

Punti quantici le prospettive nel biomedicale

I quantum dots sono particelle di materiali semiconduttori, di solito metalli pesanti, che grazie alle dimensioni nanometriche sfruttano il comportamento quantistico per dar luogo a particolari processi di assorbimento ed emissione della luce. Ampiamente usati in campo diagnostico e nei bioassay, l'elevata tossicità dei core metallici ne limita ancora l'uso quali vettori in campo farmaceutico. Ne parliamo con Roberto Piazza, docente di Fisica Statistica al Politecnico di Milano



I punti quantici, meglio conosciuti come *quantum dots* o *qdots*, sono nanoparticelle di materiali semiconduttori (di solito metalli e loro leghe) che possono trovare vari tipi di applicazione grazie a proprietà nettamente diverse rispetto alle normali sostanze. Come dice il nome, infatti, le dimensioni estremamente piccole (tipicamente nel *range* di 1-10 nm) permettono di sfruttare le proprietà quantistiche di questi nanomateriali, proprietà che vengono invece perse quando si ha a che fare con quantità più elevate, per quanto su scala microscopica, di materia. La fisica alla base di queste nanoparticelle ha fatto passi da gigante negli ultimi anni, racconta **Roberto Piazza**, docente di Fisica Statistica presso il Politecnico di Milano. «Lo sviluppo è stato impressionante: rispetto a una decina di anni fa i *quantum dots* sono molto migliorati e si trovano oggi anche a livello commerciale. Per quanto riguarda le loro possibili applicazioni in campo biomedico, il problema delle nanotecnologie è sempre quello di fare i conti con la biologia, specialmente quando le nanoparticelle contengono sostanze difficilmente biocompatibili come in questo caso. La mia percezione generale è che spesso le affermazioni piuttosto pretenziose che vengono fatte si realizzino in realtà in maniera molto ridotta. Spesso c'è "molto rumore per nulla", nel senso che solo una frazione veramente molto limitata di tutti gli annunci sui possibili utilizzi di nanoparticelle porta a un concreto trasferimento tecnologico e produttivo. Lo sforzo, anche economico, è per ora parecchio sproporzionato rispetto ai risultati».

L'universo quantistico degli eccitoni

Riassumere in poche parole la grande varietà di possibili materiali e metodi per la realizzazione dei *quantum dots* non è cosa facile. Come spesso accade, le applicazioni in campo farmaceutico giungono per ultime, vista la complessità del settore sul piano regolatorio e la richiesta di un'attenta valutazione delle nuove entità chimiche sul piano tossicologico. «Nella farmaceutica c'è ancora parecchio da imparare rispetto a quanto fatto, ad esempio, nella cosmetica, dove ormai c'è un alto livello di sofisticazione nell'uso di quelli che si chiamano

"materiali sovramolecolari", quali liposomi, micelle, emulsioni, nanoemulsioni, copolimeri a blocchi. Anche se vengono spesso fatte rientrare nell'ambito delle nanotecnologie, con questo termine ci si riferisce piuttosto a nanoparticelle solide che vengono funzionalizzate», sottolinea l'esperto. Ai materiali sovramolecolari appartengono, ad esempio, le particelle Janus, che insieme ai *quantum dots* rappresentano in una certa misura esempi paradigmatici dei vantaggi e dei limiti applicativi di questi nuovi tipi di tecnologia. I *quantum dots*, insieme ai *quantum wires*, sono già da tempo sotto la lente dei fisici interessati alle proprietà peculiari degli oggetti molto piccoli e confinati. «Quando sono confinati in tutte le dimensioni, dal punto di vista della fisica questi nanomateriali diventano molto simili a un punto, da cui deriva il nome *quantum dots*» spiega Piazza. «Le proprietà, per esempio quelle ottiche, dal punto di vista della meccanica quantistica cambiano drasticamente quando le dimensioni delle particelle diventano molto piccole». L'esempio più tipico di punti quantici è quello dei materiali semiconduttori, le cui proprietà di assorbimento ed emissione della luce dipendono dal *gap* di energia tra la banda di valenza in cui si trovano gli elettroni e la banda di conduzione a energia superiore dove vengono fatti saltare per eccitazione con luce di opportuna lunghezza d'onda. Questo trasferimento dell'elettrone lascia una "buca" nella banda di valenza. «La coppia elettrone-buca dopo un po' si ricombina, dando luogo alla produzione di fotoluminescenza, o più in generale di fluorescenza. L'elettrone ha una carica negativa, mentre la buca può essere assimilata a una carica positiva: la coppia può essere equiparata a un atomo di idrogeno, con la differenza che mentre in quest'ultimo il nucleo (il protone) è un oggetto pesante, in questo caso dal punto di vista quantistico la buca ha la stessa massa o quasi dell'elettrone. È come se i due eseguissero una specie di piccola orbita uno attorno all'altro», spiega Roberto Piazza.

