

NANOTECNOLOGIE E NEFROLOGIA

D. Pisignano

NNL, National Nanotechnology Laboratory of CNR-INFM, Università degli Studi del Salento, c/o Distretto Tecnologico ISUFI, Lecce

Nanotechnology and nephrology

Nowadays, nanotechnology and microfluidic technologies are emerging as enabling factors for the operation of lab-on-chip devices and micro total analysis systems in the biotechnological and biomedical fields. These devices allow to reduce the waste of reagents and products, and to increase analytical precision and operational throughput. The field of nanotechnology is introduced in this paper and some manufacturing methods at the nanometer and micrometer scale are presented, together with their potential application in producing biomedical devices for filtration and solute elimination. Examples will include electron-beam lithography, soft lithography, and electrospinning of nanofiber scaffolds for tissue engineering. (*G Ital Nefrol* 2007; 24: (Suppl. S40) S80-6)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Microfluidic devices, Surface functionalization, Lab-on-chip, Soft lithography, Nanotechnology, Polymer nanofibers

PAROLE CHIAVE:

Dispositivi microfluidici, Funzionalizzazione di superfici, Lab-on-chip, Litografie soffici, Nanotecnologie, Nanofibre polimeriche

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Dario Pisignano
NNL, National Nanotechnology Laboratory of CNR-INFM
Università degli Studi del Salento
c/o Distretto Tecnologico ISUFI
Via Arnsano,
73100 Lecce
e-mail: dario.pisignano@unile.it

TECNOLOGIE NANOLITOGRAFICHE

La capacità di miniaturizzazione, ossia di realizzazione di oggetti di dimensioni estremamente ridotte da parte dell'uomo, ha oggi raggiunto livelli eccezionali. Nel corso dell'ultimo secolo si sono dapprima poste le basi tecnologiche per la microfabbricazione (realizzazione di elementi e dispositivi di dimensioni sulla scala di 1-100 micrometri). Si tratta di *building blocks* di dimensioni già ridotte rispetto alle scale tipiche della vita quotidiana, confrontabili con la sezione di un capello o con le dimensioni di un batterio o di un globulo rosso, che trovano applicazione in sistemi oggi di uso comune, come i microprocessori, i dispositivi micro-elettromeccanici e gli accelerometri. Con le svolte fondamentali determinate dall'invenzione del microscopio ad effetto tunnel a scansione (*Scanning Tunnelling Microscopy*, STM) nel 1982 (1) e del microscopio a forza atomica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) nel 1986 (2), della messa a punto delle nanoli-

tografie, come quella a fascio elettronico, e della formulazione della chimica supramolecolare (Premio Nobel a Cram, Lehn e Pedersen nel 1987), si è raggiunta la possibilità, che era stata teorizzata da R. Feynman nel suo celebre discorso "*There is plenty of room at the bottom*" al Congresso dell'*American Society of Physics* nel 1954 (3), di studiare a manipolare la materia sulla scala di pochi miliardesimi di metro. In pochi decenni dunque è stata raggiunta la capacità di realizzare oggetti di dimensioni confrontabili al diametro di una proteina globulare o di una molecola di DNA, o alla spaziatura interatomica tra atomi ordinati all'interno di un cristallo.

In particolare, le moderne tecniche di litografia consentono di ottenere risultati tali da poter essere applicate soddisfacentemente alla produzione di circuiti integrati in micro e optoelettronica. In questo ambito è prioritaria la possibilità di creare strutture planari di dimensioni lineari ridotte. Ad esso si riferisce la previsione, effettuata nel 1965 da *Gorden Moore*, fondato-

re della *Intel* e della *Fairchild Semiconductor*, secondo cui il numero di transistori in un circuito integrato di fabbricazione industriale sarebbe raddoppiato ogni diciotto mesi, il che equivale a dire che le dimensioni lineari dei circuiti all'interno dei chips sarebbero state dimezzate ogni tre anni (4). L'estrapolazione di tale tendenza di miniaturizzazione porterebbe al raggiungimento di una risoluzione, definita come la dimensione minima che si è in grado di trasferire sulla materia, in questo caso semiconduttori inorganici come il Silicio, di 22 nm entro il 2010.

