



## Diffusione di nanoparticelle nel corpo umano - modello



I materiali di NANOLAB, inclusa la presente scheda, sono proprietà degli autori di NANOLAB ([www.nanolab.unimore.it](http://www.nanolab.unimore.it)) e distribuiti con [licenza](#) Creative Commons 3.0 **Versione: 26/09/2012**

Attualmente le nanoparticelle d'oro trovano ampio uso in medicina, in particolare in una serie di terapie anticancro. Si va dal loro utilizzo come vettori per il trasporto ed il rilascio mirato di farmaci all'uso di nanoparticelle dotate di particolari geometrie con picco di frequenza risonante nell'infrarosso per una terapia fototermica che bruci le cellule malate lasciando intatte quelle sane. Risultati simili si ottengono anche con l'eccitazione in radiofrequenza.

Comprendere il meccanismo e le modalità di diffusione delle nanoparticelle attraverso i tessuti del corpo umano risulta quindi di primaria importanza. La gelatina è una sostanza polimerica organica con proprietà molto simili alla matrice extracellulare connettiva nel tessuto tumorale ed è pertanto un buon modello da investigare. In questa attività studierete la modalità di diffusione di diversi coloranti alimentari in modo da dimostrare l'effetto del peso molecolare nel trasporto dei farmaci all'interno del tessuto tumorale.

### Materiale occorrente

N.B Poiché l'attività si articola in varie fasi, i materiali necessari a ciascuna saranno indicati di seguito al titolo della sezione.

### Procedimento

#### *Preparazione della gelatina*

- Gelatina alimentare (buste da 12 g)\*
- Recipiente in cui ammollare la gelatina
- Fornello
- Acqua
- Becher
- Teglia antiaderente

N.B. La gelatina va preparata parecchie ore in anticipo (circa 12) perchè prima di tagliare i dischi deve essersi perfettamente raffreddata.

1. Scegliete una teglia antiaderente di dimensioni tali da ottenere un numero di dischi sufficiente: ne servono 4 per ciascun gruppo. Ricordate che ci deve essere un po' di spazio tra un disco e l'altro per facilitare le operazioni di taglio.



2. Valutate la quantità d'acqua da versare nella teglia per ottenere un'altezza uniforme di circa 1 cm e riempite il becher con tale quantità.
4. Dissolvete la gelatina ad almeno doppia concentrazione rispetto a quella indicata sulla confezione (minimo 2 buste per ogni 0,5L d'acqua).
5. Scaldate l'acqua per sciogliere la gelatina secondo le istruzioni della confezione, ma non fatela bollire (è più facile che si formino bolle d'aria ed imperfezioni).
6. Versate la gelatina nella teglia e lasciate raffreddare completamente, meglio se in frigo.

### Preparazione dei dischi di gelatina

- 4 piatti di Petri con coperchio
- Tagliabiscotti
- Fogli bianchi
- Spatola
- Teglia antiaderente
- Nastro adesivo

1. Prendete un taglia biscotti circolare (50/60 cm di diametro: deve essere circa 1 cm minore rispetto al diametro dei piatti di Petri) e tagliate la gelatina ricavando il maggior numero possibile di dischi. Il taglio deve essere netto in modo che i dischi risultino integri e senza frastagliature o graffi su entrambe le facce e sulla superficie laterale. **Questo è un punto molto importante per il successo dell'esperimento in quanto garantisce un assorbimento uniforme del colorante.** Assicuratevi di lasciare un po' di spazio tra i dischi. Affondate il taglia biscotti perpendicolarmente fino al fondo della teglia e ruotate lentamente avanti e indietro in modo che i bordi vengano completamente tagliati.
2. Usando uno strumento piatto e flessibile (tipo la spatola per glassare le torte), rimuovete con attenzione la gelatina attorno al disco. Molto lentamente fate scivolare la spatola sotto al disco e staccatelo dalla teglia.
3. Poiché durante l'operazione precedente il fondo del disco potrebbe danneggiarsi è importante mettere la sua superficie superiore (perfettamente liscia ed uniforme) a contatto col fondo del piatto di Petri a cui deve risultare perfettamente aderente. Cercate di centrare il disco sul piatto di Petri senza deformarlo: deve rimanere il più possibile circolare in modo da garantire le massime condizioni di simmetria al fenomeno di diffusione.
4. E' consigliabile appoggiare i piatti di Petri coi dischi di gelatina su fogli bianchi in modo che il fenomeno della diffusione risulti più evidente grazie al contrasto. Fissate i fogli al tavolo con nastro adesivo.