Questo "pseudo-atomo" in cui la carica positiva (buca) e quella negativa (elettrone) interagiscono mediante la forza elettrostatica di Coulomb è chiamato "eccitone", e come per tutte le particelle

la sua orbita è caratterizzata da un dato valore del raggio di Bohr. «Quando la dimensione del semiconduttore diventa così piccola da poter essere confrontabile con qualche multiplo del raggio di Bohr dell'eccitone si manifestano le proprietà quantistiche tipiche dei *qdots*. In qualche modo cercando di confinare l'elettrone e la buca in una regione di spazio più piccola di quella in cui vorrebbero stare, corrispondente a quella del raggio della loro orbita comune. Ciò provoca variazioni impressionanti delle proprietà ottiche», spiega il fisico del Politecnico di Milano.

Il confinamento quantico e l'emissione di luce

Questo "confinamento quantico" deriva dal fatto che il diametro delle nanoparticelle è dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d'onda degli elettroni: ne risulta che questi ultimi rimangono imprigionati in una porzione limitata dello spazio. Quando l'energia della coppia elettrone-buca aumenta, in particolare, lo stesso fa anche il *gap* del semiconduttore, e di conseguenza la radiazione necessaria per eccitarlo deve avere frequenza più

elevata e lunghezza d'onda più corta. Il risultato visibile di questa eccitazione degli elettroni dello strato di valenza è l'emissione di luce, che assume anch'essa lunghezze d'onda più corte. «La prima conseguenza è che la luce emessa per fluorescenza da questa piccola particella colloidale dipende dalla dimensione. Parliamo di grandezze al massimo di una decina di nanometri, ossia qualche raggio di Bohr», aggiunge Roberto Piazza. Le nanoparticelle più grandi emettono luce di colore rosso, mentre scendendo con le dimensioni si passa al verde e al blu, per arrivare fino all'ultravioletto.

«Sono oggetti bellissimi, caratterizzati da colori che cambiano completamente a seconda della dimensione delle particelle, e che oggi per fortuna sono qualcosa che si produce in maniera abbastanza controllabile», aggiunge l'esperto. Il secondo vantaggio offerto dai *qdots* è un coefficiente di assorbimento della luce estremamente elevato, che fa sì che siano in grado di catturare la luce usata per eccitare la coppia elettrone-buca e poi riemetterla con grande efficienza. In termini generali, una diminuzione delle dimensioni dei punti quantici corrisponde a un aumento della distanza tra le bande di emissione.

