



**DIPARTIMENTO DI TECNOLOGIE AVANZATE**  
**NAPOLI**

**\*ANALISI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO E SPETTROMETRIA\***

[Ingegnere Vincenzo Marcello Bellini laurea in bioingegneria genetica e molecolare]

- ❖ **"RILEVAZIONE DI GRAPHENE IN UN CAMPIONE DI SOSPENSIONE IN ACQUA"**
- ❖ **"RILEVAZIONE DI BISSIDO DI SILICIO  $SiO_2$  IN UN CAMPIONE DI SOSPENSIONE IN ACQUA"**

- In data 26/05/2021 ci è pervenuta tramite corriere 1 flacone, etichettato con il seguente testo:
- "COMIRNATY™ - Concentrato sterile - mRNA per COVID-19 - 6 dosi dopo la diluizione.
- Data / ora di eliminazione: PAA165994.LOT / EXP: EY3014 08/2021 "
- Origine e tracciabilità: sconosciuta
- Stato di conservazione: refrigerato
- Manutenzione durante lo studio: refrigerato
- Codifica del campione problematico da analizzare: RD1

❖ **Osservazioni preliminari del campione di prova RD1 – 4.**

• **Descrizione:**

- Flaconcino sigillato, con tappo in gomma e alluminio intatto, della capacità di 2 ml, contenente una sospensione acquosa torbida da 0,45 ml.
- Viene eseguita l'estrazione e la quantificazione dell'RNA.
- Si osserva la presenza di microbiologia nanometrica non caratterizzata, visibile a 600X al microscopio ottico.

• **Elaborazione del campione:**

1. Diluizione in soluzione fisiologica sterile 0,9% (0,45 ml + 1,2 ml);
2. Frazionamento per polarità: 1,2 ml di esano + 120 ul di campione RD1;
3. Estrazione della fase idrofila;
4. Estrazione e quantificazione dell'RNA nel campione;
5. Microscopia elettronica e ottica della fase acquosa;

Analisi preliminare: estrazione e quantificazione dell'Rna nel campione.

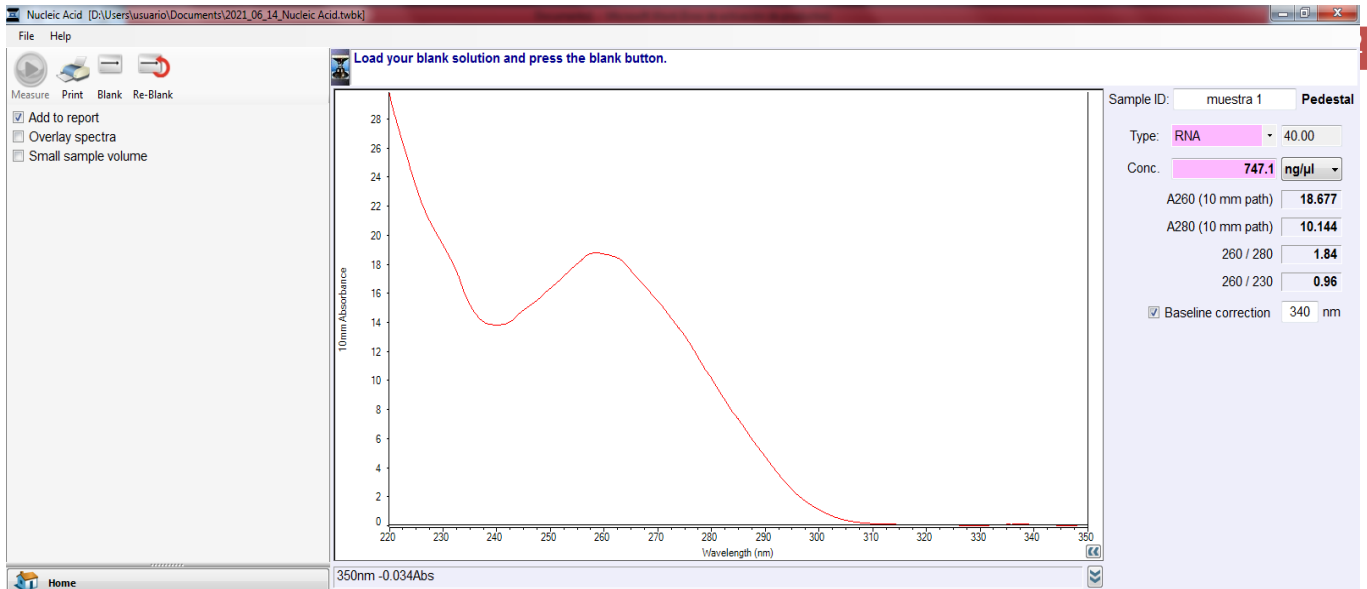
1. Estrazione dell'RNA: Kit <https://www.fishersci.es/shop/products/ambion-purelink-rna-mini-kit-7/10307963>.

2. Quantificazione dell'assorbanza UV totale nello spettrofotometro:

NanoDrop™ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000#/ND-2000>

3. Quantificazione specifica dell'Rna mediante fluorescenza.

QUBIT2.0: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/newsletters-and-journals/bioprobres-journalof-applicazioni-di-biologia-cellulare/> / problemi-di-biosonde-2011 /- biosonde-64-aprile-2011 / the-qubit-2-0-fluorometro.



Spettro di assorbimento UV della fase acquosa del campione RD1 (Squadra Nano-drop)

Assorbimento massimo del CAMPIONE RD1 (260-270 nm).

-RNA. Presenta i soliti massimi a 260 nm. Concentrazione totale stimata mediante fluorometria QUBIT2.0: 6 ng / ul.

- Lo spettro rivela la presenza di un'elevata quantità di sostanze o sostanze diverse dall'Rna con il massimo assorbimento nella stessa regione, con un totale stimato di 747 ng/ul (stima non calibrata)

- L'ossido di grafene ridotto (RGO) ha massimi di assorbimento a 270 nm, compatibili con lo spettro ottenuto (Thema et al, 2013. Journal of Chemistry ID 150536).

- Il massimo assorbimento ottenuto NON CONSENTE DI SCARICARE la presenza di grafene nel campione. L'importo minimo dell'RNA rilevato da QUBIT2.0 spiega solo una percentuale residua dell'assorbimento UV totale del campione.

OBIETTIVO: Identificazione microscopica dei derivati del grafene.

#### ❖ METODOLOGIA:

1. Immagini in microscopia ottica ed elettronica.
2. Confronto con immagini della letteratura e pattern di ossido di grafene ridotto.

## MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE

(TEM)

Microscopio elettronico JEM-2100 Plus

Tensione: 200 kV

Risoluzione 0,14 nm

Ingrandimento fino a x1.200.00

## MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE

(TEM)

La microscopia elettronica (TEM) è comunemente usata per ottenere immagini di nanomateriali di grafene. È diventato uno strumento abbastanza standard e facile da usare, uso che è in grado di visualizzare fogli di grafene a strati individuali.

DESCRIZIONE DELLA FOTO sopra (da: Choucair et al, 2009. Produzione su scala Gram di grafene basata su sintesi solvotermica e sonicazione.