È interessante notare come il processo di miniaturizzazione in microelettronica sia stato finora pressoché esclusivamente basato sul processo di litografia ottica, o fotolitografia. Il processo fotolitografico convenzionale permette di trasferire ad un film sottile di materiale polimerico (*photoresist*), che ricopre un substrato di materiale semiconduttore, un disegno geometrico presente su una fotomaschera, mediante esposizione del sistema substrato-fotomaschera a radiazione elettromagnetica di una determinata lunghezza d'onda e successivo trattamento chimico del *photoresist*. Come le altre litografie di tipo espositivo, dunque, il principio di funzionamento su cui si basa la litografia ottica è la diminuzione o l'aumento della solubilità del materiale polimerico quando esso viene esposto alla radiazione elettromagnetica. Nel caso in cui l'esposizione determini un incremento di solubilità, il disegno finale presente sul materiale presenterà delle sottoincisioni in corrispondenza dei dettagli della fotomaschera che hanno consentito il passaggio della luce. Si parla in questo caso di *resist* di tipo *positivo*. Nel caso opposto (*resist negativo*), l'esposizione determina il *cross-linking* delle molecole polimeriche, e dunque una diminuzione di solubilità delle aree irraggiate rispetto a quelle mascherate, con il risultato finale di zone in rilievo laddove i dettagli della fotomaschera hanno consentito il passaggio della luce. La risoluzione raggiungibile con tale processo, essendo soggetta alle limitazioni della diffrazione ottica, è proporzionale alla lunghezza d'onda (λ) della radiazione utilizzata, in accordo con l'equazione di Rayleigh (5):

$$R = \frac{C\lambda}{NA}$$

dove NA è l'apertura numerica del sistema di lenti usato per ridurre e proiettare il disegno della fotomaschera sul *photoresist* e C è una costante caratteristica di quest'ultimo.

Per portare al di sotto dei 100 nm le dimensioni delle strutture realizzabili mediante litografia ottica, quindi, è necessario disporre di radiazione elettromagnetica ad alta energia ($\lambda < 13$ nm) (6) e sviluppare apparati sperimentali complessi e costosi. Tali necessità, aggiunte all'utilizzo di soli substrati planari e di una ristretta

categoria di materiali da usare come *photoresist*, rappresentano i principali svantaggi della fotolitografia e impongono la ricerca di tecnologie alternative.

Come altro esempio di tecnologie litografiche espositive, merita senz'altro cenno la litografia a fascio elettronico (*Electron Beam Lithography*, EBL), che utilizza, invece della radiazione elettromagnetica, la deflessione controllata di un fascio di elettroni ad una opportuna energia per impressionare il *resist* in modo seriale, analogamente ad un processo di scrittura. La litografia a fascio elettronico è la metodologia che consente di raggiungere la risoluzione più alta (pochi nanometri) tra quelle più comunemente utilizzate. In Figura 1 sono rappresentate alcune strutture di dimensioni sub-micrometriche, che vengono solitamente fabbricate per applicazioni optoelettroniche quali dispositivi *laser* a stato solido ed ottiche diffrattive, ma che offrono interessanti possibilità anche per la realizzazione di superfici strutturate da integrare, ad esempio, in dispositivi microfluidici portatili. Tali superfici possono svolgere diverse funzioni, quali la filtrazione di soluti in virtù delle caratteristiche geometriche e del favorevole rapporto superficie/volume, o l'aumento o la diminuzione controllati della velocità di scorrimento di fluidi biologici all'interno di microcanali. La strutturazione di un materiale con dettagli di dimensioni inferiori ai 10 micrometri, infatti, consente di controllare la bagnabilità di una superficie da parte di un liquido, di realizzare superfici autopulenti, superidrofiliiche o superidrofobiche (si tratta del cosiddetto "effetto Loto" (7), ben noto in natura dove viene utilizzato da molte piante quali *Nelumbo Nucifera*, *Alocasia Macrorrhiza*, *Rosa Landora*, da Lepidotteri (8) e da *Rhinotermitidae* (9) per assicurare idrorepellenza). Grazie a tecnologie quali la litografia a fascio elettronico, oggi si è in grado di riprodurre con accuratezza l'effetto Loto su molti materiali, consentendo un controllo dell'interfaccia solido-liquido che è particolarmente importante nelle applicazioni biomedicali (in analisi genomica e proteomica, diagnostica, ingegneria tissutale e nefrologia) dove è necessaria particolare attenzione al grado di interazione tra liquidi e superfici artificiali al fine di ottenere la necessaria accuratezza analitica e diagnostica, o di prevenire aggregazioni indesiderate o adsorbimento dei soluti biologici nei pressi delle superfici stesse.

