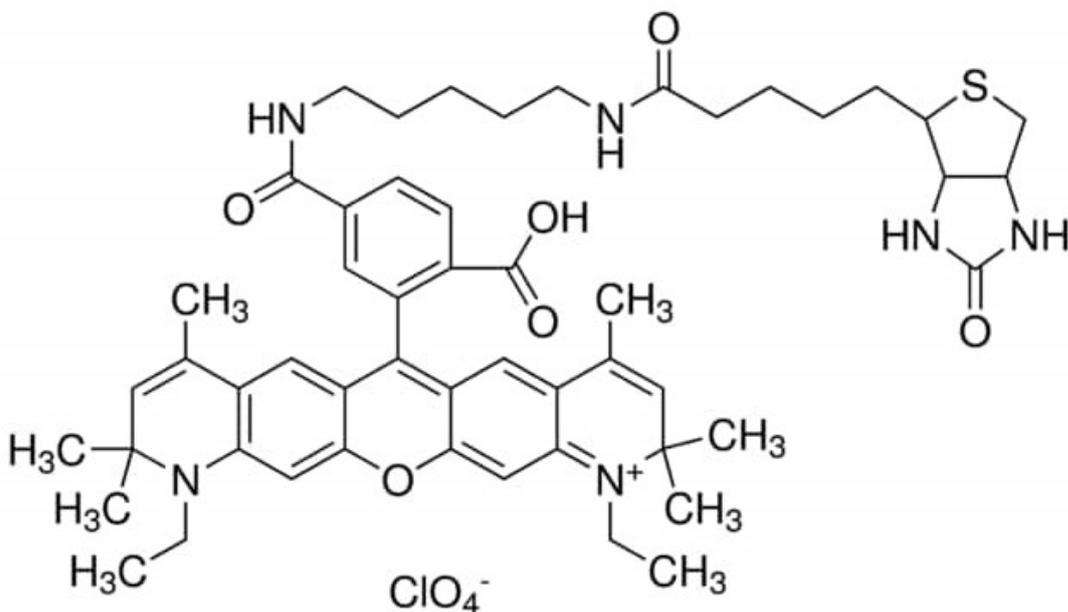


Figura 46. Struttura molecolare dell'atto biotina 590.<sup>25</sup>

Si utilizza quindi la soluzione per incubare le stampe degli spots. È stato necessario mettere a punto il corretto protocollo di incubazione e lavaggio dei vetrini, che viene riportato di seguito. Anche in questo caso si è deciso di adoperare un'incubazione preliminare degli spots con una soluzione contenente BSA in acqua (1mg di BSA in 1 mL di acqua) per evitare interazioni aspecifiche.

- Incubazione preliminare di 30 minuti con 100  $\mu$ L di una soluzione contenente BSA in acqua.
- Rimozione della soluzione di BSA e incubazione per 2h su piastra rotante con 100  $\mu$ L della soluzione preparata contenente l'Atto biotina 590 (0,18nM).
- Doppio lavaggio con 100  $\mu$ L di tampone fosfato (50mM pH 7) ed EDTA (1mM).
- Doppio lavaggio con 100  $\mu$ L di acqua per la rimozione di eventuali sali.

Utilizzando questo protocollo, il numero di moli di fluorescente biotinato presenti nella soluzione utilizzata durante l'incubazione è:

$$n = C * V = 0,18\text{nM} * 100\mu\text{L} = 0,018 \text{ pmol}$$

### 3.3.2 Analisi al fluorimetro degli spots incubati con la soluzione di Atto biotina 590

Una volta ottimizzato il processo di incubazione, sono state fatte le misure di fluorescenza sugli spots neutravidina stampati. In questo caso non è stato possibile verificare la presenza del segnale di fluorescenza all'interno e all'esterno degli spots poiché lo strumento utilizzato non era un microfluorimetro e perciò è stato registrato solo il segnale di fluorescenza medio di tutta la zona in cui erano presenti gli spots. Per prima cosa è stato registrato lo spettro di fluorescenza della soluzione utilizzata per l'incubazione. Gli spettri di emissione sono stati registrati con lo spettrofluorimetro FLS1000 (Edinburgh Instruments), accoppiato con una lampada a Xe in continuo usata come sorgente, e con un tubo fotomoltiplicatore (PMT 850) come detector. I campioni sono stati eccitati alla lunghezza d'onda di 570 nm.

In figura 47 viene riportato lo spettro di fluorescenza registrato con la soluzione contenente Atto biotina 590 (0,18 nM). La soluzione è stata posta in una cella con percorso ottico di 10 mm.

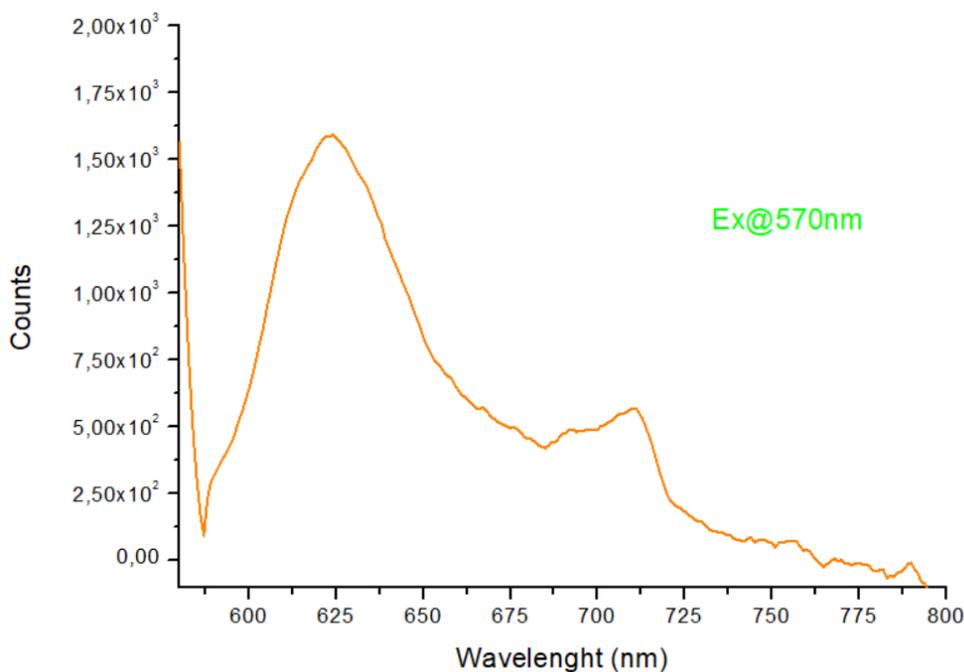


Figura 47. Spettro di fluorescenza registrato sulla soluzione contenente Atto biotina 590 utilizzata per incubare gli spots.