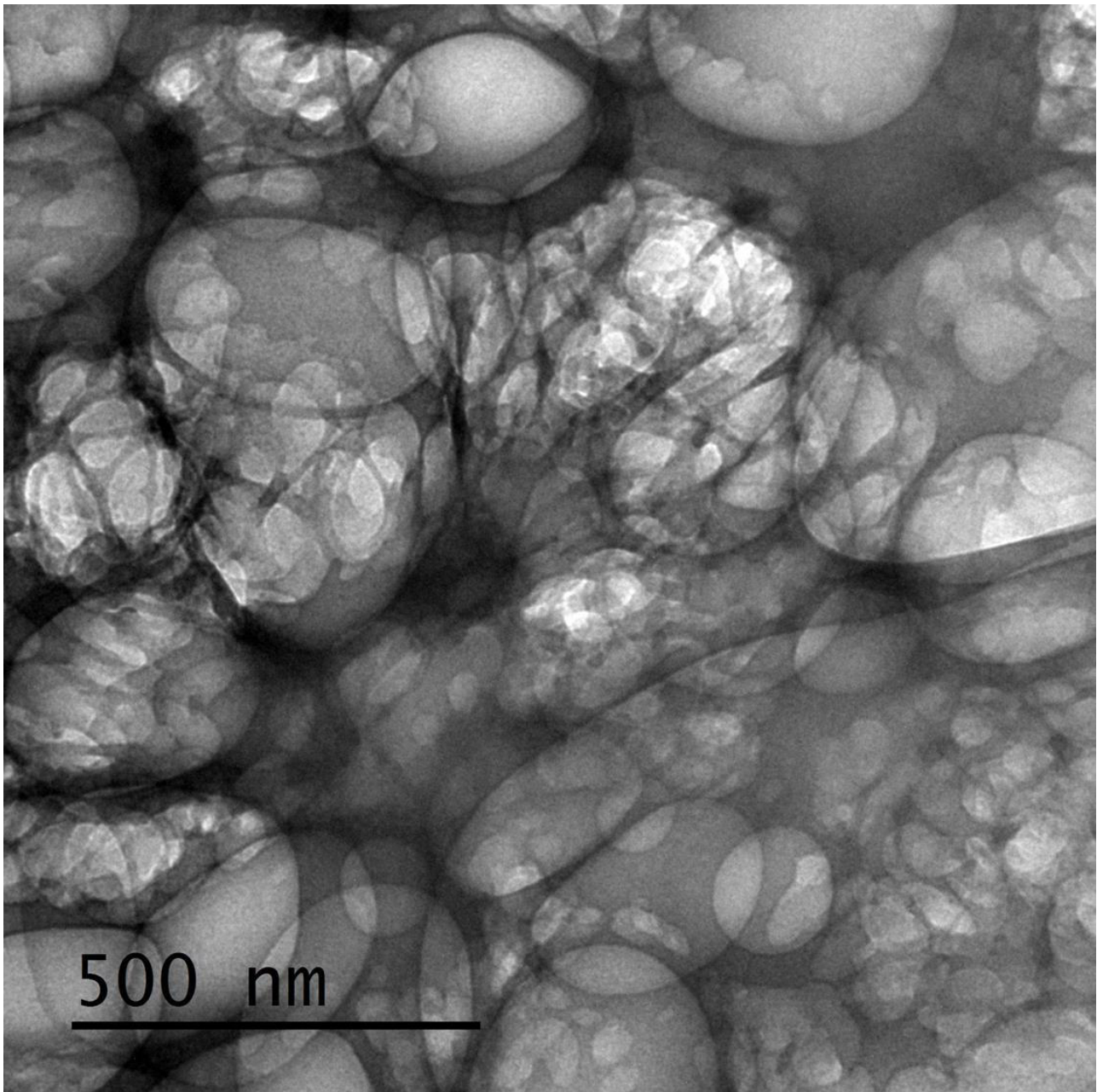
Natura: nanotecnologia 4 (1): 30-3.

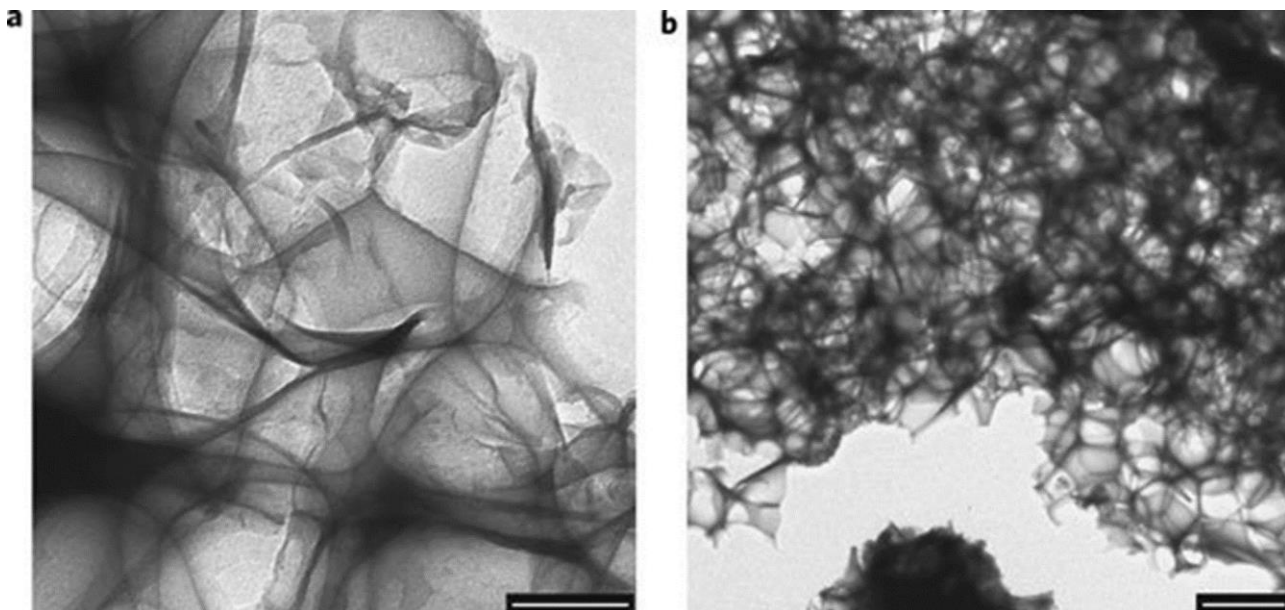
- Figura 2: "Immagini TEM dei fogli di **grafene agglomerato**.

La stessa regione del campione viene visualizzata con ingrandimenti e spettacoli diversi chiaramente il grado di formazione del foglio e la tendenza delle lamine per fondersi in regioni sovrapposte. È evidente a struttura inerente simile a un foglio che mostra intricato matrice di pieghe a lungo raggio. Come le foto sono prese in modalità di trasmissione, l'opacità relativa delle singole lamine è il risultato di regioni interfacciali con sovrapposizione tra fogli singoli. Le lame sono disposte in dimensioni laterali su scale di lunghezza micrometriche, che vanno da 100 nm a più di 1.000 nm."