### Preparazione della soluzione colorata ed applicazione ai dischi di gelatina

- 4 siringhe (10 ml)
- Righello
- Fotocamera digitale
- Programma di elaborazione e analisi immagini digitali<sup>1</sup>
- Colorante alimentare blu rosso e giallo
- Bicchieri di carta
- Treppiede da fornello bunsen
- Computer

1. Sciogliete il rosso, blu e giallo nell'acqua, usando un contenitore diverso per ciascun colore. Dovete ottenere una soluzione dal colore intenso ma ancora trasparente. Il giallo ed il rosso dovrebbero essere piuttosto concentrati, tendono infatti a sbiadire nella gelatina.
2. Usando una siringa pulita da 10 mL iniettate la soluzione colorata, un colore per ciascun piatto di Petri nella regione che circonda il disco. Non dirigete il getto verso la gelatina, ed evitate accuratamente di mettere colorante sopra o sotto il disco. Annotate la quantità di liquido colorato utilizzata. Usate lo stesso volume per ogni soluzione colorata. Il volume iniziale non dovrebbe superare i  $\frac{3}{4}$  dell'altezza del disco di gelatina.
3. Usando il quarto piatto di Petri, iniettate un uguale volume di rosso e di giallo (il volume di ciascuna soluzione dovrebbe essere il 50% del passo 2).

**MOLTO IMPORTANTE:** durante tutto il periodo di acquisizione dati (circa una settimana) i piatti non vanno assolutamente più mossi o spostati, neanche per fotografarli meglio. Trovate perciò un posto del laboratorio idoneo e tranquillo dove nessuno li tocchi.

### Raccolta dati

1. Due volte al giorno (ad es. alle 8:00 ed alle 16:00) prendete le foto di ciascun campione. Togliete il coperchio per fotografare (così da evitare riflessi) e successivamente ricopritelo in modo da evitare contaminazioni.
2. Per non deformare l'immagine del disco, prendete le foto dall'alto, sempre alla stessa distanza, mantenendo la fotocamera parallela alla superficie della gelatina. Potete un treppiede da fornello bunsen appoggiandovi sopra la macchina fotografica. Cercate di centrare perfettamente il disco di gelatina.

---

<sup>1</sup> Tracker [www.cabrillo.edu/~dbrown/tracker/](http://www.cabrillo.edu/~dbrown/tracker/) o ImageJ <http://imagej.en.softonic.com/> con tutorial al [http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:beginner\\_help:imagej\\_beginner\\_s\\_tutorial](http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:beginner_help:imagej_beginner_s_tutorial)



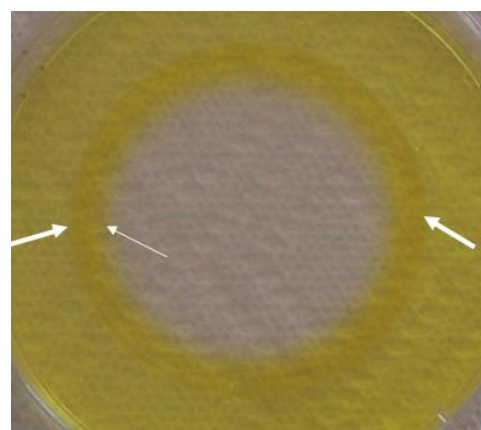
3. Inserite data e ora nella foto o usando l'apposita impostazione della macchina o inserendo in ogni foto un biglietto. Numerate i file quando li salvate.