La fluorescenza registrata corrisponde allo spettro dell'Atto 590, poiché il picco si osserva con il massimo intorno ai 630 nm.<sup>18</sup> Si può notare anche un secondo picco, di intensità minore, intorno ai 713 nm, che è dovuto al segnale Raman dello stretching del gruppo OH dell'acqua (circa 3500 cm<sup>-1</sup>) presente nel solvente in cui è stato disciolto il fluorescente.

Successivamente, vengono registrati gli spettri di fluorescenza degli spots incubati, anch'essi eccitati a 570 nm. In particolare, sono stati analizzati due insiemi 10x10 di spots stampati con la cartuccia da 10 pL. In figura 48 vengono mostrati gli spettri di fluorescenza normalizzati sul picco per i due insiemi di spots.

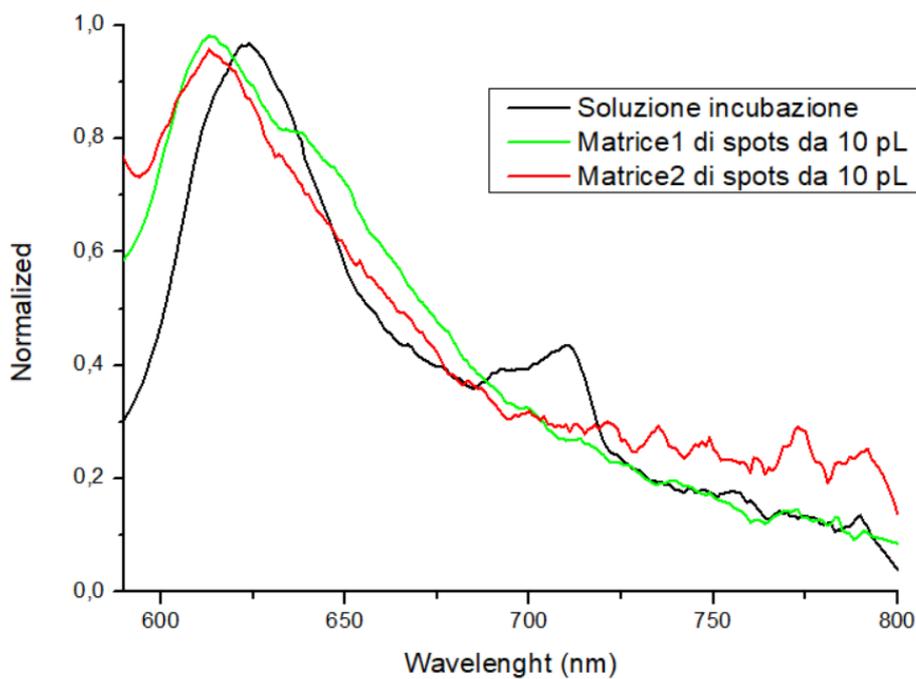


Figura 48. Confronto tra gli spettri normalizzati registrati sulla soluzione liquida utilizzata per il processo di incubazione e gli spettri registrati su due matrici di spots 10x10 stampate con la cartuccia da 10 pL dopo incubazione.

Lo spettro mostra un'emissione a 615 nm. Lo spostamento rispetto a quello della molecola in soluzione rientra nelle variazioni dovute alle interazioni della molecola fluorescente con il suo intorno. Il picco presente a 713 nm non è più presente non essendo presente acqua sugli spots.

Il risultato consente perciò di dire che anche con la spettroscopia di fluorescenza, è stata verificata la presenza della Neutroavidina sugli spots stampati.

#### 4. Conclusioni e Sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi sono stati definiti i protocolli per la stampa con ink-jet printing di spots di qualche decina di micrometri contenenti neutravidina. Si è inoltre verificato, con tests simili al test ELISA l'attività della proteina utilizzando l'interazione con la biotina.

Innanzitutto, è stata ricercata la migliore metodologia per la formulazione dell'inchiostro da stampare, contenente nanoparticelle d'oro, BSA e neutravidina. Con tale inchiostro è stato possibile stampare una serie di matrici 10x10 di spots ognuno con dimensioni paragonabili a quelle di una cellula (10-20  $\mu\text{m}$ ).

L'inchiostro è stato caratterizzato con la viscosità, densità e tensione superficiale che hanno permesso di definire il parametro Z per tutte le cartucce utilizzate in questo lavoro di tesi, dimostrando che il suo valore rientra nell'intervallo adatto per ottenere delle buone stampe.

Lo scopo della stampa degli spots contenenti neutravidina è quello di ottenere degli spots che consentono la localizzazione di antigeni, di solito molto costosi, in zone spaziali simili a quelle di una cellula, dove di solito gli antigeni ne caratterizzano le proprietà. Poiché gli antigeni vengono facilmente funzionalizzati con una piccola molecola come la biotina che interagisce fortemente con la neutravidina, la stampa della neutravidina è un passaggio importante per poi localizzare gli antigeni funzionalizzati con la biotina. È stato perciò importante riuscire a stampare la neutravidina e verificare che essa fosse ancora attiva.

Per verificare la presenza di neutravidina negli spots stampati, sono state utilizzate sia nanostrutture plasmoniche contenenti SERS reporter sia molecole fluorescenti in ogni caso funzionalizzate con la biotina. Nel primo caso la tecnica micro-Raman ha consentito la verifica della localizzazione della neutravidina in zone spaziali con risoluzione micrometrica dimostrando la sua precisa localizzazione sugli spots. I segnali di un fluorescente biotinilato hanno consentito di avere una seconda metodologia che confermasse i primi risultati anche se in questo secondo caso non è stato possibile localizzare la neutravidina sul singolo spot.