**RISULTATI: Confronto del campione problematico (RD1) con un'immagine TE di letteratura 200 nm Choucair et al 2009. Nature Nanotechnology CAMPIONE RD1 4 (1): 30-3**

*Figura 2*

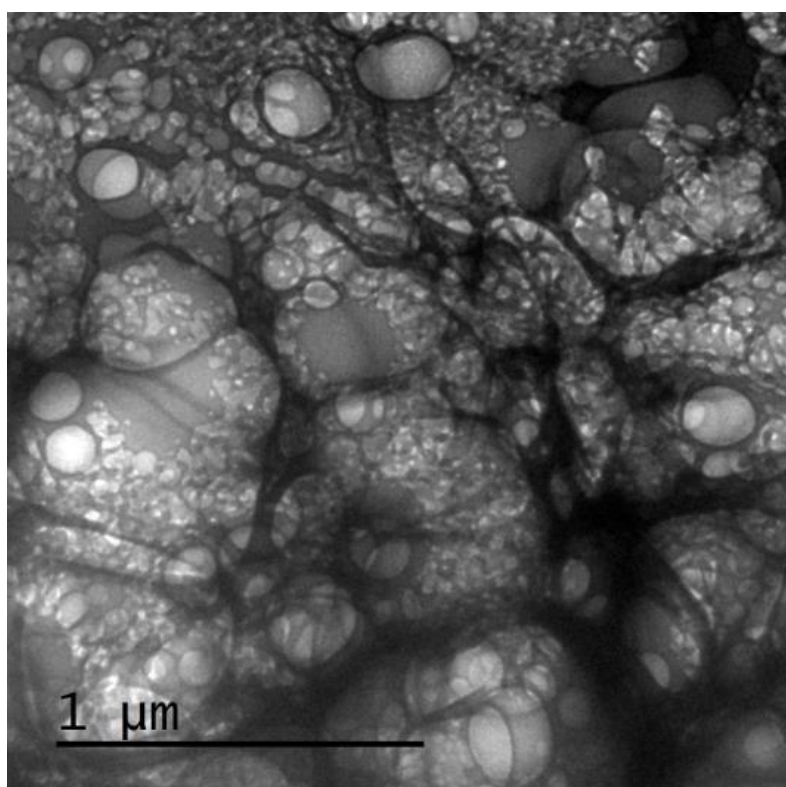


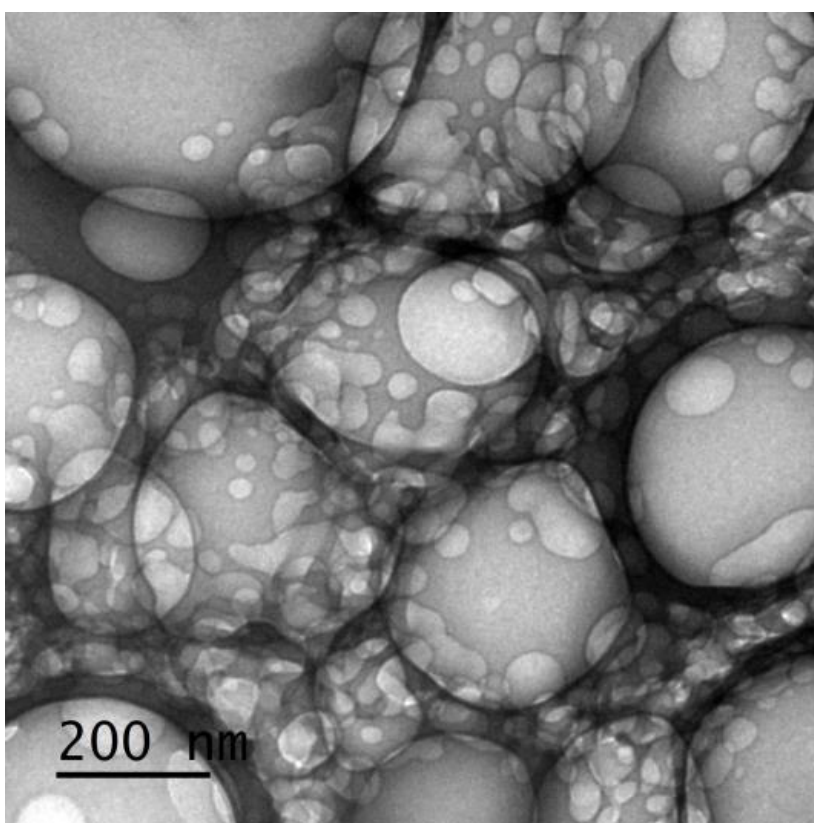
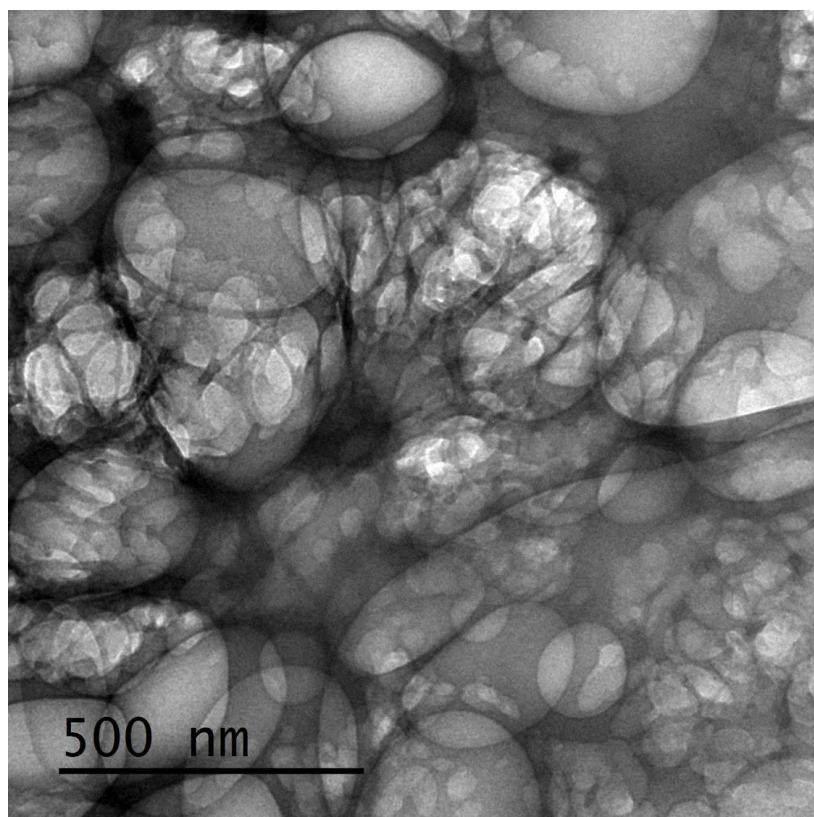


