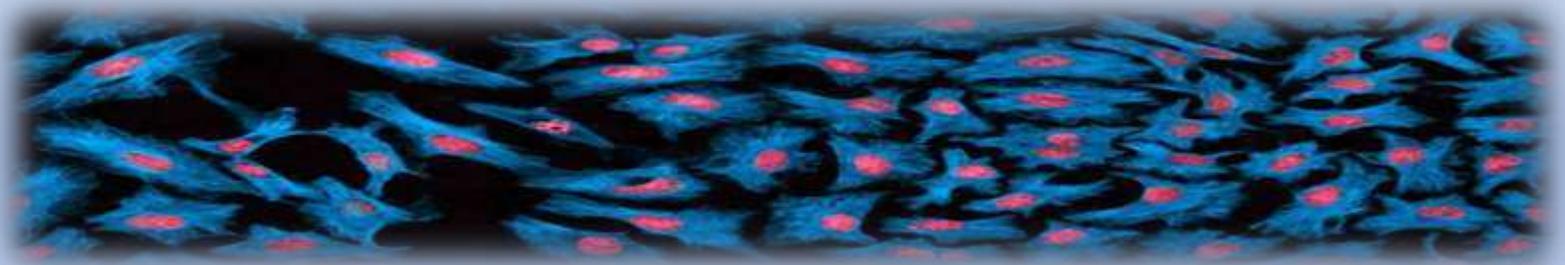


Università degli Studi di Padova



Dipartimento di Scienze
Chimiche (Disc)

Corso di Laurea in Scienza dei
Materiali



Tecniche fotoniche per la realizzazione di sensori per il campo industriale delle biotecnologie

Laureanda: Francesca Noventa

Utilizzo della Chemiluminescenza

Utilizzata per:

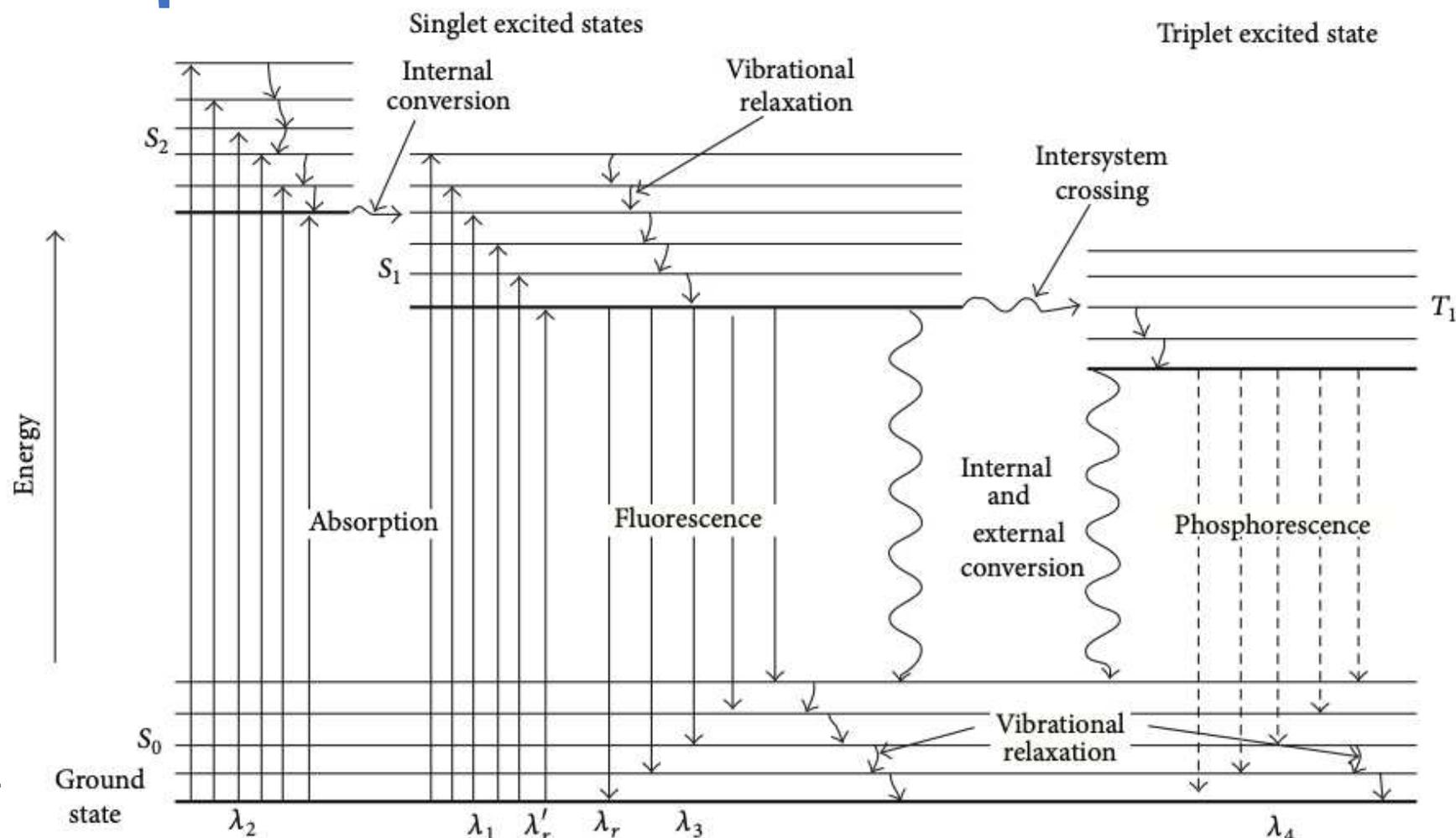
- Dosaggio di substrati e attività enzimatiche che coinvolgono ATP o NAD(P)⁺/NAD(P)H
- Marcatura di anticorpi o altre molecole con traccianti enzimatici (perossidasi, fosfatasi alcalina)
che vengono rivelati con substrati Chemiluminescenti.
- Tecniche di molecular Imaging.