Come ricordato nell'introduzione, uno degli obiettivi, ora in via di attuazione, era quello di localizzare l'antigene PD-L1 sugli spots stampati. Le difficoltà trovate nella formulazione della composizione dell'inchiostro non hanno consentito di concludere questa parte del progetto con PD-L1 funzionalizzato con biotina che, come altri antigeni, ha costi molto elevati e doveva perciò essere usato solo quando si era verificata l'attività della neutravidina stampata. Il prossimo passaggio sarà perciò quello di incubare gli spots stampati con PD-

L1 biotinilato. L'ottenimento di questa piattaforma consentirà la verifica dell'attività di nanostrutture, programmate e sintetizzate nel laboratorio ospitante, che hanno come obiettivo il targeting di questa proteina che, come ricordato nell'introduzione, deve essere neutralizzata per evitare che le T-cells killer del nostro sistema immunitario restino attive contro le cellule tumorali che esprimono PD-L1 per difesa.

In figura 49 vengono ricordati i passaggi essenziali del processo di realizzazione di spots antigenici mediante la tecnica dell'inkjet printing.

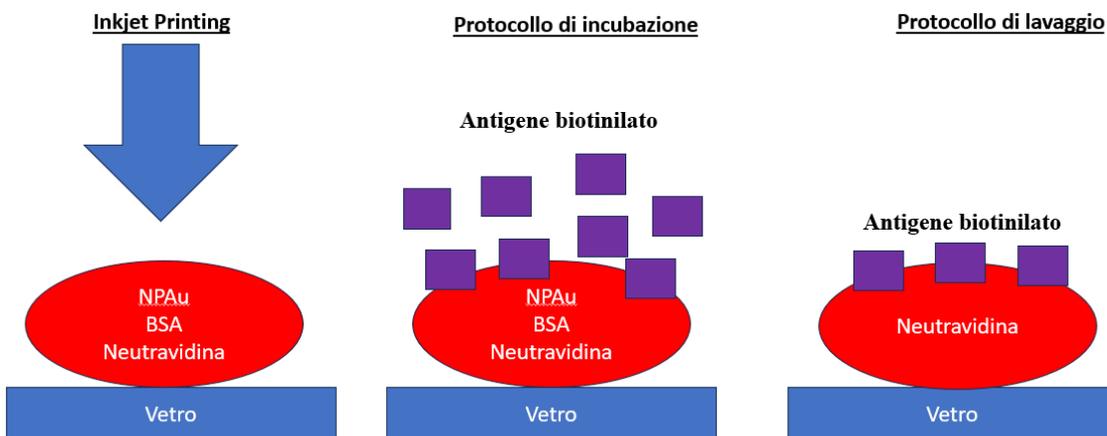


Figura 49. Schema del test ELISA per la realizzazione di antigen spots mediante la tecnica dell'inkjet printing.

## 5. Materiali e metodi

### 5.1. Reagenti

Tutti i solventi utilizzati, la BSA, l'atto biotina 590, la cisteina sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Merk). La neutravidina è stata acquistata da Termofisher. Il SERS reporter tiolato (Texas Red soluzione 34 $\mu$ M in metanolo) è stato fornito dal laboratorio ospitante. I vetrini (25 x 60 mm) su cui è stata effettuata la stampa sono stati acquistati da PolyAn. Il peptide MB01 funzionalizzato con biotina è stato realizzato nel laboratorio ospitante in un precedente lavoro di tesi.

### 5.2. Strumentazione

- *Ablazione laser:*

Per l'ablazione è stato utilizzato un laser a impulsi Nd:YAG (YG-981E-10, Quantel) che emette a 1064 nm, con frequenza di 10 Hz e con durata dell'impulso di 9 ns. La potenza del laser e la sua focalizzazione sul target sono state modulate per ottenere una fluenza di circa 2 J/cm<sup>2</sup>.

- *Spettroscopia UV-Vis-NIR:*

Gli spettri UV-Vis-NIR sono stati registrati con spettrometro Cary 5000 a doppio raggio (Agilent Technologies). Sono state utilizzate celle di quarzo con cammino ottico di 0.2 cm.

- *Inkjet Printer:*

Per la stampa degli spots è stata utilizzata la stampante a getto d'inchiostro Dimatix Materials DMP-2831, prodotta dalla Fujifilm. Sono state utilizzate le cartucce DMC-11610 (10 pL), DMC-11601 (1pL), Samba Cartridge (2,5 pL). Il software di gestione della stampante utilizzato è Drop Manager. La stampante è stata messa a disposizione dal Prof. Flavio Maran.

- *Misure Raman SERS:*

Le misure SERS degli spots e delle soluzioni colloidali sono state registrate con lo spettrometro micro-Raman InVia (Renishaw) con rivelatore CCD, interfacciato direttamente ad un microscopio Leika. Una telecamera associata al microscopio

permetteva di osservare i campioni e di focalizzazione il laser sul campione. Per la registrazione degli spettri sono stati utilizzati una sorgente laser ad He-Ne a 633 nm (12 mW di potenza) e un reticolo da 1800 righe/mm. La calibrazione dello strumento è stata effettuata con un riferimento interno di silicio. Gli spettri delle soluzioni colloidali sono stati registrati da 1000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  con un tempo di acquisizione di 10 secondi per ogni misura. Gli spettri degli spot sono stati registrati da 1300 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  con un tempo di acquisizione di 10s, con potenza del laser al 10%.

▪ *Misure di viscosità:*

Le proprietà reologiche del campione sono state caratterizzate con il reometro rotazionale Kinexus Lab+(Malvern-Netzsch). Per l'analisi della viscosità, misurata applicando una velocità di taglio nell'intervallo 0,1 e 100  $\text{s}^{-1}$ , è stata utilizzata la geometria Cono/Piatta (CP 4/40), avente il diametro pari a 40 mm e l'angolo del cono di 4 °. La misura è stata effettuata a 25 °C. Lo spessore del campione, in corrispondenza della punta del cono troncato, era fissato a 150  $\mu\text{m}$  dallo strumento. Il volume totale del campione caricato è stato di circa di 1,2 mL.