**RISULTATI: DESCRIZIONE DELLE IMMAGINI TEM DEL CAMPIONE DEL PROBLEMA RD1.**

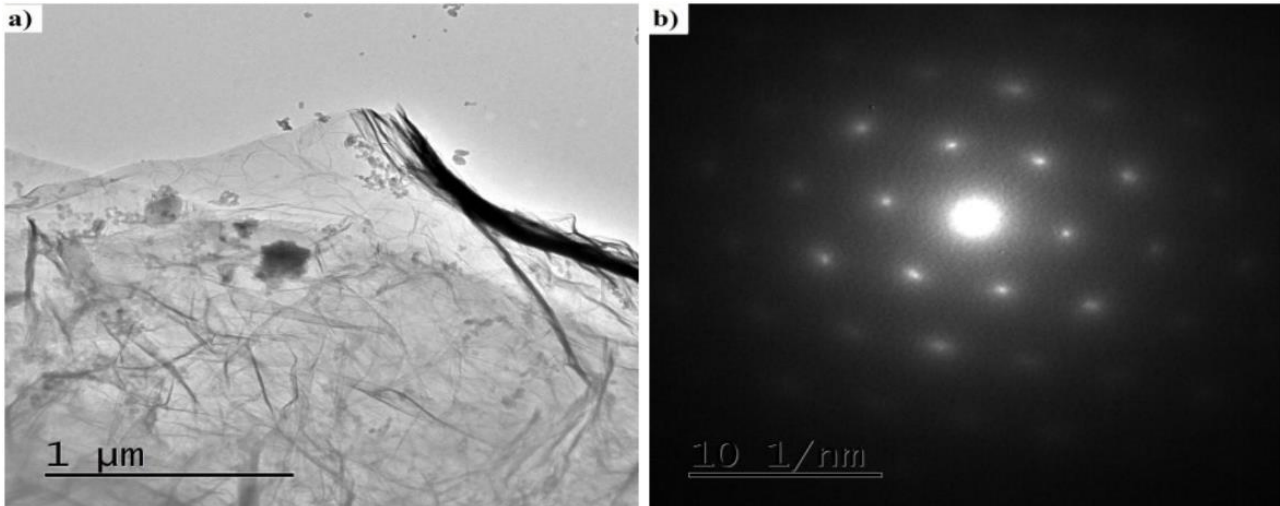
Le immagini TEM del campione RD1 in generale MOSTRANO UN'ELEVATA SOMIGLIANZA con immagini di ossido di **grafene** da letteratura ottenute con la stessa tecnica TEM, con ingrandimenti simili. È possibile vedere un'intricata matrice o rete di fogli flessibili traslucidiripiegato su se stesso, con impasto di agglomerati multistrato e monostrati più scuri non piegato di colore più chiaro. Le aree lineari più scure appaiono a causa della sovrapposizione disposizione locale dei fogli e la disposizione locale dei singoli fogli paralleli al fascio di elettroni. Dopo la maglia, appare un'alta densità di forme chiare arrotondate ed ellittiche senza identificare, eventualmente corrispondenti a fori generati da forzature meccaniche della rete durante il trattamento.

*Mostriamo qui 3 immagini con ingrandimento progressivo:*





• **NOTA importante:** per una IDENTIFICAZIONE definitiva del GRAPHENE da TEM, è necessario completare l'osservazione con caratterizzazione strutturale ottenendo mediante EDS di a PATTERN DI DIFFRAZIONE ELETTRONICO caratteristico (come figura la b mostrata di seguito). Il modello corrispondente alla grafite o il grafene presenta una simmetria esagonale e generalmente ha diversi esagoni concentrici. Al momento non è stato possibile ottenere questo modello a causa della carenza di campione disponibile per il tuo elaborazione, e la disposizione caotica e la densità di pieghe.



*Matéria (Rio J.) 23 (1) • 2018 • Caratterizzazione di nanosheet di grafene ottenuti da un metodo di Hummer. Renata Hack e altri.*

**MICROSCOPIO OTTICO**  
**MICROSCOPIO BIOLOGICO**  
**CX43**  
**OBIETTIVI PLAN FLUOR 10X, 20X (DIC) E 40X**  
**OCULARE: 10X**

- Condensatore impostato su posizione intermedia con effetto 3D (tra campo luminoso (BF) e campo scuro (DF)).

**STANDARD RIDOTTO OSSIDO DI GRAFENE**

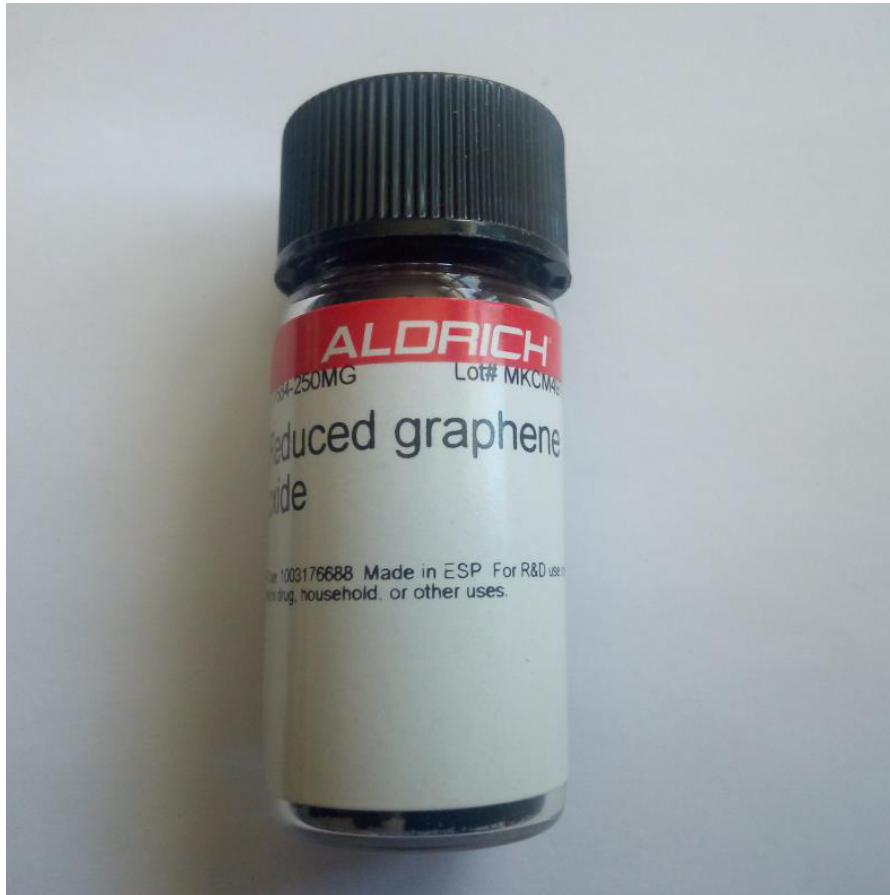


Figura 5

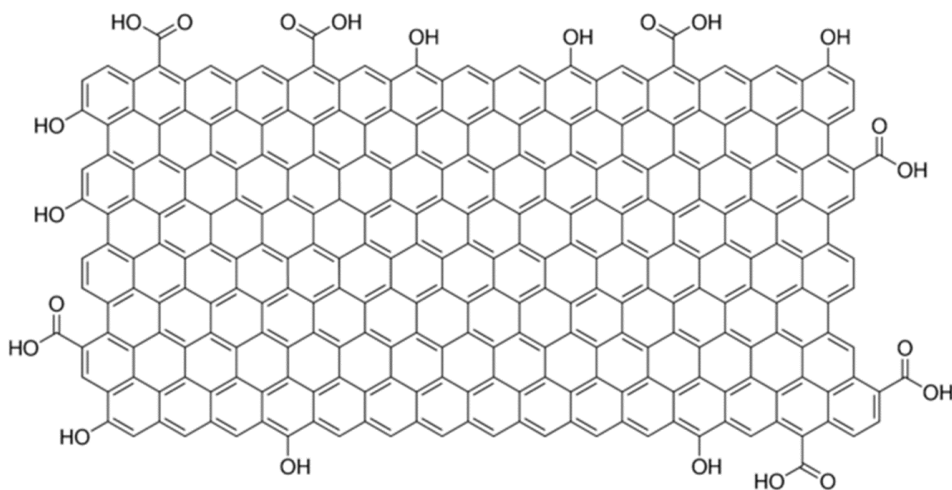


Figura 6

## IDENTIFICAZIONE DELL'OSSIDO DI GRAFENE E DELLE SUE CARATTERISTICHE STRUTTURALI CON MICROSCOPIA OTTICA

a) Campo chiaro. b-d) Microscopia ad estinzione di fluorescenza (FQM) Kim et al, 2010. Vedendo fogli a base di grafene, Materials Today, Volume 13, 2010, pagine 28-38, I materiali di grafene sono costituiti essenzialmente da un singolo strato atomico. Questo rende l'osservazione al microscopio

l'immagine ottico basato sull'assorbanza è difficile, sebbene sia possibile acquisire immagini ottiche di fogli di grafene sospesi sotto luce trasmessa in campo chiaro (Fig. a). Il grafene ossidato (GO) ha un colore molto più chiaro rispetto al grafene ridotto (rGO).