Anche per la litografia a fascio elettronico, come la fotolitografia, si pone comunque il problema della ristrettissima flessibilità chimica legata alla natura espositiva dei metodi di *patterning* convenzionali, la quale preclude ad esse l'impiego di una vastissima classe di materiali, che spazia dai semiconduttori organici alle molecole biologiche (proteine, enzimi, DNA, strutture supramolecolari quali le membrane

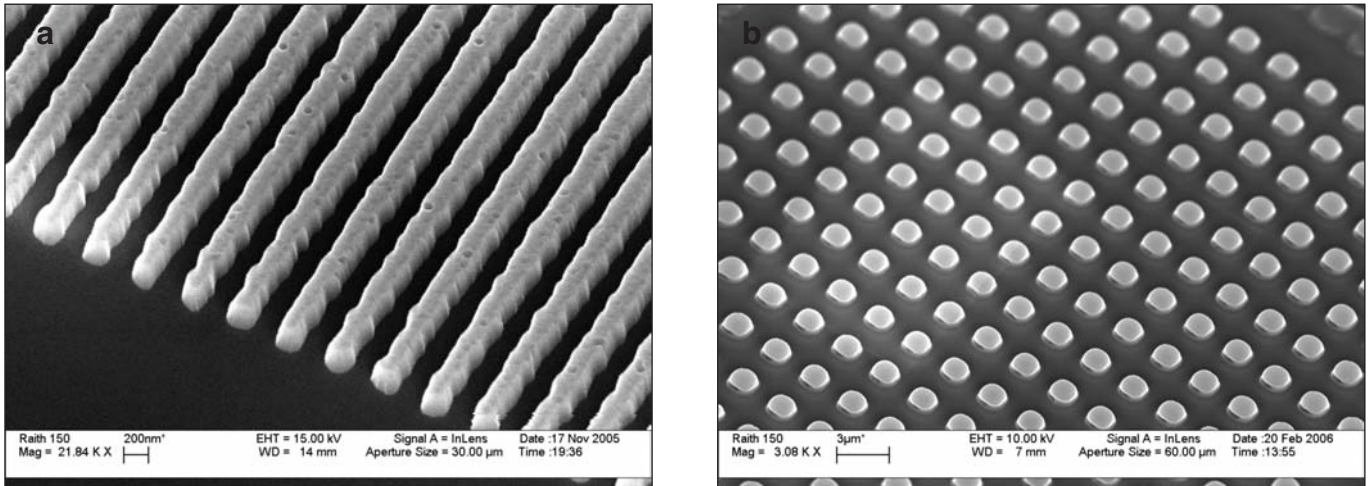


Fig. 1 - Strutture periodiche unidimensionali con periodo di circa 400 nm (a), e bidimensionali con periodo di circa 2 μm (b) realizzate mediante litografia a fascio elettronico e visualizzate mediante microscopio elettronico a scansione.

lipidiche, ecc.). Questi sistemi stanno oggi suscitando un interesse sempre maggiore dal punto di vista scientifico e per essi l'approccio litografico convenzionale, comunemente denominato *top-down*, determina un danneggiamento parziale o totale della struttura e della funzionalità.

Tra le tecnologie di *patterning* alternative, la litografia soffice (*Soft Lithography*) (10) si dimostra essere notevolmente vantaggiosa in termini di qualità e convenienza. È possibile, infatti, raggiungere risoluzioni dell'ordine delle decine di nanometri con costi relativamente ridotti e su materiali di natura organica e biologica, che non sono adatti ai processi fotolitografici. L'elemento caratterizzante la *Soft Lithography* è una replica elastomerica, usata per stampare su differenti substrati, anche non planari, il disegno (*pattern*) presente su una maschera (*master*). Inizialmente si realizza il *master* in Silicio, Arseniuro di Gallio, Fosforo di Indio, quarzo o metallo attraverso litografia ottica o a fascio elettronico e successiva incisione umida oppure *reactive ion etching*; quindi se ne produce una copia in negativo, la replica elastomerica, con materiali polimerici le cui proprietà sono scelte in base alle caratteristiche del *pattern*: per strutture di dimensioni superiori a 1 micrometro si usano polimeri con un modulo di *Young* (rapporto tra sforzo applicato e deformazione indotta) di circa 3 MPa, mentre al di sotto del micrometro vanno impiegati preferibilmente polimeri con un modulo di *Young* di circa 10 MPa. Successivamente si posiziona la replica sulla superficie di un substrato e si procede alla stampa del *pattern* iniziale. La sequenza dei processi: fabbricazione del *master*, realizzazione della replica e adesione di questa al substrato è comune a tutti i metodi di litografia soffice, mentre il modo in cui avviene il trasferimento del *pattern* al substrato

finale varia a seconda della particolare tecnica con cui si lavora: litografia microfluidica, altrimenti denominata *micromolding in capillaries* (MIMIC) (11, 12), o stampa a microcontatto (*microcontact printing*, CP) (13).