▪ *Misura di tensione superficiale:*

La misura di tensione superficiale è stata svolta in collaborazione con il dipartimento di Fisica dell'Università di Padova (Prof. Matteo Pierno) attraverso la tecnica del pendant drop: le gocce di campione vengono generate con una pompa a siringa controllata da un computer (PHD 22/2000, apparato Harvard); la siringa in dotazione è di vetro (500  $\mu\text{L}$ , SGE) e monta un ago in acciaio inossidabile con un diametro esterno di 0,6 mm. Una telecamera CCD (Basler acA1300–200  $\mu\text{m}$ ) dotata di un obiettivo telecentrico è stata utilizzata per raccogliere il profilo laterale delle gocce, mentre un LED bianco è stato usato per la retroilluminazione.

▪ *Spettroscopia di fluorescenza:*

Gli spettri di emissione sono stati registrati con lo spettrofluorimetro FLS1000 (Edinburgh Instruments) accoppiato con una lampada a Xe in continuo, usata come sorgente, e con un tubo fotomoltiplicatore (PMT 850) come detector. I campioni sono stati eccitati alla

lunghezza d'onda di 570 nm. Per effettuare le misure sui campioni allo stato liquido sono state utilizzate celle di 10 mm.

### **5.3 Ottimizzazione del processo di stampa**

In questa sezione vengono riportate le prove effettuate per definire il più efficiente protocollo di formulazione d'inchiostro, le prove di stampa effettuate e il dettaglio delle misure di viscosità, tensione superficiale e densità, i cui risultati sono stati mostrati nel capitolo 3.

#### **5.3.1. Prove di stampa**

Le prove effettuate per raggiungere il protocollo ottimale per la formulazione dell'inchiostro sono state effettuate utilizzando solamente BSA come proteina. Come riportato nel capitolo 3, durante questo processo è fondamentale gestire l'aggregazione e la concentrazione delle nanoparticelle presenti nell'inchiostro. A dimostrazione di quest'ultima affermazione, di seguito si riporta il confronto di risultati di stampa ottenuti con due inchiostri formulati utilizzando il medesimo protocollo, ma che si differenziano per la concentrazione di nanoparticelle: 45 nM e 170 nM. I due inchiostri in questione sono stati ottenuti utilizzando 3 mg di BSA per ogni millilitro di nanoparticelle d'oro in soluzione. In figura 50 viene riportata l'immagine della stampa ottenuta utilizzando l'inchiostro meno concentrato e in figura 51 il risultato dato dall'inchiostro con maggiore concentrazione di nanoparticelle. Entrambe le stampe sono state ottenute con la cartuccia da 10 pL. Osservando gli spots, risulta evidente che, aumentando la concentrazione delle nanoparticelle questi risultino più nitidi e visibili su tutta la matrice 10x10; in aggiunta presentano una forma più omogenea e vicina a quella desiderata.

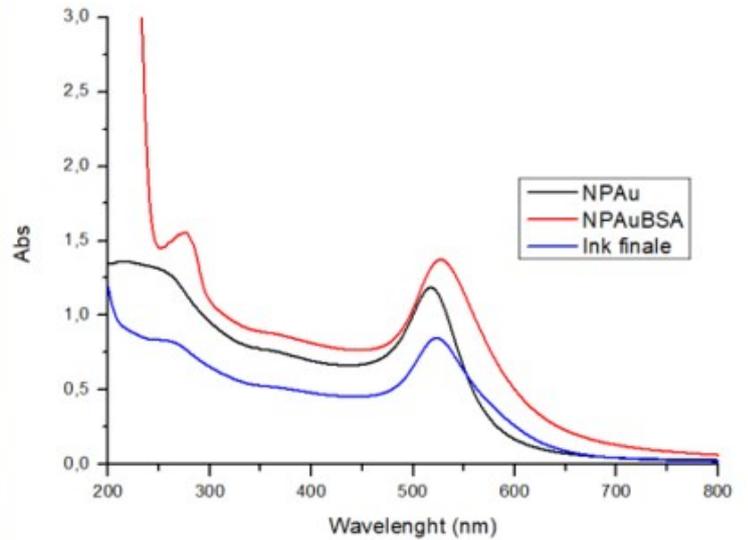
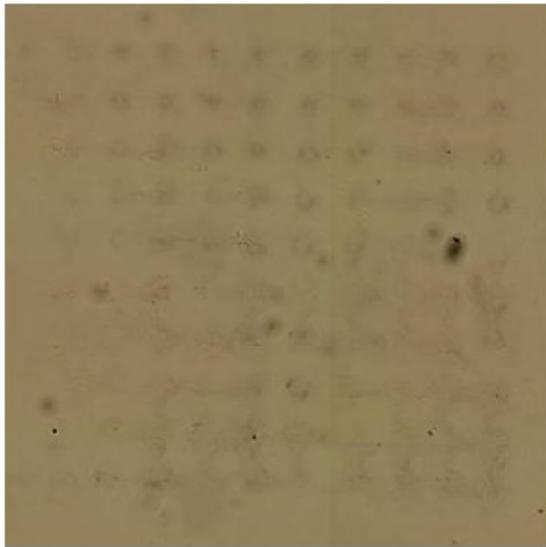


Figura 50. Prova di stampa ottenuta con un inchiostro contenente NPAu e BSA con concentrazione di 45 nM e spettri ottenuti durante la formulazione dell'inchiostro, lo spettro "ink finale" è stato ottenuto diluendo la soluzione di 10 volte.