Fluorescenza e Chemiluminescenza

Entrambi sono fenomeni spontanei di luminescenza con decadimenti radioattivi: Processo in cui molecola si libera dell'energia a partire da specie elettricamente o vibrazionalmente eccitazione ed emette sotto forma di fotoni.

Fluorescenza (e fosforescenza) sono emissioni nel visibile di fotoni conseguenti a radiazione assorbente.

Chemiluminescenza è la produzione di fotoni nel visibile e nel vicino infrarosso da parte di reazioni chimiche.

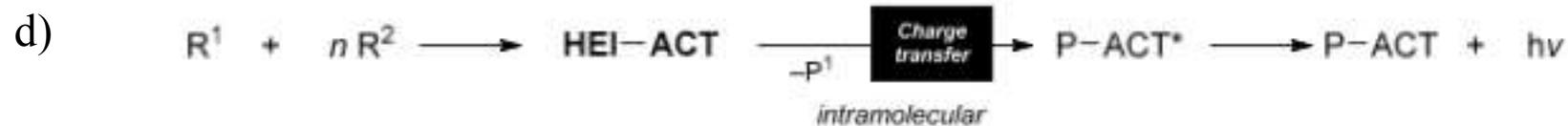
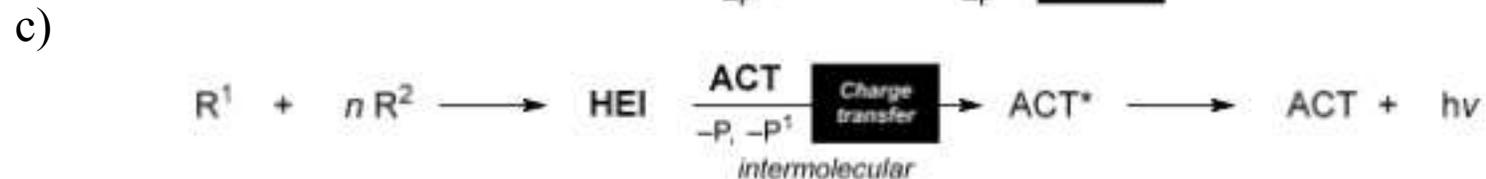
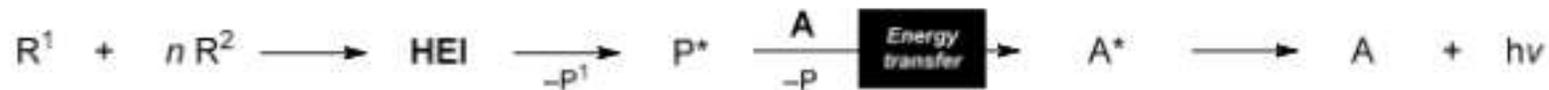


M.Sauer, J.Ho3ens, and J.Enderlein,
Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging,
WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
KGaA, Weinheim, Germany, 1à.
(2010)

Meccanismi di Chemiluminescenza Organica

Schema dei meccanismi:

- Meccanismo Generale.
- CL Diretto.
- CL Indiretto di Fluorescenza/Fotofosforescenza accettore di energia.
- Attivato in presenza di colorante fluorescente ossidabile.



Stevani, C.V.;
 Silva, S.M.;
 Baader, W.J.
 Studies on the
 Mechanism of the
 Excitation Step in
 Peroxyoxalate
 Chemiluminescence. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**,
 2000, 4037–
 4046.