La forma, la morfologia e la struttura di un *master* sono duplicate con risoluzione nanometrica e in modo semplice mediante un processo noto come *replica molding* (REM) (14). Sulla superficie del *master*, che presenta strutture in rilievo, si versa, in modo da ricoprirlo completamente, il liquido prepolimerico di un elastomero. Quest'ultimo, dopo polimerizzazione, usualmente termica, in seguito alla quale aumenta di viscosità e diventa solido, viene rimosso meccanicamente dal *master* e costituisce una copia in negativo del *pattern* iniziale, chiamata replica elastomerica o *mold*. L'elastomero maggiormente usato è il polidimetilsilossano (PDMS), che per le proprie proprietà strutturali è adatto alla formazione di microstrutture di alta qualità. In base alla sua natura elastica, infatti, esso può adattarsi perfettamente alla superficie del substrato ed essere facilmente rilasciato anche da strutture complesse e fragili. Inoltre, essendo chimicamente inerte, non aderisce in modo irreversibile e non reagisce con i materiali con cui entra in contatto. La replica, inoltre, lavata in opportuni solventi, come acqua deionizzata oppure eptano (C_7H_{16}), può essere utilizzata più di una volta.

Nella litografia microfluidica, o *micromolding in capillaries* (MIMIC) (11, 12), il trasferimento del disegno, presente sul *master*, al substrato avviene attraverso il riempimento, da parte di un liquido prepolimerico, di una rete di capillari formati dalla replica di PDMS e dalla superficie del substrato stesso. Inizialmente si realizza con la tecnica *replica molding* illustrata in precedenza la copia in negativo del *master*, la cui superficie

è costituita, ad esempio, da piste parallele in rilievo. La *mold*, quindi, tagliata opportunamente e posta in *conformal contact* con la superficie del substrato, determina la formazione di canali vuoti paralleli, aperti alle due estremità. In corrispondenza di queste, si pone una goccia di un liquido prepolimerico a bassa viscosità che, dopo aver riempito completamente per azione capillare i canali, viene fatto polimerizzare mediante trattamento termico od esposizione a radiazione UV. Successivamente si rimuove la replica e si ottiene sulla superficie del substrato il *pattern* iniziale del *master*. La MIMIC permette in tal modo di trasferire, in un solo *step*, il *pattern* dalla replica di PDMS al substrato, garantendo una riproduzione fedele del disegno iniziale grazie all'accuratezza con cui il liquido prepolimerico riempie i canali per capillarità. La MIMIC, inoltre, consente di creare, sullo stesso supporto, strutture con altezze diverse ed è applicabile ad un'ampia classe di materiali, tra cui particelle colloidali, soluzioni saline e macromolecole biologiche. Le dimensioni trasversali più piccole tipicamente raggiunte con questa tecnica sono quelle relative a linee con una sezione (larghezza \times altezza) di $0.1 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$.

La tecnica di *microcontact printing* (13) permette la formazione di strutture autoassemblanti, quali i *self-assembling monolayers* (SAM) molecolari, di dimensione trasversale micrometrica e submicrometrica. La μCP sfrutta la perfetta adesione tra substrato inorganico e replica elastomerica precedentemente umettata con una soluzione contenente le unità molecolari della struttura SAM desiderata. Aspetto fondamentale della tecnica risulta dunque essere il buon contatto tra gli elementi, che è fortemente influenzato dalla topologia della superficie. Le strutture realizzate per μCP presentano un ordine strutturale molto maggiore dei *films* formati per adsorbimento da soluzione, in cui l'orientazione delle catene ha spesso un forte carattere casuale e lo strato non risulta omogeneo. I parametri principali che influenzano il processo di formazione del monostrato sono il tempo di contatto, la concentrazione e il tipo di solvente impiegati per umettare gli elementi elastomerici. Il vantaggio più innovativo di questa tecnica, inerentemente di tipo *bottom-up*, risiede nella possibilità di realizzare processi di stampa multipla ottenendo in questo modo strutture complesse su ampie superfici.