Tuttavia, sotto illuminazione riflettente, ottenendo immagini ottiche ad alto contrasto di grafene e persino lamine di foil GO è stato riportato in letteratura. Modificando l'angolo di incidenza dell'illuminazione, mediante opportuna regolazione del condensatore (campo chiaro e campo scuro), questa è stata la tecnica utilizzata per aumentare il contrasto nel campione RD1 del presentare report e ottenere immagini della rugosità sulla superficie delle lastre con effetto 3D.

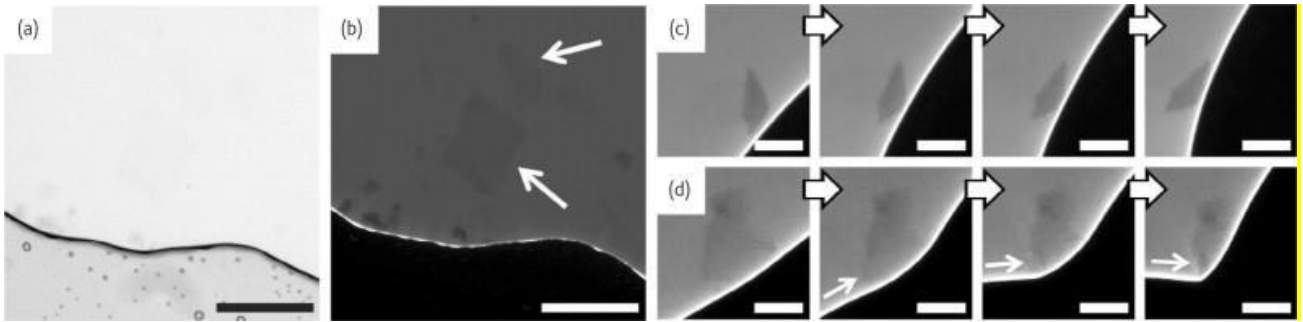


Figura 7

### IMMAGINE DELLA LETTERATURA BASSO INGRANDIMENTO TEM

"La figura mostra un'immagine TEM di grafene a doppio strato con bordi che tendono a arrotolare e piegare leggermente" Qian, W., Hao, R., Hou, Y. et al. Processo di esfoliazione assistito da solvotermia per produrre grafene con alta resa e alta qualità. Nano Res. 2, 706–71 2009.

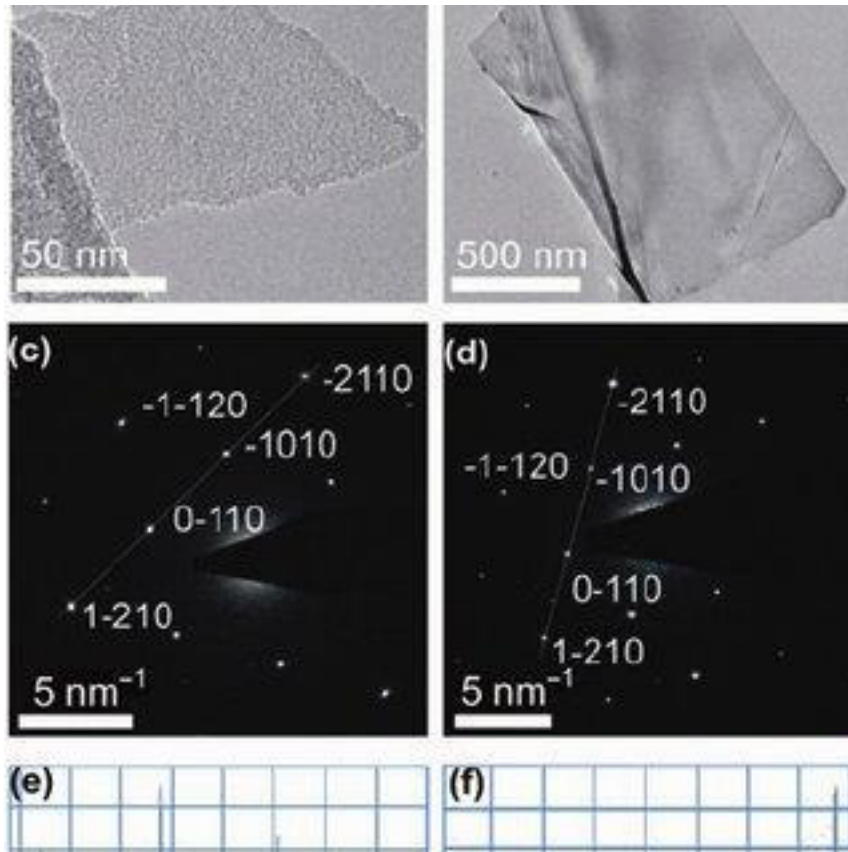


Figura 8



# IMMAGINI DI LETTERATURA. MICROSCOPIA ELETTRONICA A BASSO INGRANDIMENTO

## MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

(a) e (b) e TRASMISSIONE (TEM) (c) e (d)

Effetti dei nanofogli di grafene con diverse dimensioni laterali come additivi conduttivi sulle prestazioni elettrochimiche di Materiali catodici  $\text{LiNi}_0.5\text{Co}_0.2\text{Mn}_0.3\text{O}_2$  per batterie agli ioni di litio. Figura 2. Immagini SEM di fogli di grafene di diverse dimensioni: (a) GN-13 e (b) GN-28, e immagini di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) di diverse dimensioni di fogli di grafene: (c) GN-13 e (d) GN-28. Husu Polimeri 2020, 12 (5), 1162.