Metodo di Imagin Ottico Planare

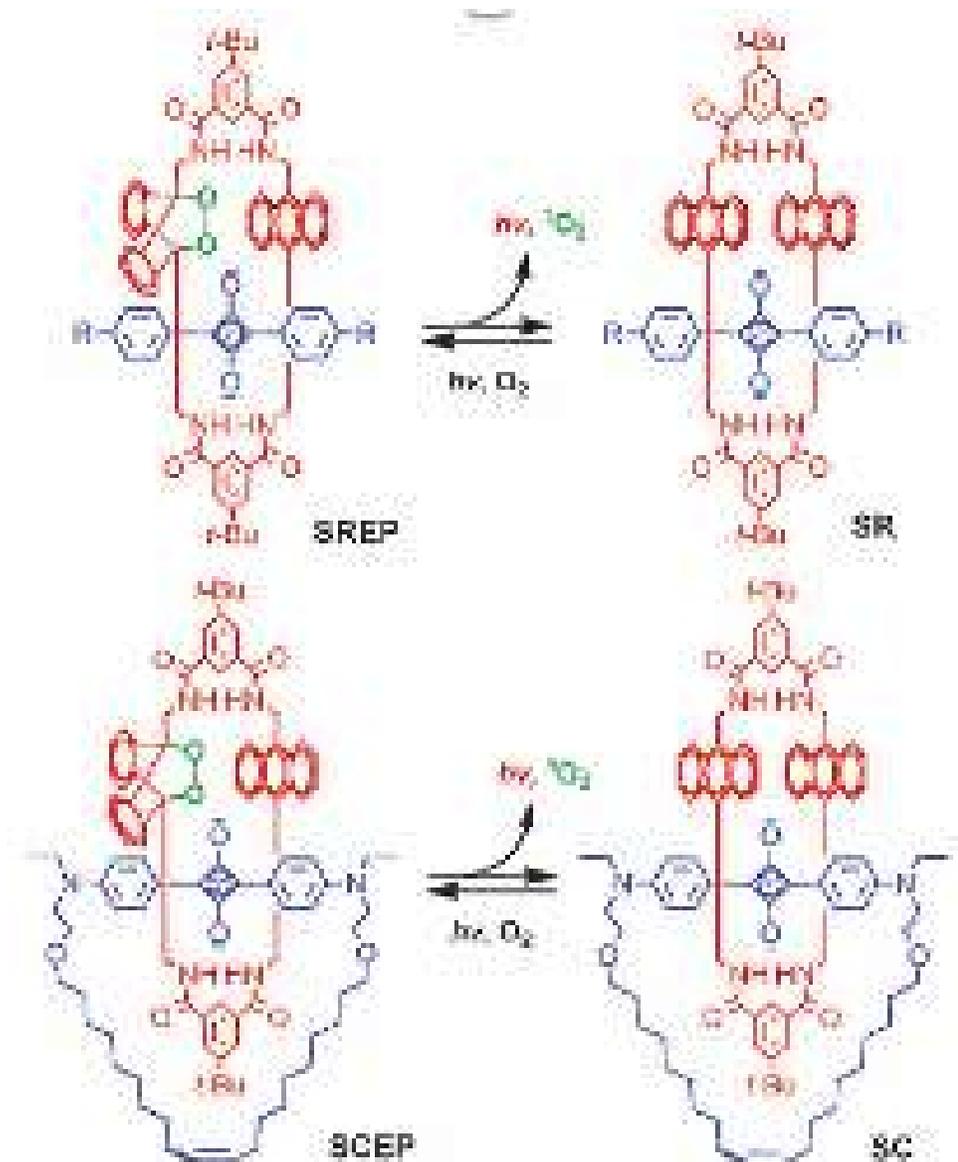
- Utilizzano piccole particelle polimeriche che incorporano coloranti sintetici (chiamati CLF) e sono contemporaneamente Chemiluminescenti e Fluorescenti (a differenza delle nanoparticelle inorganiche con luminescenza permanente).
- La Chemiluminescenza dei coloranti CLF è attivata termicamente (cioè non è necessario alcun stimolo chimico o elettrico). Possono essere quindi conservati a temperature basse e diventano autoilluminanti solo se la temperatura è bassa.
- Questo studio mette a confronto due tipi di coloranti CLF correlati: lo Squaraine Rotaxane Endoperoxide (SREP) e lo Squaraine Catenane Endoperoxide (SCEP).

Imaging Ottico Planare (CLF)

Due tipo di coloranti CLF correlati:

- Squaraine Rotaxane Endoperoxide (SREP)
- Squaraine Catenane Endoperoxide (SCEP)