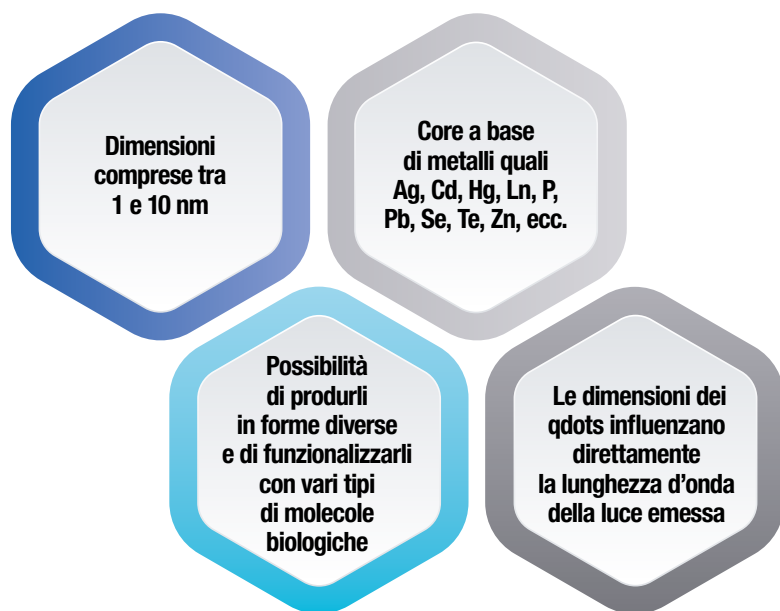
«Le piccole dimensioni delle particelle proteggono anche la coppia buca-elettrone - spiega Roberto Piazza. - Nel caso di un normale materiale semiconduttore, l'efficienza in fluorescenza di solito è abbastanza ridotta e non tutta l'energia che riceve viene riemessa, molta si disperde come calore. Se la coppia elettrone-buca è in qualche modo protetta, invece, l'efficienza di emissione aumenta enormemente. Sono oggetti estremamente brillanti».

Una preparazione complessa

In letteratura sono descritti diversi metodi per la preparazione dei *quantum dots*, da quelli chimici che richiedono condizioni spesso estreme e impiego di solventi tossici, a metodiche biotecnologiche più blande che offrono anche il vantaggio di una migliore biostabilità e biocompatibilità delle nanoparticelle e permettono la generazione diretta del metallo ridotto e funzionalizzato.

I precursori di sintesi possono essere ottimizzati

Principali caratteristiche e proprietà dei qdots



per esprimere specifiche biomolecole in grado di regolare la crescita, le dimensioni e l'emissione fluorescente dei punti quantici. Un grande impulso allo sviluppo di questo tipo di metodologie è venuto anche dal parallelo avanzare delle tecniche di microfluidica, che hanno permesso di risolvere molti problemi legati alla stabilità dei colloidali in soluzione *bulk* o all'immobilizzazione dei punti quantici su supporti solidi.

«Nella preparazione non entrano solo i *quantum dots* veri e propri, conta molto anche ciò che gli sta attorno. La sintesi colloidale di questi materiali non è banale; la particella nuda ha un tempo di vita molto breve, viene rapidamente distrutta dall'interazione col solvente, che cambia le caratteristiche del semiconduttore. Il primo grande passo avanti è stato quello di proteggere il cuore della particella con un composto solido affine a quello del semiconduttore, ma "inerte" e non assorbente», spiega Roberto Piazza.

La protezione del cuore attivo sfrutta in generale un materiale inorganico dello spessore di pochi nanometri, a cui si aggiunge poi un terzo strato più esterno di tipo colloidale per permettere la solubilità nel solvente (Figura 1).

Quest'ultimo passaggio è spesso ottenuto tramite funzionalizzazione con specifici leganti, che possono anche servire per l'interazione mirata con le molecole target. «La sintesi con tecniche tipiche della chimica dei colloidali è l'aspetto più importante della preparazione, perché ha una resa elevata e consente lo *scaling up* della produzione. Ciò non è possibile con altre tecniche di preparazione, come l'impianto con plasmi freddi o altre tecniche tipiche delle nanotecnologie, che possono produrre quantità molto più limitate.