DISPOSITIVI MICROFLUIDICI E LORO APPLICAZIONI BIOMEDICALI

Oltre alle applicazioni litografiche della tecnica MIMIC discusse in precedenza, la micro- e la nanofluidica, ossia il trasporto di liquidi attraverso canali di

dimensioni micrometriche o sub-micrometriche realizzati su un *chip* portatile, stanno rivestendo oggi sempre più importanza. Le tecnologie microfluidiche stanno emergendo come fattore chiave abilitante il funzionamento di dispositivi *lab-on-chip* che miniaturizzano su un unico dispositivo una serie di operazioni precedentemente svolte nell'ambito di un intero laboratorio chimico o biologico, esempi tipici sono la preparazione e l'analisi genomica di un campione, inclusa l'amplificazione *in situ* mediante *polymerase chain reaction*, e reattori chimici in grado di sintetizzare su *chip* molecole organiche o nanoparticelle. La miniaturizzazione consente di lavorare su volumi molto ridotti di campione e di *chemicals*, e dunque determina una immediata convenienza in termini di riduzione dei consumi, dello spreco dei reagenti e dei prodotti, e aumento della velocità operativa. Benché ancora molto recenti, i dispositivi microfluidici hanno dunque iniziato a rivoluzionare gli studi sulla genomica e la proteomica. Hanno trovato importanti applicazioni nella diagnostica clinica, nelle analisi di *screening* ambientale e per il *test* ed il rilascio terapeutico di medicinali. Le grandi potenzialità di mercato dell'industria farmaceutica e dell'*healthcare* stanno oggi portando ad un vigoroso sviluppo delle tecnologie microfluidiche a livello mondiale, con la formazione di molte compagnie dedicate, e questi metodi, che fanno per loro stessa natura da ponte tra micro-nanotecnologie di lavorazione dei materiali e *life-science* sono state recentemente menzionate tra le dieci tecnologie emergenti chiave che cambieranno il mondo (*MIT Technology Review*). Uno degli esempi è lo sviluppo di dispositivi microfluidici multifunzionali detti *micro-total analysis systems* (μTAS). Con questi dispositivi miniaturizzati, è possibile la manipolazione di piccolissimi volumi di fluidi, tipicamente nel *range* dai μl ai pl , in canali microfabbricati.

In particolare, circuiti integrati su larga scala su dispositivi microfluidici hanno dimostrato di essere una tecnica percorribile per manipolare, processare e analizzare fluidi biologici con grande precisione. Per esempio, matrici combinatorie di *pattern* di valvole binarie (*multiplexers* microfluidici) hanno aumentato la potenza di processo di una rete permettendo complesse manipolazioni di fluidi con un numero minimo di *input* controllati (15). Litografia *soft* multilivello è stata usata per fabbricare valvole meccaniche elastomeriche, che permettono il controllo del fluido su un ampio *range* di condizioni e che possono essere disposte in fila al fine di formare una pompa peristaltica (16, 17). *Mixers* microfluidici sono stati ottenuti strutturando la topologia di una parete del capillare con strutture orientate ad angolo obliquo rispetto all'asse longitudinale del canale e applicando un gradiente di pressione lungo il canale, oppure strutturando la superficie di un canale con

bande alternate di densità di carica positiva e negativa e applicando un campo elettrico lungo il canale in modo da generare un flusso elettrosmotico (18-20). Sono stati descritti sistemi di canali polimerici tridimensionali con topologie e geometrie complesse, formati connettendo molte sottostrutture su *wafer* separati (21), e sistemi per elettroforesi capillare (22). *Breakdown* elettrico indotto è stato impiegato per fabbricare dispositivi microfluidici monouso, nei quali le connessioni tra i canali possono essere aperte dopo la fabbricazione (23). Usando un approccio microfluidico, è anche possibile generare gradienti spazialmente e temporalmente costanti che si estendono per centinaia di micrometri, e mantenerne inalterata la loro forma per lunghi periodi di tempo (24). Infine, sistemi microfluidici sono usati come reattori di flusso per differenti reazioni chimiche, perché permettono un controllo preciso sui parametri di crescita e sulla cinetica (25, 26), e dispositivi costituiti da molte trappole entropiche permettono di separare molecole di DNA (27, 28).

Un aspetto di particolare rilievo, anche per le applicazioni di tipo biomedicale di questi circuiti fluidici, è che le pareti dei capillari possono essere funzionalizzate in maniera controllata, conferendo dunque alle superfici in contatto con i liquidi specifiche proprietà di interazione con i fluidi che scorrono. L'esempio più immediato è ancora una volta la modifica controllata delle proprietà di bagnabilità della superficie da parte dei liquidi. Ad esempio, le superfici possono essere rese più idrofiliche, e dunque maggiormente interagenti e più facilmente bagnabili da soluzioni acquose, mediante l'impianto superficiale di gruppi polari, come delle molecole che lascino esposte delle terminazioni $-OH$ o $-SH$. Questo viene usualmente realizzato mediante processi al plasma a ossigeno e *wet chemistry* su superfici polimeriche. La prospettiva attualmente sotto studio è la funzionalizzazione con molecole portatrici di funzionalità di complesse, come il rilascio controllato di farmaci indotto dalle caratteristiche del fluido in esame, il riconoscimento anticorpo-antigene, l'immunofluorescenza.