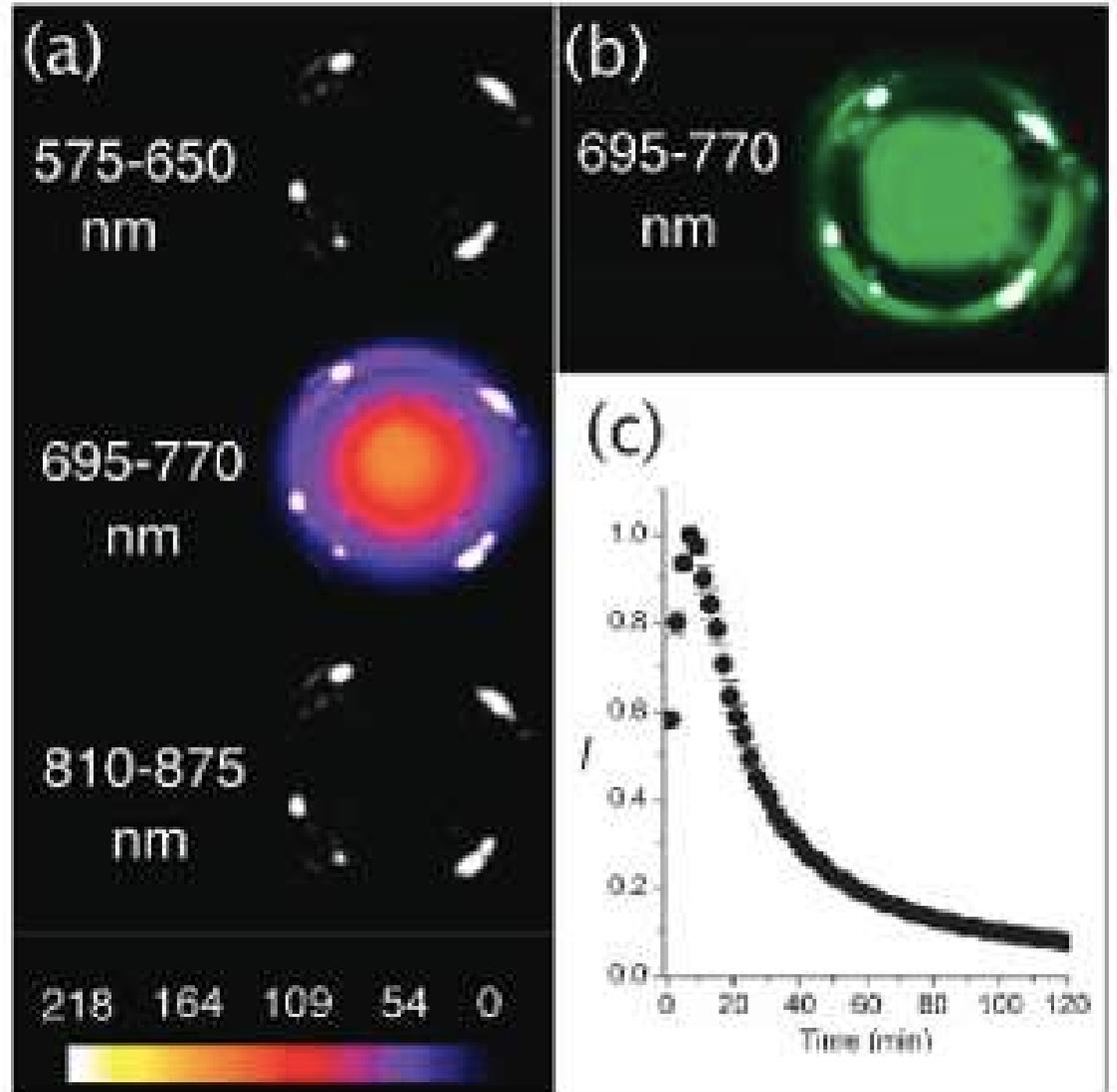
J. M. Baumes, J. J. Gassensmith, J. Giblin, J. J. Lee, A. G. White, W. J. Culligan, W. M. Leevy, M. Kuno and B. D. Smith, Nat. Chem., 2010, 2, 1025.



Mappa di intensità dei pixel di Chemiluminescenza di una fiala e profilo di decadimento

- Fiala a 38°C contenente una dispersione acquosa di nanoparticelle di SCEP, che emette solo nel canale 695-770nm.
- La stessa fiala ha emesso forte fluorescenza nel canale 695-770 nm.
- Profilo di decadimento della chemiluminescenza della fiala.

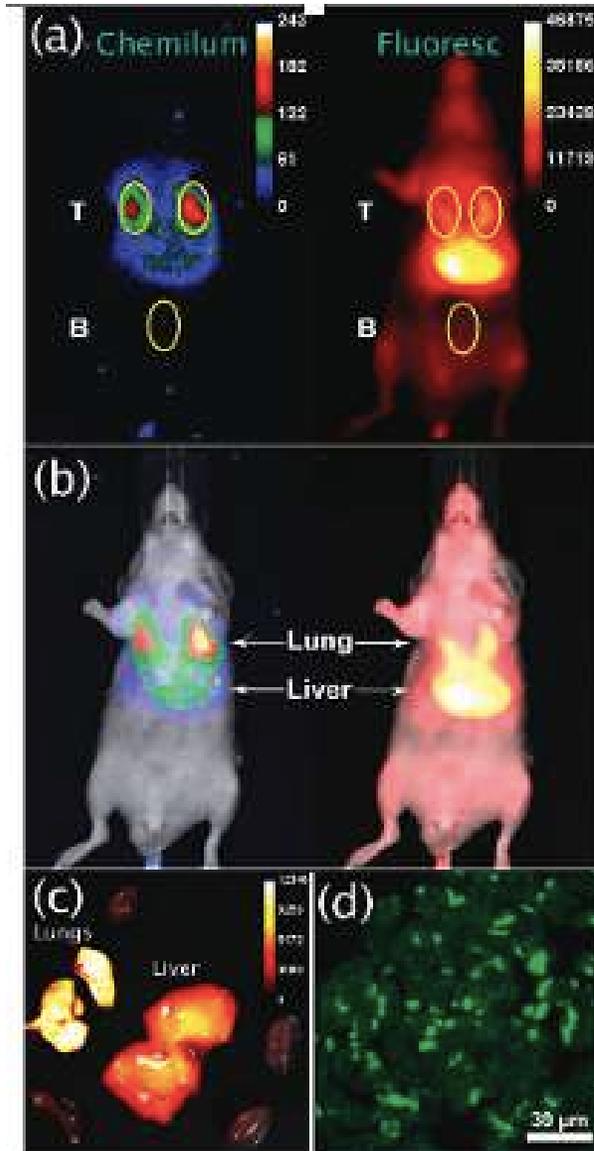
(decadimento radiottivo esponenziale decrescente, dipende dai tempi di vita dei composti fotoluminescenti. Il grafico ci descrive l'intensità a partire dallo stato eccitato fino allo stato fondamentale, emettendo fotoni nel tempo).