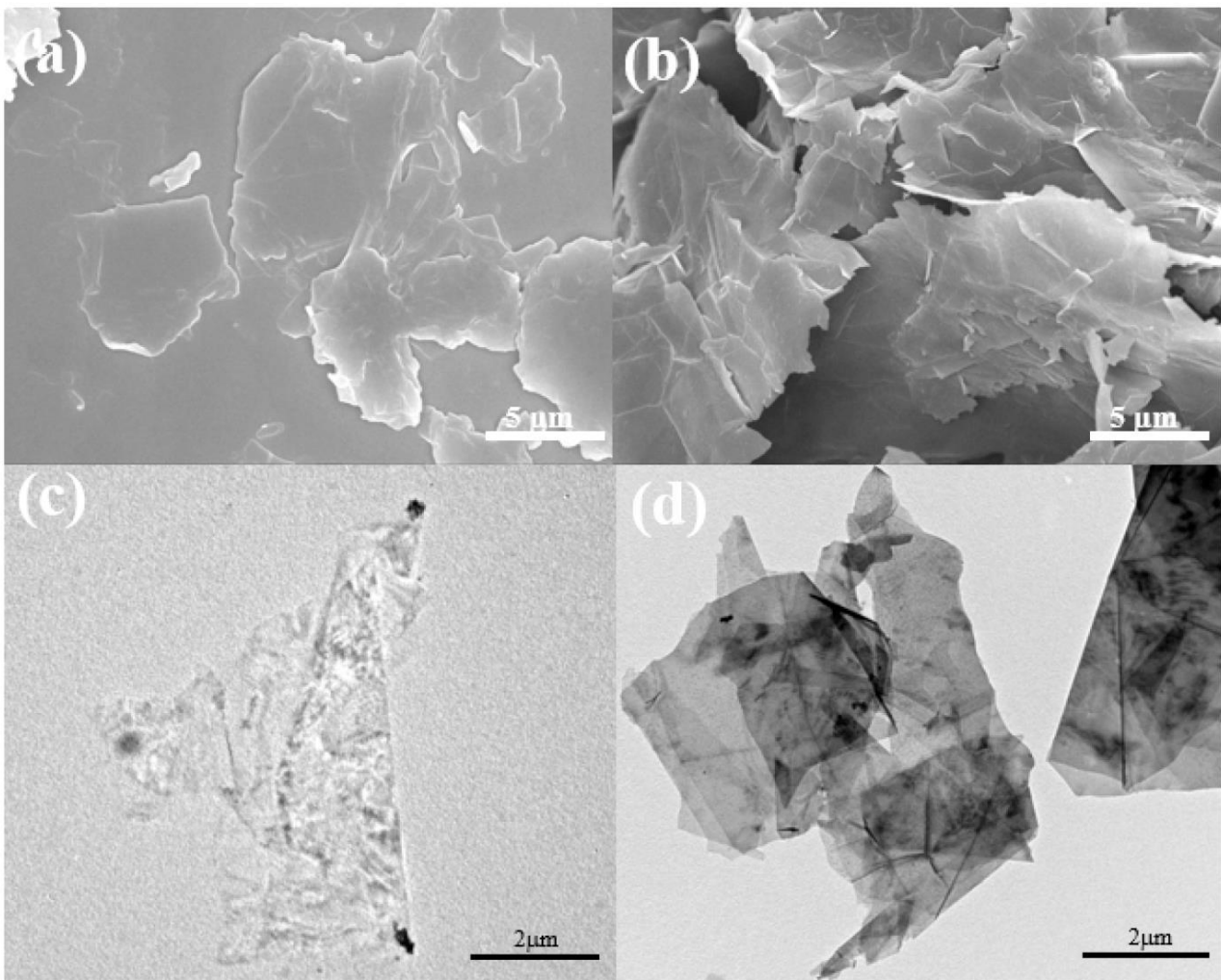


Figure: 9 -10-11-12

Ossido di grafene magnetizzato obusto.

Piattaforma per la sintesi di peptidi in situ e Rilevamento della proteasi basato su FRET.

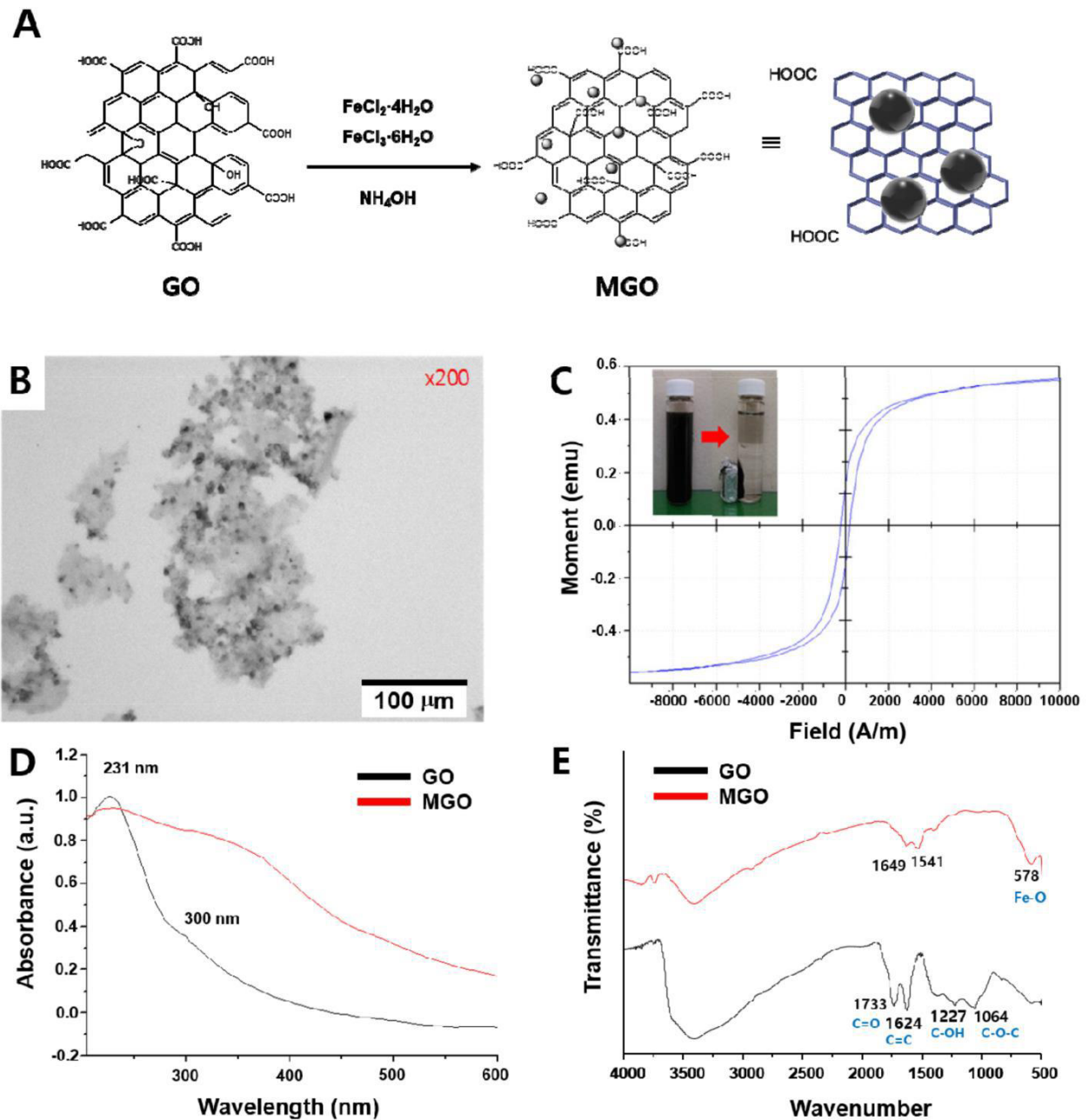


Figura 1.

Preparazione e caratterizzazione di ossido di grafene (GO) e magnetico ossido di grafene (MGO). (A) Schema di Procedura di sintesi MGO. (B) ottico immagine al microscopio di MGO. (C) magnetico ciclo di isteresi di MGO. (D) UV/Vis spettri di assorbimento di GO e MGO. (E) FTIR spettri di GO e MGO.