NANOFIBRE POLIMERICHE

Le nanostrutture unidimensionali organiche, ed in particolare le nanofibre polimeriche stanno al giorno d'oggi suscitando un enorme interesse per le loro peculiari caratteristiche, che le rendono ideali per una vastissima gamma di applicazioni strategiche nella moderna competizione tecnologica internazionale, spaziando dal settore tessile a sistemi microelettronici, a dispositivi sensori ed optoelettronici. Le nanofibre polimeriche, infatti, risultano eccellenti *building blocks* per compositi strutturali rinforzati, membrane

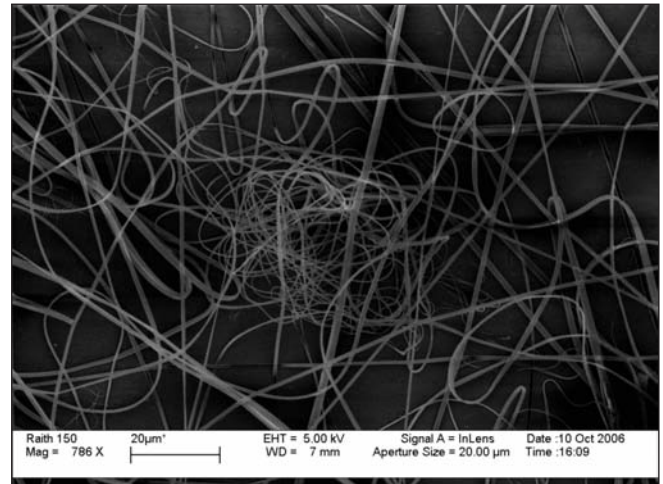


Fig. 2 - Campione di nanofibre polimeriche in polieterimide prodotte mediante Electrospinning.

con alta efficienza di filtrazione, e *scaffolds* per ingegneria tissutale. Possono essere impiegate come elementi porosi all'interno di capi di abbigliamento, per rivestimenti protettivi di ferite, grazie alla loro capacità di catturare particelle di aerosol, e come supporti a larga area per enzimi e catalizzatori. Le nanofibre polimeriche trovano anche impiego come matrici per elettroliti in batterie altamente efficienti, nella realizzazione di canali nanofluidici, e come materiali attivi in dispositivi elettronici e fotonici, quali *transistors* ad effetto di campo e polarizzatori ottici. Per questi motivi, disporre di adeguate procedure per la realizzazione di nanofibre polimeriche riveste importanza strategica nella moderna ricerca di base e tecnologica.

L'*Electrospinning* è un processo che consente di ottenere micro- e nanofibre polimeriche, dal diametro compreso tra alcuni μm e poche decine di nm (Fig. 2), partendo da un getto di soluzione polimerica guidato elettricamente. L'applicazione di un voltaggio elevato (1-30 kV) ad una soluzione polimerica, contenuta in una siringa con un ago del diametro dell'ordine dei millimetri o delle centinaia di micron, consente l'estruzione delle fibre polimeriche. Il processo di *Electrospinning* ha luogo quando le forze elettriche che interessano la superficie del polimero vincono la tensione superficiale e consentono al getto polimerico carico di essere attratto dal collettore. Le fibre, raccolte su un substrato planare, hanno l'aspetto di una matassa, ma modificando alcune variabili del processo si possono ottenere altre geometrie. I parametri che sono stati identificati come principali nell'influenzare il processo possono essere distinti in tre differenti tipologie: (i) parametri di soluzione, quali pesi molecolari e loro distribuzione, architettura molecolare (polimero lineare, ramificato, ecc.), concentrazione, viscosità, conduttività e tensione superficiale del polimero di interesse; (ii) parametri di

processo come potenziale elettrico, velocità di flusso, distanza del capillare dal collettore, eventuale movimentazione del collettore; (iii) parametri ambientali come temperatura, umidità e velocità dell'aria nella camera di processo. La superficie delle nanofibre inoltre presenta spesso una rugosità superficiale evidenziabile tramite microscopio elettronico a scansione, con *features* circolari di dimensioni caratteristiche attorno a poche decine di nm. Questa rugosità superficiale contribuisce ad aumentare ulteriormente la superficie utile per unità di massa del materiale.