Lee, J. J., White, A. G., Rice, D. R., & Smith, B. D. (2013). In vivo imaging using polymeric nanoparticles stained with near-infrared chemiluminescent and fluorescent squaraine catenane endoperoxide. *Chemical Communications*, 49(29), 3016-3018.

Imaging in vivo con la Chemiluminescenza

- Immagini di CL di intensità dei pixel di fluorescenza di SCEP nanoparticelle.
- Sovrapposizione con l'immagine dei segnali.
- Immagine a fluorescenza ex vivo di organi.
- Micrografia a fluorescenza (canale di emissione 695-770 nm) di sezione istologica polmonare.

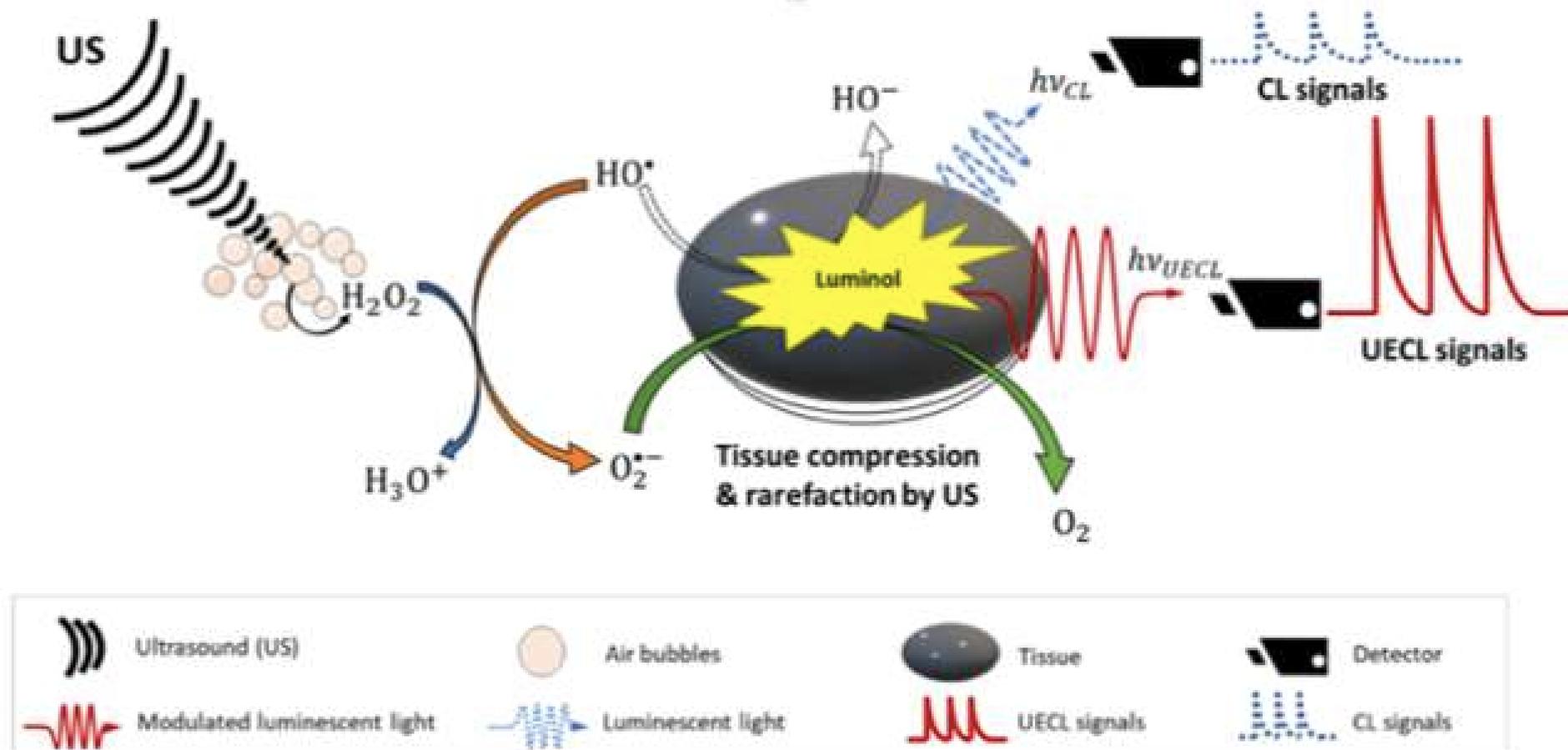