Confronto del campione RD1 al microscopio ottico con immagini dell'OSSIDO DI GRAFENE RIDOTTO (rGO).

Le immagini ottiche dei fogli presenti nel campione RD1 rivelano grande somiglianza con i fogli esfoliati da sonicazione del pattern rGO. Entrambi i campioni presentano internamente lastre traslucide grezze, con profili irregolari, ripiegati su se stessi e con tendenza ad arrotolarsi ai bordi. Le forme e le dimensioni dei fogli sono molto variabili, presentando in entrambi i campioni fogli in nastri o fasce ripiegati su se stessi (nastri).

Nell'ALLEGATO allegato immagini alternate di SAMPLE PATTERN OF rGO e ESEMPIO PROBLEMA RD1.

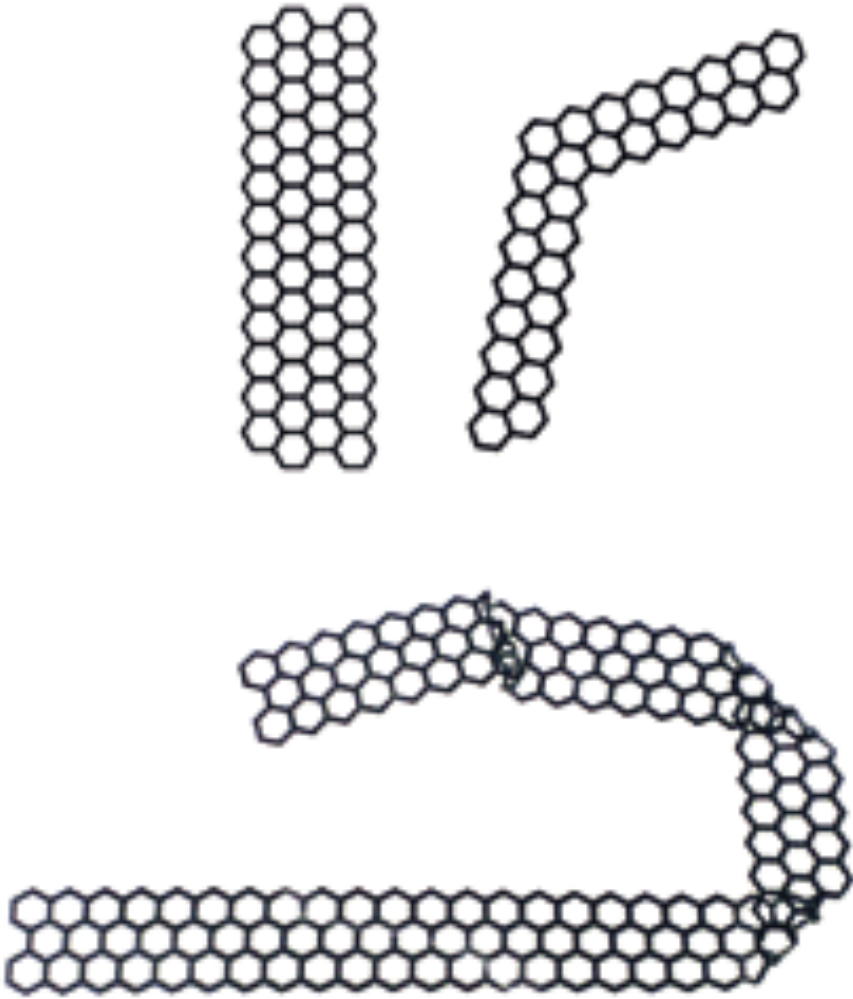


Figura 13

PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO



MUESTRA  
RD1



## NANOPARTICELLE DI BLOSSIDO DI SILICIO $SiO_2$ SOLUBILI IN ACQUA IDROFILICHE.

Le nanoparticelle di biossido di silicio  $SiO_2$  idrosolubili idrofiliche sono altamente disperse, presenti nel campione COMIRNATY™. Concentrato sterile. mRNA del COVID-19. 6 dosi dopo la diluizione.

- Data / ora di eliminazione: PAA165994.LOT / EXP: EY3014 08/2021 "
- Origine e tracciabilità: sconosciuta,
- Stato di conservazione: refrigerato,
- Manutenzione durante lo studio: refrigerato,
- Codifica del campione problematico da analizzare: RD1

idrofilo w azio-solubile  $SiO_2$  biossido di silicio nano particella S

cas n.	7631-86-9		
formula	$SiO_2$		
sinonimi	silice, biossido di silicio, quarzo, ossido di silicio, ossido di silicio (iv)		
aspetto	bianca		
purezza	99,8%		
valutazione della sicurezza	nocivo per inalazione		
dimensione	10-20nm	20-30nm	...
azione#	m600	M602	...

[applicazione di nanoparticelle di biossido di silicio  $SiO_2$  solubili in acqua idrofiliche]

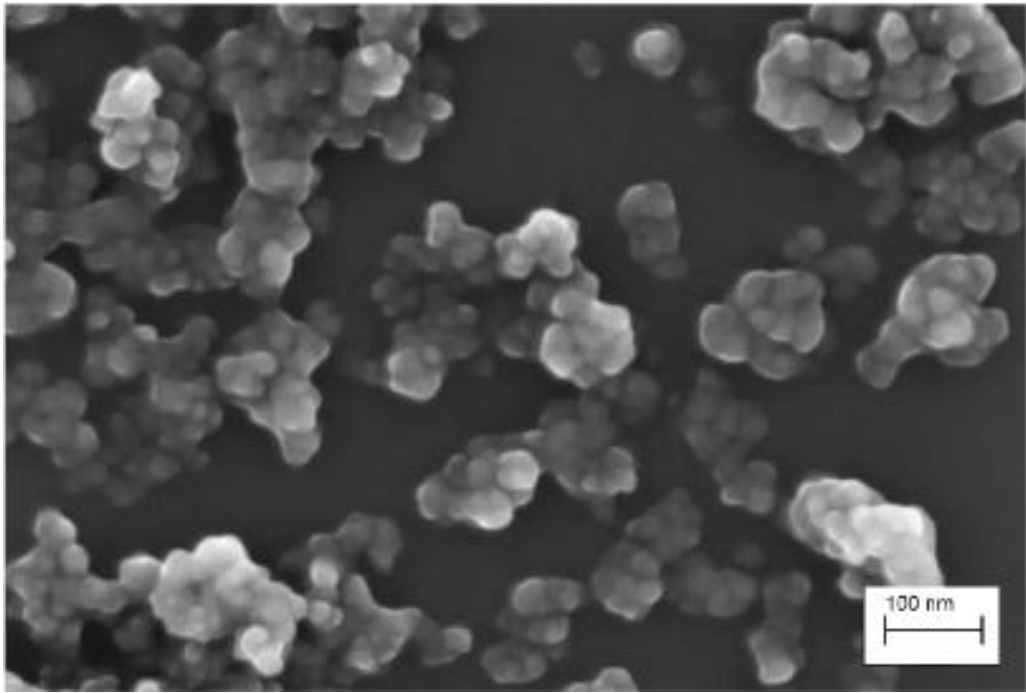


Figura 1 [Biossido di Silicio]