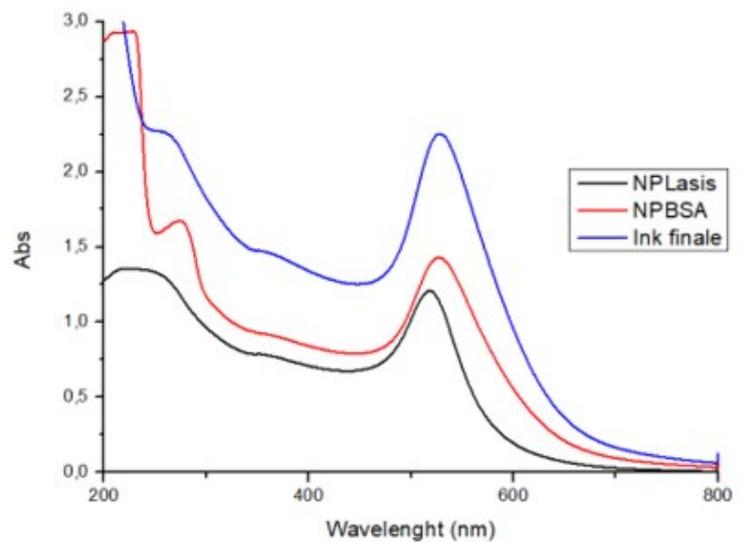
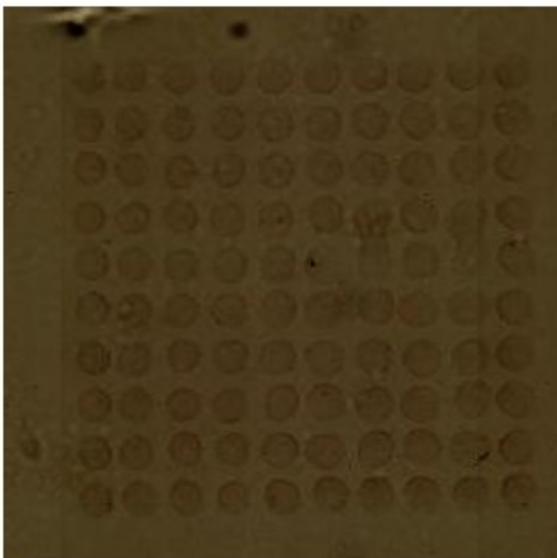


Figura 51. Prova di stampa ottenuta con un inchiostro contenente NPAu e BSA con concentrazione di 170 nM e spettri ottenuti durante la formulazione dell'inchiostro, lo spettro "ink finale" è stato ottenuto diluendo la soluzione di 10 volte.

Se però durante il processo di stampa si utilizzano nanoparticelle troppo aggregate può avvenire che le particelle più pesanti si vadano a posizionare al centro degli spots, provocandone la disomogeneità. A dimostrazione di ciò, in figura 52 viene riportato il risultato ottenuto utilizzando un inchiostro che presenta nanoparticelle aggregate – come si evince osservandone lo spettro. Tale immagine è stata ottenuta utilizzando un obiettivo 20x e la stampa è stata effettuata con una cartuccia da 10 pL.

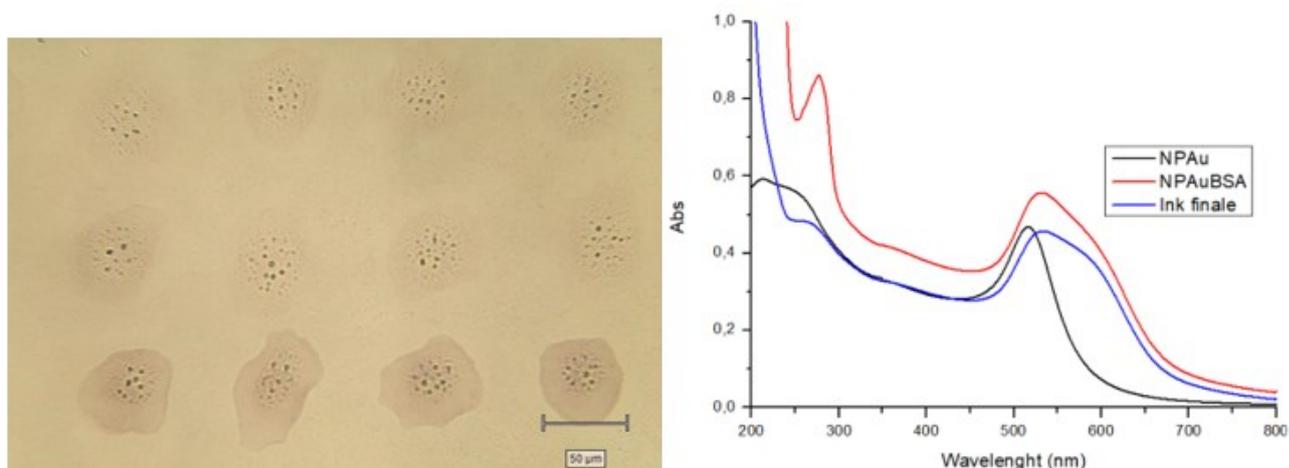


Figura 52. Immagine degli spots stampati ottenuti utilizzando un obiettivo 20x e spettri registrati durante la formulazione dell'inchiostro.

### 5.3.2. Caratterizzazione fisica dell'inchiostro

- *Viscosità:*

Di seguito (vedi tabella 1) vengono riportate le misure effettuate con il reometro rotazionale per poter stimare la viscosità dell'inchiostro. Sono state effettuate 16 misure, aumentando la velocità di taglio da 0,1 a 100 s<sup>-1</sup> alla temperatura ambiente di 25° C e utilizzando l'equazione 8 si è calcolata la viscosità dinamica.

Misura	Sforzo di taglio (Pa)	Velocità di taglio (s <sup>-1</sup> )	Viscosità dinamica $\eta$ (Pa s)
1	1,76E-03	0,1	0,01764
2	1,70E-03	0,1585	0,01071
3	8,24E-04	0,2512	3,28E-03
4	6,46E-04	0,3981	1,62E-03
5	3,18E-03	0,631	5,04E-03
6	5,28E-03	1	5,28E-03
7	0,01066	1,585	6,73E-03
8	0,01551	2,512	6,17E-03
9	0,02781	3,981	6,99E-03
10	0,04492	6,31	7,12E-03
11	0,06117	10	6,12E-03
12	0,08347	15,85	5,27E-03
13	0,1159	25,12	4,61E-03
14	0,1621	39,81	4,07E-03
15	0,2329	63,1	3,69E-03
16	0,3448	100	3,45E-03

Tabella 1

- Media di  $\eta$ : 5,38 mPa s.
- Deviazione standard: 0,12 mPa s.

Per poter stimare il valore di viscosità è stata effettuata una media dei valori di viscosità dinamica. È importante sottolineare che le prime quattro misure sono state escluse dal calcolo poiché il momento torcente (fornito dallo strumento durante ogni misura) di cui risente il campione risulta troppo basso (nell'ordine di  $10^{-8}$  N m anziché  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  N m registrati nelle altre misure). Questo è il motivo per cui i valori di viscosità dinamica registrati in queste misure risultano avere dei valori che si distanziano da quelli registrati successivamente.