Lee, J. J., White, A. G., Rice, D. R., & Smith, B. D. (2013). In vivo imaging using polymeric nanoparticles stained with near-infrared chemiluminescent and fluorescent squaraine catenane endoperoxide. *Chemical Communications*, 49(29), 3016-3018.

Miglioramento dei segnali di CL mediante Ultrasuoni

Schema del meccanismo dell'effetto degli Ultrasuoni sui segnali Chemiluminescenti

Le, D., Dhamecha, D., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2020). Ultrasound-enhanced chemiluminescence for bioimaging. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 25.

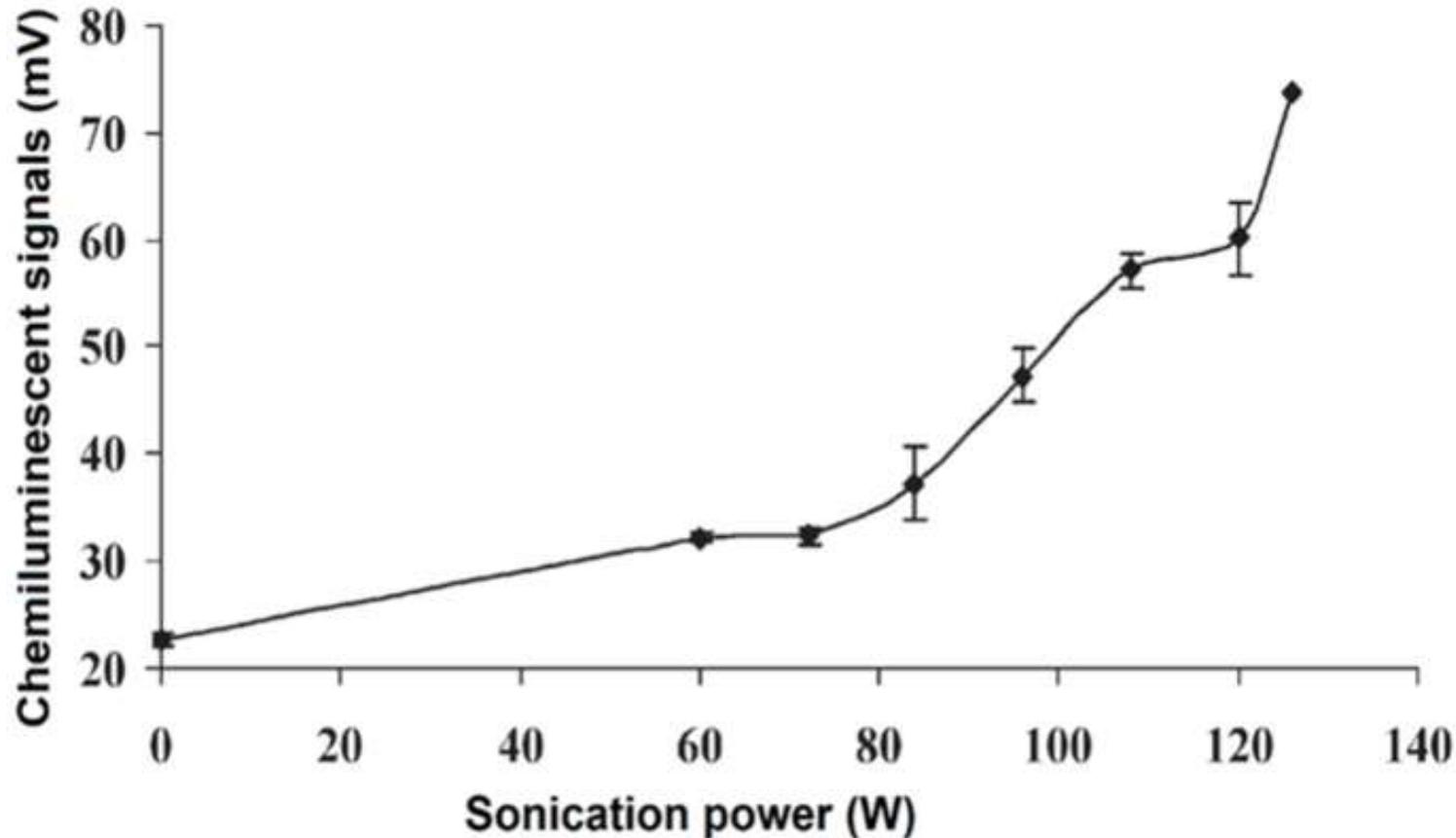


Miglioramento della sensibilità di CL tramite la Potenza

- Meccanismo in cui gli Ultrasuoni producono H_2O_2 che successivamente stabilizza i radicali liberi.