Queste tecniche non sono adatte a produzioni industriali, mentre le tecniche colloidali funzionano bene, anche se resta ancora da chiarire qualche aspetto un po' strano. I *qdots* così ottenuti, ad esempio, emettono luce ma ogni tanto "lampeggiano", ossia si spengono e si riaccendono senza alcun motivo apparente. Si è già trovato il modo per correggere questa instabilità di emissione, ma non si è ancora capito del tutto perché avvenga», racconta l'esperto del Politecnico.

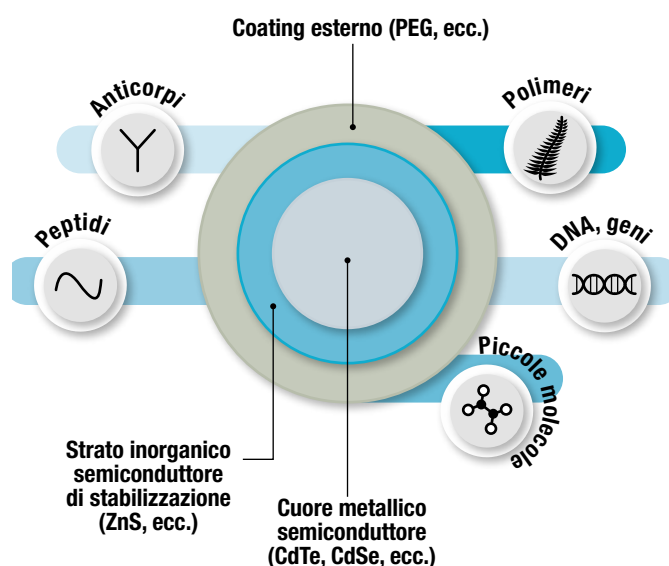


Figura 1
Struttura generale di un *quantum dot*

UNA GRANDE QUANTITÀ DI INFORMAZIONI

Una delle principali caratteristiche dei *quantum dots* è la grande quantità di informazioni che possono essere trasportate da una singola nanoparticella. Il funzionamento quantistico della stessa, infatti, fa sì che l'informazione sia codificata

in termini di *quantum bits*, potendo così assumere tutti i possibili valori intermedi tra 0 e 1, risultanti dalla combinazione dei diversi stati di eccitazione a cui può andare incontro il punto quantico, a differenza dei più tradizionali *chip* che utilizzano solo il codice binario 0-1.

Le applicazioni in campo diagnostico

I *quantum dots* hanno già trovato larga applicazione come biosensori, grazie ai vantaggi già visti, e permettono di ottenere spettri di assorbimento più ampi e spettri di emissione più stretti e modulabili. «I *qdots* sono oggetti molto interessanti per le applicazioni biomediche, e sono molto utilizzati, ad esempio per l'*imaging*. Funzionalizzando la particella con opportuni leganti diretti a un particolare target, come una proteina o un organello all'interno della cellula, si ottiene un'immagine di fluorescenza estremamente più vivace e intensa di quella che si potrebbe avere con qualunque altra sonda fluorescente», spiega Piazza. I punti quantici permettono anche la messa a punto di

Principali metodi di sintesi



(fonte: S. Jha et al., *Artificial Cells, Nanomed. and Biotechnol.*, doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1411932>)

sofisticata strategie di *binding assays* per identificare interazioni specifiche a livello cellulare.