POSSIBILITÀ E PROSPETTIVE DI APPLICAZIONE IN NEFROLOGIA

La Nefrologia è un campo ancora ampiamente esplorato per quanto riguarda le applicazioni delle micro- e nanotecnologie, ma le potenzialità sono enormi per quanto riguarda sia l'utilizzo di materiali innovativi, sia la realizzazione di dispositivi miniaturizzati ed altamente portabili.

Le nanofibre sono sicuramente il materiale a nanoscala che offre le maggiori potenzialità di applicazione. Grazie alla loro peculiare geometria, si tratta del sistema polimerico che offre oggi il migliore rapporto superficie esposta a parità di massa (fino all'ordine di 10^3 m² per grammo di materiale) e possono essere funzionalizzate mediante specifiche tecniche con molecole per controllarne l'interazione con i fluidi. Le nanofibre polimeriche sono già ampiamente utilizzate per la realizzazione di membrane filtranti (29), ed essendone la tecnologia di realizzazione ampiamente compatibile con tutta una serie di materiali polimerici già impiegati in Nefrologia, la loro applicazione come nanomateriale per la dialisi sembra senz'altro una strada promettente. Per analoghi motivi, si prestano come substrato eccellente per la coltura cellulare.

Per quanto concerne i dispositivi, il problema oggi maggiormente rilevante è la necessità di trattare ampi volumi di fluidi biologici, con la prospettiva di spostare su un *chip* il più possibile portabile le classiche funzioni degli apparati dialitici. Alcuni passi avanti comunque stanno iniziando ad essere compiuti. È possibile controllare la porosità dei materiali polimerici mediante tecnologie a separazione di fase, ed in questo modo aumentare enormemente il rapporto superficie/volume degli elementi filtranti basati su questi composti. Mediante litografia soffice, e particolarmente per stampa a microcontatto, è anche possibile indurre crescita controllata ed acquisizione di geometrie volute a cellule in coltura. Ad esempio, la proteina della matrice extracellulare Laminina, grazie alle specifiche interazioni tra i suoi domini e i recettori (integrina) presenti sulla membra-

na cellulare, garantisce un forte attacco della cellula al substrato e influenza la risposta fisiologica della cellula stessa. È possibile litografare su scale micrometriche la Laminina utilizzando sia legami chimici, ad esempio pretrattando le superfici interessate con Mercaptosilani, sui quali il processo di attacco della Laminina ai gruppi SH è garantito dalla presenza di due domini fortemente ricchi di cisteina e dunque dalla formazione di legami disolfuri con il gruppo terminale del Silano, oppure mediante semplice *physisorption* su superfici di vetro o polimeriche. Una volta litografata la Laminina, la messa in coltura di cellule su queste superfici microstampate determina il riconoscimento, da parte delle stesse cellule, delle regioni su cui si trova la proteina extracellulare, e dunque la disposizione secondo pattern preferenziali e controllati. Oggi è possibile litografare, con differenti metodologie soffici di volta in volta più adatti per le diverse specie molecolari, una grande quantità di proteine diverse, anche in modo sequenziale (30-32). La possibilità di controllare la disposizione delle cellule in coltura con precisione micrometrica ha applicazioni importanti nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa.

L'apporto e l'interazione con medici, biologi e biochimici sarà nell'immediato futuro di sicuro interesse e stimolo, e senz'altro prerequisito imprescindibile, affinché questi materiali e queste tecnologie possano contribuire all'affinamento dei metodi analitici e clinici disponibili, e ad un reale e positivo impatto sociale.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

RIASSUNTO

Le nanotecnologie e le tecnologie microfluidiche stanno oggi emergendo come fattore chiave abilitante il funzionamento di dispositivi lab-on-chip e micro-total analysis systems nel settore biotecnologico e biomedicale. Tali dispositivi consentono riduzione dei consumi e dello spreco dei reagenti e dei prodotti, e aumento della precisione analitica e della velocità operativa. Viene qui introdotto il campo delle nanotecnologie e vengono presentati alcuni metodi di fabbricazione a nano- e micro-scala di potenziale impatto per la realizzazione di devices biomedicali e per filtrazione e rimozione di soluti, quali la litografia a fascio elettronico, le litografie soffici e l'elettrospinning di nanofibre-scaffolds per ingegneria tissutale.