- *Tensione superficiale:*

Di seguito vengono riportate nel dettaglio le misure che hanno permesso di stimare la tensione superficiale dell'inchiostro mediante la tecnica del pendant drop. Sono state effettuate 10 misure differenti e il valore finale è stato stimato facendo una media dei risultati ottenuti. In figura 50 sono riportate le immagini delle 10 gocce di inchiostro su cui sono state effettuate le misure. I valori ricavati da tali misure sono invece riportati in tabella 2. Il rapporto tra pixel e millimetri dell'apparato sperimentale utilizzato è di 186, valore utile poiché permette di convertire i pixel delle immagini registrate in millimetri.

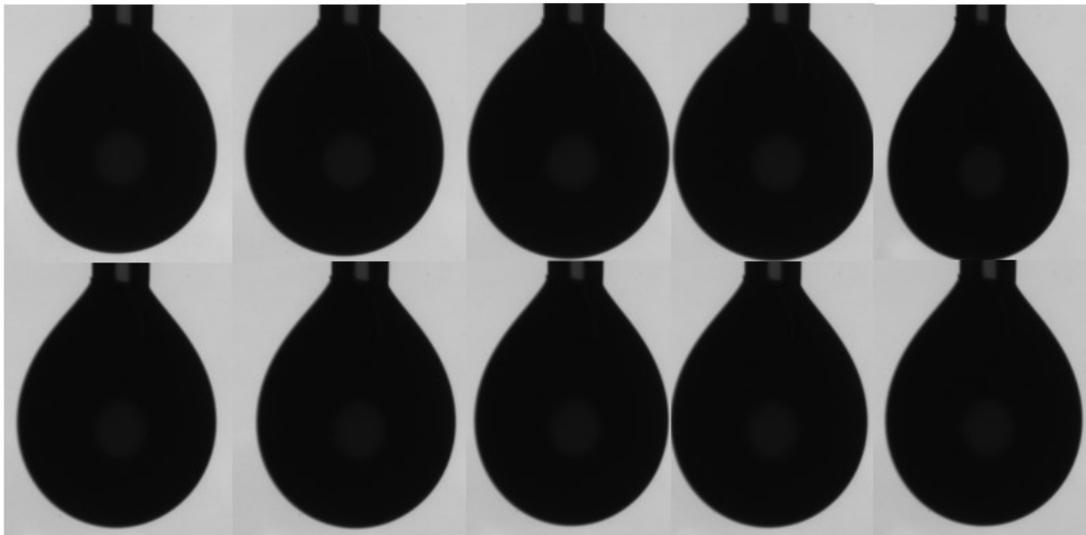


Figura 53. Immagine delle gocce di inchiostro registrate durante la misura della tensione superficiale mediante tecnica di pendant drop.

Misura	Raggio goccia (pixel)	Raggio goccia $R_0$ (mm)	Tens. Sup. $\gamma$ (mN/m)
1	188,0320012	1,010924738	43,19737
2	187,4774353	1,0079432	42,43426
3	187,3974747	1,007513305	42,68148
4	186,9626427	1,005175498	42,48336
5	186,2845473	1,001529824	42,5953
6	194,5056333	1,045729211	42,3533
7	178,0528668	0,957273477	42,87021
8	178,4038828	0,95916066	42,43786
9	174,744747	0,939487887	43,9415
10	178,0210412	0,957102372	43,43604

Tabella 2

- Media di  $\gamma$ : 42,78 mN/m
- Deviazione standard: 0,51mN/m

## 5.4 Ottimizzazione del protocollo per la preparazione delle particelle biotinilate con attività SERS

### 5.4.1. Taratura di Ellman

Come accennato nel capitolo 3, per poter ricavare la concentrazione di peptide che funzionalizza le particelle è stato necessario effettuare un test di Ellman preliminare su una soluzione di controllo contenente cisteina. In particolare, il test è stato ripetuto su tre diverse soluzioni con differenti concentrazioni di Cisteina: 80  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ . Le soluzioni del test di Ellman sono state dunque preparate nel seguente modo:

- 470  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato.
- 10  $\mu\text{L}$  di Cisteina prelevati dalle tre soluzioni con concentrazione differente
- 20  $\mu\text{L}$  di reattivo (DTNB) in tampone fosfato.

Si ottengono i seguenti spettri UV-Vis delle soluzioni (figura 54):

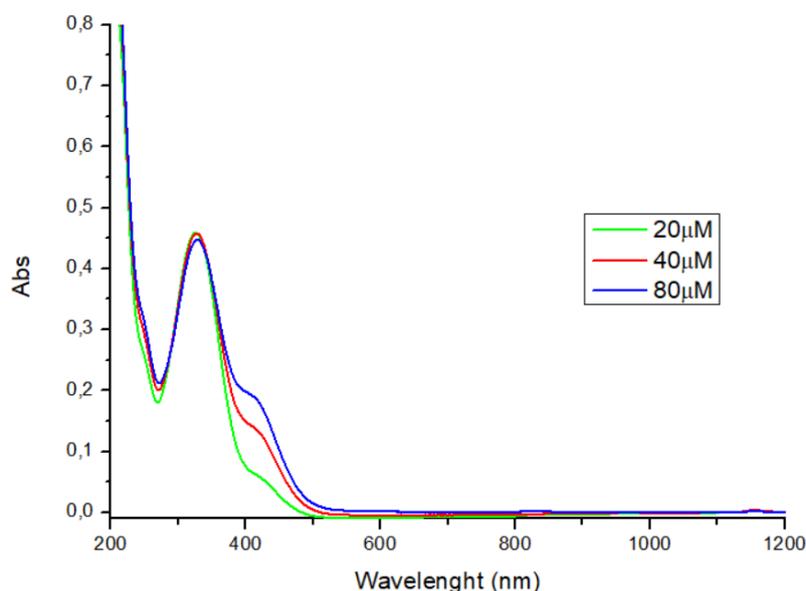


Figura 54. Spettri di assorbimento dei test di Ellman effettuati sulle soluzioni contenenti diverse concentrazioni di *cisteina*.