Tra le possibilità in questo senso, una particolare rilevanza trova la tecnica di *Förster resonance energy transfer* (FRET), già ampiamente utilizzata in biofisica. «Se prendo un oggetto carico di energia fluorescente come il *quantum dot* e lo faccio avvicinare a un altro oggetto a una distanza molto piccola (1-2 nm), l'energia accumulata nella coppia elettrone-buca viene trasferita a quest'ultimo. Questa quantità di energia è spesso sufficiente a distruggere legami chimici, come ad esempio i ponti disolfuro in una proteina, o comunque a causare un danno specifico. La FRET è molto usata per indagare le caratteristiche strutturali delle proteine, ad esempio se due residui sono vicini tra loro. Attaccando una sonda FRET in un punto della proteina, infatti, quando è abbastanza vicina a un altro punto, si possono vedere cose che sarebbe impossibile osservare al microscopio elettronico. Quest'ultima tecnica permette d'indagare oggetti ormai secchi, o comunque fermi, mentre tramite la FRET e utilizzando un microscopio ottico posso rivelare se c'è un trasferimento di energia e mappare la struttura». Altri possibili utilizzi dei punti quantici includono la generazione di colori diversi nella bioanalisi in multiplex, e l'uso in test immunologici, di rilevazione di acidi nucleici o di marcatura e analisi cellulare. I *qdots* possono essere rilevati con una vasta gamma di tecnologie analitiche, quali ad esempio l'NMR, la spettroscopia

IR, UV e Raman, la diffrazione a raggi X, la spettrometria di massa e il *laser light scattering*, la microscopia elettronica, la calorimetria differenziale a scansione e la spettroscopia dielettrica. Uno studio del 2017, ad esempio, ha permesso di evidenziare *loci* genomici provirali singoli di sequenze del virus Hiv all'interno dei cromosomi nel nucleo di cellule vive, grazie a una tecnica di *imaging* che ha utilizzato *quantum dots* in parallelo a effettori "activator-like" della trascrizione (TALEs).

Le applicazioni in medicina

«Potremmo immaginare i *quantum dots* come una piccola batteria viaggiante che arrivi nel luogo desiderato e che, trasferendo in un sol colpo tutto il suo contenuto energetico, distrugga in modo selettivo le cellule tumorali, danneggiandone le funzioni vitali. Credo che questa sia una delle poche applicazioni strettamente farmacologiche, ma di altissimo livello, che si possono pensare per i *quantum dots*», sottolinea Roberto Piazza, che non nasconde tuttavia le sue perplessità su un possibile utilizzo su larga scala di queste tecnologie in medicina. Gli esempi in tal senso riportati in letteratura sono innumerevoli e mirati tutti allo sviluppo di strategie di *drug targeting* in cui i punti quantici possono venire utilizzati alla stregua di nanovettori per veicolare farmaci, geni o vaccini (rimandiamo i lettori interessanti alla bibliografia alla fine dell'articolo). Un singolo *qdot* può anche

I QDOTS SUPERANO LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA

L'obiettivo di mappare le connessioni cerebrali a livello di singole sinapsi è stato supportato sia dall'Unione europea che dal Governo americano fin dall'inizio del secondo decennio del nuovo secolo, con ingenti investimenti nei progetti Human Brain Project (54 milioni di euro nel 2013) e Brain Initiative (100 milioni di dollari), rispettivamente. Il processo di endocitosi mediata da

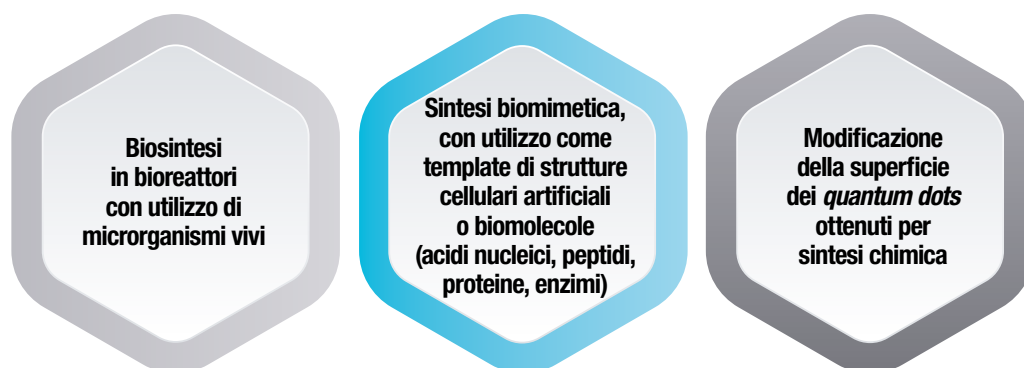
recettore dei *qdots* è stata sfruttato, ad esempio, per studiare i meccanismi di formazione della malattia di Parkinson a livello delle cellule cerebrali microglia. I punti quantici, infatti, sono in grado di superare la barriera emato-encefalica, e possono quindi essere utilizzati - mediante attivazione UV - per evidenziare le cellule coinvolte nel processo di degenerazione neuronale