### Analisi dati.

Potete lavorare con carta e righello ma il consiglio è di utilizzare un software per l'analisi e l'elaborazione digitale delle immagini. In rete se ne trovano vari liberamente scaricabili<sup>2</sup> Questo modo di procedere è molto simile a quello effettivamente utilizzato dai ricercatori che non potendo effettuare misure dirette alla nanoscala si basano sulle immagini raccolte ad esempio con i microscopi elettronici.

1. Misurate la distanza (mm) penetrata dal colorante in ciascun disco di gelatina (vedi anello segnalato in figura dalle due frecce) e registrate tale risultato in una TABELLA.

N.B. I bordi del disco di gelatina ed il fronte di diffusione non saranno sempre visibili nitidamente ma appariranno piuttosto un po' sfocati ad entrambe le estremità. Effettuate la misura dal centro di ciascuna regione sfocata.



2. Se la forma del disco o degli anelli di diffusione non sono perfettamente circolari, valutate le distanze tramite media (ripetete più volte le misure scegliendo direzioni diametrali diverse dello stesso campione).

Distanza D percorsa dal colorante che diffonde nella gelatina (mm)	Giorno 1		Giorno 2		Giorno 3		Giorno 4		.....	
	8.00	16.00	8.00	16.00	8.00	16.00	...	...	....	....
Rosso										
Giallo										
Rosso dell'arancione										
Giallo										



dell'arancione					
Blu					

- Fate un grafico della distanza D (mm) in funzione del tempo (h) per tutti e quattro i dischi riportandoli nello stesso piano cartesiano. Per facilitare la lettura rappresentate in colore diverso i punti sperimentali corrispondenti alle varie tinte.
- Inserite la linea di tendenza per ciascun gruppo di dati. Calcolate la pendenza di ciascuna retta così ottenuta: essa rappresenta la velocità di diffusione.
- Per l'ultimo dato D raccolto e per ciascun colore, calcolate la percentuale media di diffusione :  $D \text{ (mm)} / R \text{ (mm)} \times 100 = \%$  dove D = distanza totale media percorsa dalla particella di colorante ed R= raggio del disco di gelatina.

*Spunti per la discussione*

- Quale è la velocità oraria media di diffusione? .....
- Provate a stimare il tempo necessario perché il colorante diffonda rispettivamente 3 cm- 15cm -50 cm  
.....  
.....
- Per il colorante arancione vi è stato suggerito (vedi tabella) di valutare separatamente i tratti percorsi dalle due componenti (giallo e rosso). Cosa notate?  
.....  
.....  
.....
- Le proprietà fisiche dei coloranti (e dei farmaci) influenzano la velocità di diffusione, in particolare qui sono analizzate le dimensioni delle molecole di colorante. Quali altre grandezze incidono sul fenomeno della diffusione? Come potreste studiare la loro influenza sul fenomeno della diffusione? Proponete esperimenti.  
.....  
.....  
.....



### Ulteriori indagini di laboratorio

- a) Considerate i parametri suggeriti alla lettera d) del punto precedente e svolgete la sperimentazione per lo studio di almeno uno di essi.
- b) Avete fin qui studiato un modello di diffusione di nanoparticelle nei tessuti (solido); può essere interessante approfondire l'argomento considerando poi la diffusione di nanoparticelle nel sangue (liquido). In 4 bicchieri trasparenti contenenti stesse quantità di acqua ponete alcune gocce (stesso numero!) dei diversi coloranti e filmate quanto accade. Servendovi poi del software di analisi video Tracker individuate lo spazio percorso al variare del tempo e la velocità di diffusione. Provate a ripetere l'esperimento anche con un solo colorante variando la temperatura. Annotate le vostre osservazioni.

**Crediti:** Questa esercitazione è stata parzialmente adattata dall'esperimento " *Diffusion of Food Coloring Through Gelatin Lab: A Model for Diffusion of Nanoscale Particles Through Cells*"  
<http://umask12.net/nano/>