- L' $O_2^{\bullet-}$ stabilizzato reagisce con il luminolo e produce 2 segnali aumentati



Reazione supportata dal fatto che CL aumenta in Soluzioni Alcaline dove la reazione è accelerata verso destra e produce più $O_2^{\bullet-}$.

Greenway, G. M., Leelasattathkul, T., Liawruangrath, S., Wheatley, R. A., and Youngvises, N. (2006). Ultrasound-enhanced flow injection chemiluminescence for determination of hydrogen peroxide. *Analyst* 131

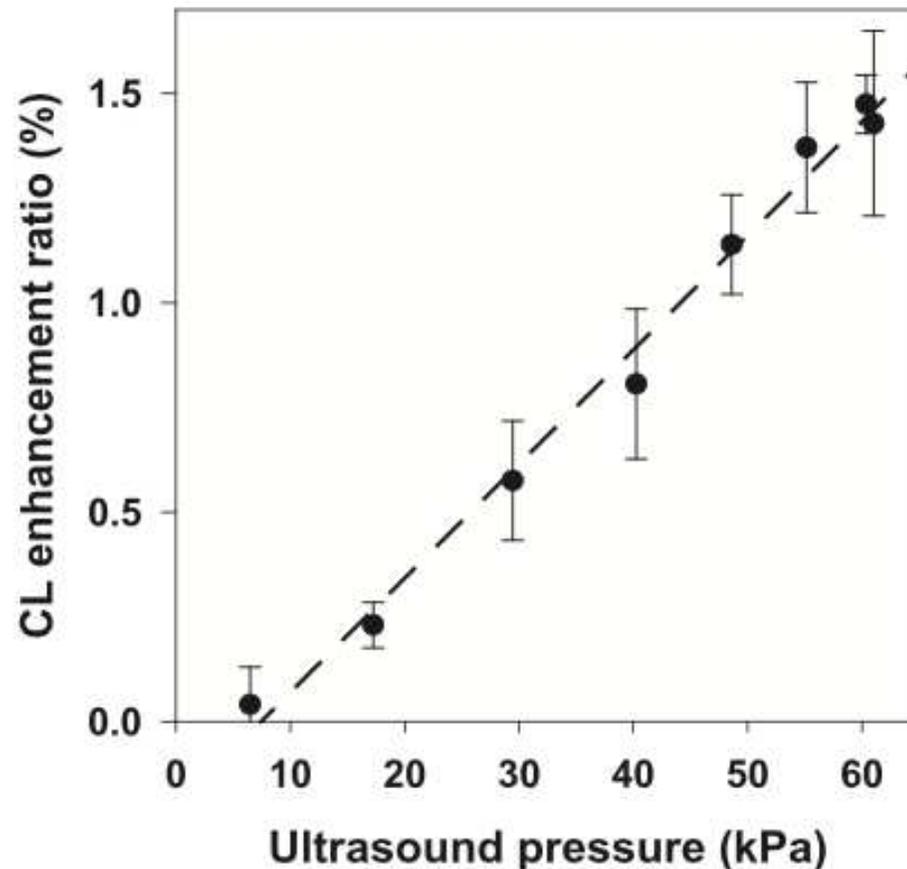
Miglioramento della sensibilità di CL tramite Ultrasuoni Focalizzati (FUS)

- i. La FUS è in grado di controllare la potenza e il punto focale, concretizzando così il potenziale degli US nel migliorare la sensibilità di CL.
- ii. Utilizzando un trasduttore da 1 MHz e creando una pressione di cavitazione di 0,42 MPa, si è rilevato come oggetti luminescenti a 7 mm di profondità con una sensibilità 10 volte superiore rispetto ai metodi luminescenti tradizionali.
- iii. Inoltre l'applicazione di microbolle, agenti sui contrasti FUS, porta a migliorare la sensibilità di CL.

Imaging Ottiche con US in mezzi di diffusione densi, mettendo a confronto CL base e FUS.

Masaki Kobayashi, Naoto Kikuchi, Akihiro Sato;
Optical tomography of fluorophores in dense scattering media based on ultrasound-enhanced chemiluminescence (2016).