e il loro comportamento a livello di attivazione infiammatoria, processo alla base della comparsa della malattia. Un ulteriore vantaggio dei *qdots* è offerto dalla loro sensibilità ai campi elettrici prossimali, che li rende adatti a monitorare i processi elettrici e le variazioni di voltaggio tipiche del funzionamento del cervello, sia a livello di singola cellula che del più esteso

legare molecole diverse, e potrebbe ottimizzare così la *delivery* di terapie di combinazione, ovvero accoppiando al farmaco una molecola diagnostica che permetta di monitorarne il rilascio e l'assorbimento al sito desiderato. «I *quantum dots* combinano aspetti di fisica quantistica molto avanzati con aspetti di carattere chimico-fisico; richiedono di saper sviluppare i leganti in maniera opportuna e di saper selezionare il modo con cui questi interagiscono con una particella, oltre che di ottimizzare la stabilità delle dispersioni. Il principale problema rispetto alle possibili applicazioni farmacologiche è che i *qdots* più comuni sono quasi tutti a base di metalli pesanti; l'esempio tipico è quello del selenuro di cadmio», spiega l'esperto. Una composizione che cozza con i

requisiti di sicurezza della somministrazione a cui devono sottostare tutti i medicinali, vista l'elevata tossicità di tutti i metalli pesanti per organi vitali quali fegato e reni. «Tutti i *qdots* di utilizzo più semplice e quelli che funzionano meglio non sono utilizzabili direttamente in applicazioni biologiche o farmacologiche. Questo è il principale collo di bottiglia: c'è un grosso sforzo per cercare di produrre semiconduttori che non contengano metalli pesanti e che abbiano le stesse caratteristiche di assorbimento del selenuro di cadmio o di semiconduttori simili», aggiunge Piazza. I punti quantici possono venire assorbiti dalle cellule mediante processi di endocitosi mediata da recettore. È stata anche studiata la possibilità di utilizzare, quale materiale per il loro ottenimento, il carbonio

Le possibili strategie di sintesi per applicazioni biomediche



(fonte: D.A. Granada-Ramirez et al., in: Nanobiomaterials, doi: 10.1016/B978-0-08-100716-7.00016-7)

network neuronale. La possibilità dei *quantum dots* di superare la barriera emato-encefalica è stata studiata anche rispetto alla possibilità di sviluppare modelli *in vitro* che simulino tale compartimento e che siano utilizzabili per lo studio di nuovi approcci al trattamento di malattie infiammatorie del cervello (come l'encefalopatia associata all'Hiv) limitando la necessità

di sperimentare su modelli animali. La tecnica del *single-particle tracking*, che permette di seguire i movimenti di una molecola/particella all'interno di un mezzo, è stata utilizzata per studiare il meccanismo dell'infezione da parte del virus dell'influenza, che sfrutta anch'esso il processo dell'endocitosi. Un altro studio ha invece utilizzato *qdots* a base di zinco funzionalizzati

con un siRNA per inibire la sintesi dell'enzima sfingomielinasi in cellule cerebrali, anch'esso potenzialmente coinvolto nella comparsa di malattie neurodegenerative. Dalla ricerca italiana arriva invece l'esempio delle micelle contenenti doxorubicina e *quantum dots* a base di Au-SiO₂, dal possibile utilizzo per il tumore della mammella.

o polimeri biocompatibili, che in determinate configurazioni possono venire drogati per diventare semiconduttori.