BIBLIOGRAFIA

1. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys Rev Lett* 1982; 49: 57-61.
2. Binnig G, Quate C, Gerber C. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 1986; 56: 930-3.
3. Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Eng Sci* 1960; 23: 22-36.
4. Moore GE. Cramming more components onto integrated circuits. *Electronics Magazine* 1965; 38: 114-7.
5. Okazaki S. Resolution limits of optical lithography. *J Vac Sci Technol B* 1991; 9: 2829-33.
6. Pease RFW. Nanolithography and its prospects as a manufacturing technology. *J Vac Sci Technol B* 1992; 10: 278-85.
7. Barthlott W, Neinhuis C. The purity of sacred lotus or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 1997; 202: 1-8.
8. Bergeron V, Quere D. Water droplets make an impact. *Phys. WORLD* 2001; 14: 27-31.
9. Watson GS, Watson JA. Natural nano-structures on insects-possible functions of ordered arrays characterized by atomic force microscopy. *Appl Surf Sci* 2004; 235: 139-44.
10. Xia Y, Whitesides GM. Soft Lithography. *Angew Chem Int Ed Engl* 1998; 37: 550-75.
11. Kim E, Xia Y, Whitesides GM. Micromolding in Capillaries: Applications in Materials Science. *J Am Chem Soc* 1996; 118: 5722-31.
12. Xia Y, Kim E, Whitesides GM. Micromolding of polymers in capillaries: applications in microfabrication. *Chem Mater* 1996; 8: 1558-67.
13. Kumar A, Whitesides GM. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink. *Appl Phys Lett* 1993; 63: 2002-4.
14. Xia Y, Kim E, Zhao XM, Rogers JA, Prentiss M, Whitesides GM. Complex optical surfaces formed by replica molding against elastomeric masters. *Science* 1996; 273: 347-9.
15. Thorsen T, Maerkl SJ, Quake SR. Microfluidic Large Scale Integration. *Science* 2002; 298: 580-4.
16. Unger MA, Chou HP, Thorsen T, Scherer A, Quake SR. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science* 2000; 288: 113-6.
17. Quake SR, Scherer A. From Micro- to Nanofabrication with Soft Materials. *Science* 2000; 290: 1536-40.
18. Stroock AD, Dertinger SK, Ajdari A, Mezić I, Stone HA, Whitesides GM. Chaotic mixer for microchannels. *Science* 2002; 295: 647-51.
19. Stroock AD, Whitesides GM. Controlling flows in microchannels with patterned surface charge and topography. *Acc Chem Res* 2003; 36: 597-604.
20. Jiang X, Ng JMK, Stroock AD, Dertinger SKW, Whitesides GM. A Miniaturized, Parallel, Serially Diluted Immunoassay for Analyzing Multiple Antigens. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 5294-5.
21. Wu H, Odom TW, Chiu DT, Whitesides GM. Fabrication of complex three-dimensional microchannel systems in PDMS. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 554-9.
22. Chen X, Wu H, Mao C, Whitesides GM. A Prototype 2-D Capillary Electrophoresis System Fabricated in Poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem* 2002; 74: 1772-8.
23. McDonald JC, Metallo SJ, Whitesides GM. Fabrication of a Configurable, Single-Use Microfluidic Device. *Anal Chem* 2001; 73: 5645-50.
24. Dertinger SKW, Chiu DT, Jeon NL, Whitesides GM. Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks. *Anal Chem* 2001; 73: 1240-6.
25. Yen BKH, Stott NE, Jensen KF, Bawendi MG. A Continuous-Flow Microcapillary Reactor for the Preparation of a Size Series of CdSe Nanocrystals. *Adv Mater* 2003; 15: 1858-62.
26. Chan EM, Mathies RA, Alivisatos AP. Size-controlled growth of CdSe nanocrystals in microfluidic reactors. *Nano Lett* 2003; 3: 199-201.
27. Han H, Craighead HG. Separation of Long DNA Molecules in a Microfabricated Entropic Trap Array. *Science* 2000; 288: 1026-9.
28. Turner SWP, Cabodi M, Craighead HG. Confinement-Induced Entropic Recoil of Single DNA Molecules in a Nanofluidic Structure. *Phys Rev Lett* 2002; 88: 1-4.
29. Gibson P, Schreuder-Gibson H, Rivin D. Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers. *Colloids Surf A* 2001; 187-188: 469-81.
30. Bernard A, Renault JP, Michel B, Bosshard HR, Delamarche E. Microcontact Printing of Proteins. *Adv Mater* 2000; 12: 1067-70.
31. Sgarbi N, Pisignano D, Di Benedetto F, Gigli G, Cingolani R, Rinaldi R. Self-assembled extracellular matrix protein networks by microcontact printing. *Biomaterials* 2004; 25: 1349-53.
32. Di Benedetto F, Biasco A, Bizzarri R, et al. Two dimensional patterning of fluorescent proteins in hydrogels. *Langmuir* 2006; 22: 29-31.