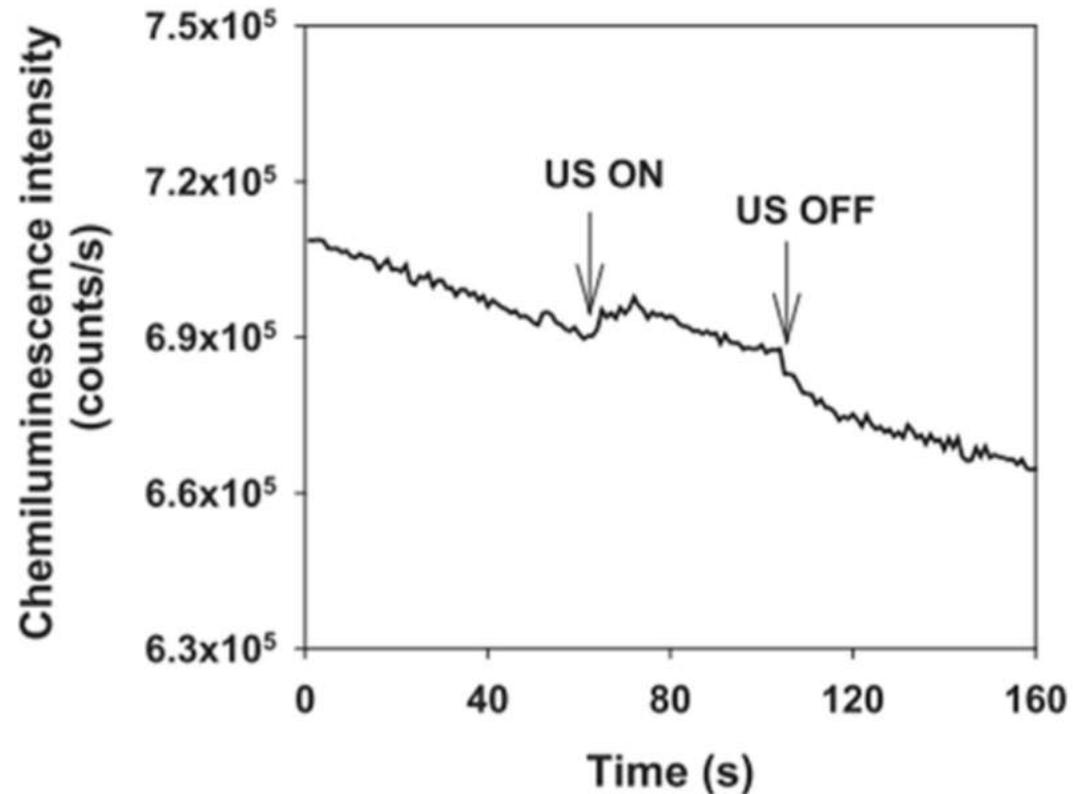
Mostra la reazione lineare tra pressione sonora e il rapporto di potenziato del CL. Dipendenza del rapporto di potenziato del CL dalla pressione sonora applicata.



Imaging Ottiche con US in mezzi di diffusione densi, mettendo a confronto CL base e FUS.

Masaki Kobayashi, Naoto Kikuchi, Akihiro Sato;
Optical tomography of fluorophores in dense scattering media based on ultrasound-enhanced chemiluminescence (2016).

- Mostra l'aumento di CL indotto dagli FUS puntati al centro dell'oggetto. L'Andamento Temporale dell'Intensità di CL mostra un lento decadimento.



Conclusioni

Dall'analisi comparativa emerge:

- Imaging di Chemiluminescenza forniscono un feedback in situ al fine di visualizzare accuratamente il tessuto di interesse. Perciò di valutare il grado della malattia e quindi fornire trattamenti opportuni.
- Tramite l'utilizzo di Ultrasuoni focalizzanti (FUS), creano una compressione e rarefazione periodica dei tessuti, che ne modifica gli indici di rifrazione a livello locale e consente un minor assorbimento e dispersione ottica. Osservando poi un miglioramento della sensibilità di CL e aumentando l'intensità di CL.

Bibliografia

- Rassa. S, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Biochimica Clinica, Università di Firenze, Laboratorio di Endocrinologia, USL 10/D.
- Fereja, T. H., Hymete, A., & Gunasekaran, T. (2013). A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on pharmaceutical analysis. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Fereja, T. H., Hymete, A., & Gunasekaran, T. (2013). A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on pharmaceutical analysis. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

Bibliografia

- Cabello, M. C., Bartoloni, F. H., Bastos, E. L., & Baader, W. J. (2023). The Molecular Basis of Organic Chemiluminescence. *Biosensors*, *13*(4), 452.
- Lee, J. J., White, A. G., Rice, D. R., & Smith, B. D. (2013). In vivo imaging using polymeric nanoparticles stained with near-infrared chemiluminescent and fluorescent squaraine catenane endoperoxide. *Chemical Communications*, *49*(29), 3016-3018.
- Le, D., Dhamecha, D., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2020). Ultrasound-enhanced chemiluminescence for bioimaging. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 25.

The background of the slide is a microscopic image of cells. The cells are stained blue, and their nuclei are stained red. The cells are arranged in a somewhat regular pattern, with some cells appearing to be in the process of dividing or budding. The overall appearance is that of a dense population of cells, possibly from a tissue sample or a culture.

Grazie per l'attenzione!