Osservando tali spettri si nota come l'aumento della concentrazione di cisteina provochi un aumento dello spettro di assorbimento a 412 nm. I valori di assorbimento a 412 nm registrati in questi spettri vengono riportati nella tabella 1. È importante sottolineare come lo spettro ottenuto sulla soluzione 20  $\mu\text{M}$  mostri dei valori di assorbimento a 412 nm (0,055)

corrispondenti a quelli ottenuti nella soluzione contenente il peptide biotinilato utilizzata per funzionalizzare le nanoparticelle (0,055) in cui la concentrazione di gruppi tiolici in soluzione è simile (21  $\mu\text{M}$ ). Tale riscontro è utile poiché permette di verificare l'efficacia del test.

Conc. ( $\mu\text{M}$ )	80	40	20
Abs	0,19	0,105	0,055

Tabella 3

Usando la legge di Lambert-Beer (eq.14), poiché il cammino ottico ( $b$ ) e il coefficiente di assorbimento molare ( $\epsilon$ ) sono valori costanti, si può riscrivere l'equazione nel seguente modo (con  $k=b \epsilon$ ):

$$A = k C$$

Eq. 15

Questa è l'equazione di una retta passante per l'origine il cui coefficiente angolare è rappresentato dal valore  $k$ . Per cui, è possibile graficare i dati riportati in tabella 3 ottenendo la seguente retta:

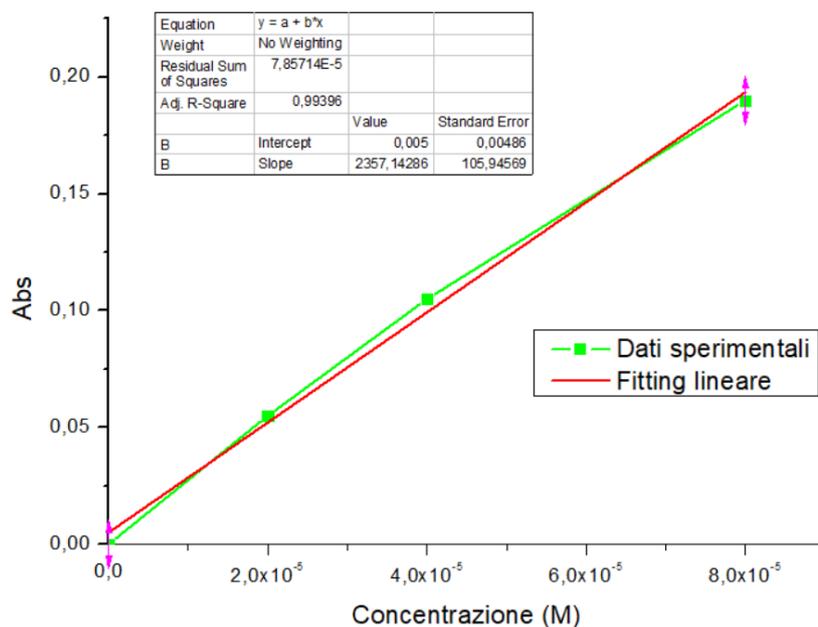


Figura 55. Retta elaborata mediante software Origin dei valori di assorbimento registrati a 412 nm nei test di Ellman effettuati.

Il fitting lineare di tale retta, elaborato mediante il software Origin, permette di ricavare il valore del coefficiente angolare: 2357. Da questo, poiché si conosce il cammino ottico (0,2

cm) è possibile stimare il coefficiente di assorbimento molare (utilizzato nel paragrafo 3.2.2.):

$$\varepsilon = \frac{k}{b} = \frac{2357 \text{ M}^{-1}}{0,2 \text{ cm}} = 11785 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

#### 5.4.2. Ottimizzazione del protocollo di incubazione

Per poter ricavare il protocollo ideale usato durante il processo di incubazione riportato nel paragrafo 3.2.3. è stato necessario sostenere diverse prove. Oggetto di studio approfondito è stato trovare le giuste modalità di lavaggio degli spots che permettessero di avere un binding specifico della biotina con la neutravidina, senza avere la presenza delle nanoparticelle funzionalizzate anche al di fuori degli spots. Infatti, durante le prove svolte è parso fondamentale attuare un doppio lavaggio con 200  $\mu\text{L}$  del tampone (Tris 25mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,2) e 200  $\mu\text{L}$  di acqua, come riportato nel protocollo finale. A dimostrazione di ciò in figura 52 viene mostrata una mappa registrata su una stampa ottenuta con la cartuccia da 1 pL in cui è stato effettuato un singolo lavaggio con 200  $\mu\text{L}$  tampone prima e con 200  $\mu\text{L}$  acqua dopo. Tale mappa riporta il coefficiente di Pearson degli spettri registrati nei punti della griglia. Si nota come sia possibile identificare gli spots contenenti neutravidina e come questi si manifestino con un'alta espressione di Texas Red (vedi siti A e B in figura 56). Però, si nota anche la forte presenza di segnali SERS al di fuori degli spots, indice appunto di una presenza aspecifica delle nanoparticelle. Tale situazione non si verifica adoperando un doppio lavaggio, come visto nel capitolo 3.

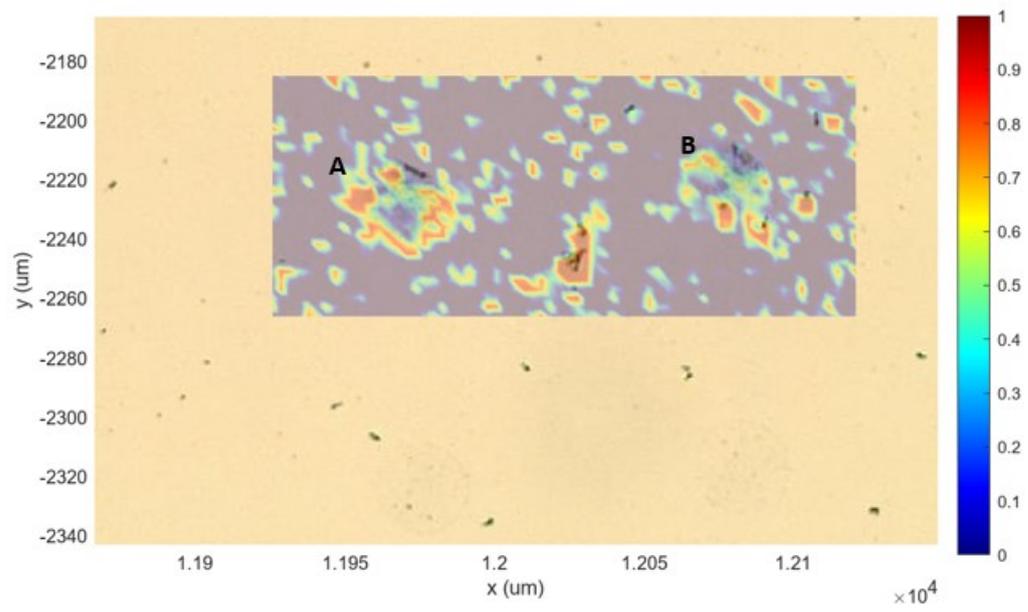


Figura 56. Mappa elaborata mediante software MATLAB utilizzando il coefficiente di correlazione di Pearson