«Quello dei polimeri conduttori è un vecchio problema ancora aperto: non è facile ottenere qualcosa che sia anche biocompatibile. Il polimero di partenza lo è, ma le modifiche che si devono introdurre per renderlo parzialmente conduttivo non sono banali, e non è detto che lo sia anche il prodotto finale della trasformazione», spiega il fisico, che a questo riguardo ritiene particolarmente interessanti, quali materiali di partenza, i peptidi, piuttosto che i classici polimeri sintetici usati per la produzione di liposomi e micelle. «Un esempio riportato in letteratura utilizza peptidi molto corti, di pochi amminoacidi, che vengono fatti aggregare come una micella. I peptidi sono tra i materiali più interessanti per gli sviluppi futuri della materia "soffice", grazie alla ricchezza con cui si possono aggregare. La strada maestra è secondo me quella di cercare di utilizzare il più possibile materiali di origine biologica. La natura da miliardi di anni crea possibilità a cui s'ispira buona parte di quanto prodotto artificialmente. La vedo però come una strada ancora lunga. Entrando nel mondo di molecole quali i peptidi, le dimensioni iniziano a essere quelle d'interesse, pochi nanometri. Con le tecniche classiche di sintesi colloidale è però molto difficile produrre particelle molto piccole e tutte uguali», è il messaggio conclusivo di Roberto Piazza sul futuro dei *quantum dots* in medicina.

Riferimenti

1. C.H. Vannoy et al., *Sensors* 2011, 11, 9732-9763, doi:10.3390/s111009732
2. J. Landrigan et al., *NeuroToxicology*, 76, 2020, 153-161, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.11.007>
3. D.A. Granada-Ramírez et al., *Quantum dots for biomedical applications*, in: *Nanobiomaterials*, pp.411-436, 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-100716-7.00016-7
4. A.L. Efros et al., *Nature Nanotechnology*, 13, 278-288 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0107-1>
5. G. Xu et al., *Frontiers in Pharmacol.*, 2013, Vol. 4, Article 140, doi: 10.3389/fphar.2013.00140
6. Y. Ma et al., *Nat Commun* 8, 15318 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms15318>
7. T. Getz et al., *J. Neurochem.* (2016) 139, 872-885, doi: 10.1111/jnc.13841
8. A. Li Volsi et al., *Eur. Polymer J.*, 105, 2018, Pages 38-47, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.013>
9. K. Sai Krishna et al., *Adv. Drug Del. Rev.*, 65, 2013, 1470-1495, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.006>
10. M. Medina Sánchez et al., *Lab Chip*, 2012,12, 1932-1943, <https://doi.org/10.1039/C2LC40063D>
11. S.L. Liu et al., *ACS Nano* 2012, 6, 1, 141-150, <https://doi.org/10.1021/nn2031353>
12. A. Abbott, *Nature* 499, 272-274 (18 July 2013), doi:10.1038/499272a
13. S. Jha et al., *Artificial Cells, Nanomed. and Biotechnol.*, 2018, 46, S1, S57-S65, doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1411932>
14. M.A. Jahangir et al., *Pharm. Nanotechnol.*, 2019; 7, 234-245, doi: 10.2174/2211738507666190429113906
15. Y. Wang et al., *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5, 2786-99, doi: 10.1021/am302030a
16. S. Pleskova et al., *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1048:323-334. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8_19
17. P. Devi et al., *Biosens Bioelectron*, 2019, 141:111158, doi: 10.1016/j.bios.2019.02.059
18. D. Mo et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101, 2713-2733. doi: 10.1007/s00253-017-8140-9
19. Y.N. Utkin, *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 2018, 18, 193-205, doi:10.2174/1871524918666180813141512