## Bibliografia

- (1) Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-Based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (5), 2826–2885. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>.
- (2) Lôbo, G. C. N. B.; Paiva, K. L. R.; Silva, A. L. G.; Simões, M. M.; Radicchi, M. A.; Bão, S. N. Nanocarriers Used in Drug Delivery to Enhance Immune System in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (8), 1167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081167>.
- (3) De Aberasturi, D. J.; Serrano-Montes, A. B.; Liz-Marzán, L. M. Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health. *Adv. Opt. Mater.* **2015**, *3* (5), 602–617. <https://doi.org/10.1002/adom.201500053>.
- (4) Crowther, J. R. *The ELISA Guidebook*; Walker, J. M., Series Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 516. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4>.
- (5) Herbrink, P.; Van Bussel, F. J.; Warnaar, S. O. The Antigen Spot Test (AST): A Highly Sensitive Assay for the Detection of Antibodies. *J. Immunol. Methods* **1982**, *48* (3), 293–298. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90330-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90330-1).
- (6) Yang, J.; Hu, L. Immunomodulators Targeting the PD-1/PD-L1 Protein-Protein Interaction: From Antibodies to Small Molecules: YANG AND HU. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39* (1), 265–301. <https://doi.org/10.1002/med.21530>.
- (7) Brindha, J.; Privita Edwina, Ra. G.; Rajesh, P. K.; P.Rani. Influence of Rheological Properties of Protein Bio-Inks on Printability: A Simulation and Validation Study. *Mater. Today Proc.* **2016**, *3* (10), 3285–3295. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.010>.
- (8) Nayak, L.; Mohanty, S.; Nayak, S. K.; Ramadoss, A. A Review on Inkjet Printing of Nanoparticle Inks for Flexible Electronics. *J. Mater. Chem. C* **2019**, *7* (29), 8771–8795. <https://doi.org/10.1039/C9TC01630A>.
- (9) Li, X.; Liu, B.; Pei, B.; Chen, J.; Zhou, D.; Peng, J.; Zhang, X.; Jia, W.; Xu, T. Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (19), 10793–10833. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00008>.
- (10) Kim, Y. K.; Park, J. A.; Yoon, W. H.; Kim, J.; Jung, S. Drop-on-Demand Inkjet-Based Cell Printing with 30-  $\mu$  m Nozzle Diameter for Cell-Level Accuracy. *Biomicrofluidics* **2016**, *10* (6), 064110. <https://doi.org/10.1063/1.4968845>.
- (11) Barron, A. R. *Physical Methods in Chemistry and Nano Science. Volume: 4, Chemical Speciation*, Midas Green Innovations, 2020, ISBN: 978-1838008574.
- (12) Schlücker, S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (19), 4756–4795. <https://doi.org/10.1002/anie.201205748>.
- (13) Lane, L. A.; Qian, X.; Nie, S. SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10489–10529. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00265>.
- (14) Hähnke, V. D.; Kim, S.; Bolton, E. E. PubChem Chemical Structure Standardization. *J. Cheminformatics* **2018**, *10* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0293-8>.
- (15) Meneghetti, M.; Scarsi, A.; Litti, L.; Marcolongo, G.; Amendola, V.; Gobbo, M.; Di Chio, M.; Boscaini, A.; Fracasso, G.; Colombatti, M. Plasmonic Nanostructures for SERRS Multiplexed Identification of Tumor-Associated Antigens. *Small* **2012**, *8* (24), 3733–3738. <https://doi.org/10.1002/smll.201201196>.

- (16) Lakowicz, J. R.; Masters, B. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*; 2008; Vol. 13.
- (17) Bhattacharjee, U.; Beck, C.; Winter, A.; Wells, C.; Petrich, J. W. Tryptophan and ATTO 590: Mutual Fluorescence Quenching and Exciplex Formation. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (29), 8471–8477. <https://doi.org/10.1021/jp412045m>.
- (18) ATTO-TEC. "Atto 590". [atto-tec.com](https://www.atto-tec.com). <https://www.atto-tec.com/ATTO-590.html?language=de>. 13 luglio 2023.
- (19) Rosano, C.; Sabini, E.; Nardone, E.; Arosio, P. Ingegneria di proteine: l'avidina e i suoi mutanti, Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata XIV Congresso Nazionale, 1998.
- (20) Livnah, O.; BAYERt, E. A.; WILCHEKt, M.; Sussman, J. L. Three-Dimensional Structures of Avidin and the Avidin-Biotin Complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**.
- (21) Leppiniemi, J.; Grönroos, T.; Määttä, J. A. E.; Johnson, M. S.; Kulomaa, M. S.; Hytönen, V. P.; Airene, T. T. Structure of Bradavidin – C-Terminal Residues Act as Intrinsic Ligands. *PLoS ONE* **2012**, *7* (5), e35962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035962>.
- (22) Amendola and Moreno Meneghetti, Controlled size manipulation of free gold nanoparticles by laser irradiation and their facile bioconjugation *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4705. <https://doi.org/10.1039/b709621f>.
- (23) Fulchini, F. Degradazione Di Un Polistirene e Di Un Polietilene in Presenza Di Un Additivo Pro-Degradant Università degli studi di Salerno, 2012.
- (24) Berry, J. D.; Neeson, M. J.; Dagastine, R. R.; Chan, D. Y. C.; Tabor, R. F. Measurement of Surface and Interfacial Tension Using Pendant Drop Tensiometry. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *454*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>.
- (25) Sigma-Aldrich. "Atto 590-Biotin BioReagent, Suitable for Fluorescence". [sigmaaldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/43208>. 28 luglio 2023.