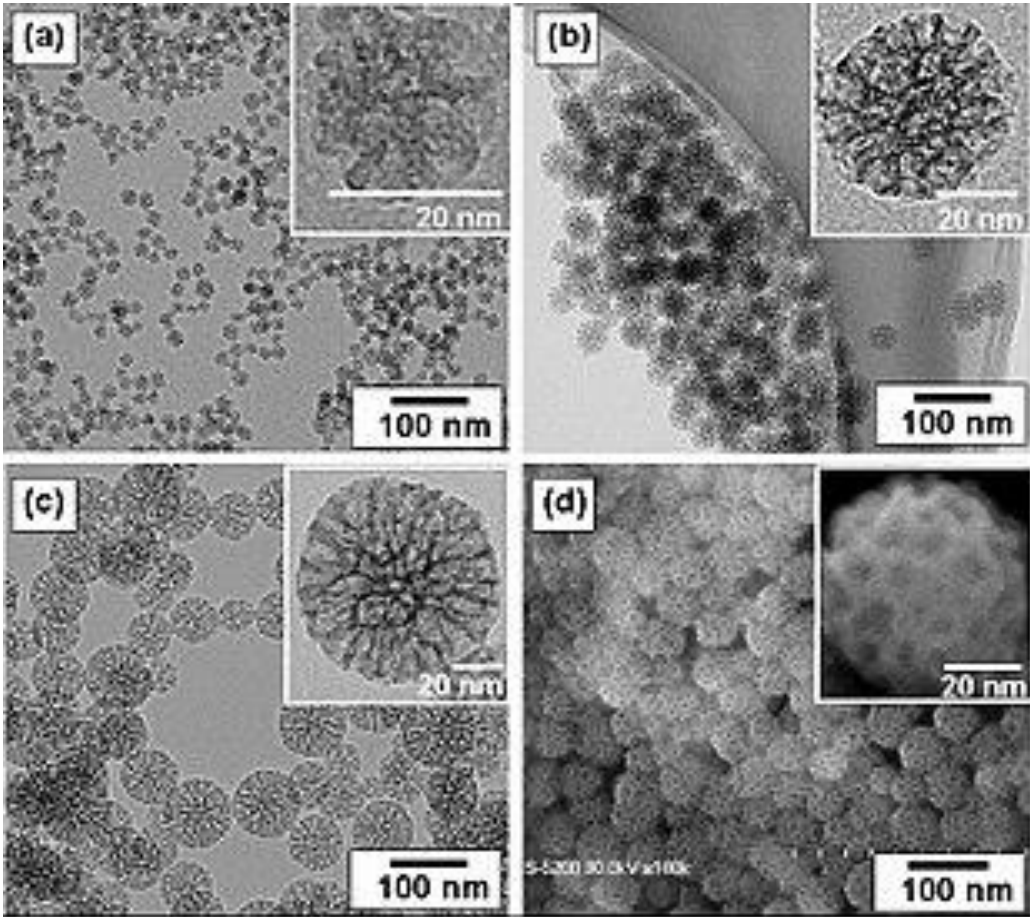
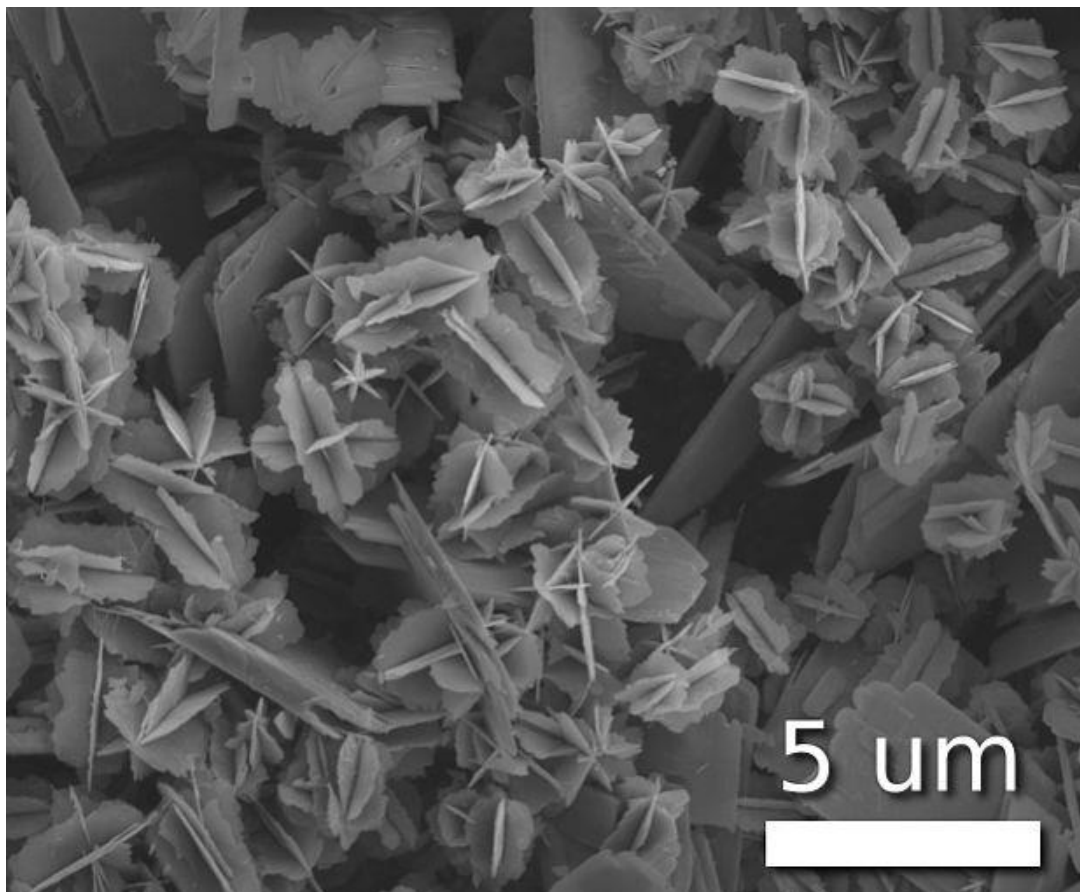


Figura 2 [estratto di biossido di silicio]



*Figura 3 [nanoparticelle di silicio]*

#### ❖ **DICHIARAZIONE DI RESPONSABILITA'**

Il risultato di cui sopra, l'evidente presenza di ossido di grafene, all'interno del materiale pervenuto, "COMIRNATY™" Concentrato sterile. mRNA del COVID-19. 6 dosi dopo la diluizione.

- Data / ora di eliminazione: PAA165994.LOT / EXP: EY3014 08/2021 "

- Origine e tracciabilità: sconosciuta

- Stato di conservazione: refrigerato

- Manutenzione durante lo studio: refrigerato

- Codifica del campione problematico da analizzare: RD1

prodotto dalla Pfizer-BioNTech, ottenuto attraverso il microscopio ottico nonché quello elettronico, non sussistono interessi privati, ma esclusivamente scientifici.

#### ❖ **CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI**

1. Lo studio microscopico del campione fornisce solide prove di presenza derivati del grafene, sebbene la microscopia non fornisca a prova conclusiva. L'identificazione definitiva del grafene, grafene ossidato (GO) o grafene ossidato ridotto (rGO) nel campione RD1 richiede la CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE analizzando pattern spettrali paragonabili a quelli pubblicati in letteratura e a quelli ottenuti da di campione standard, ottenuto con tecniche spettroscopiche quali XPS, EDS, NMR, FTIR o tra gli altri Raman.

2. Le analisi in questo rapporto corrispondono a UN SOLO CAMPIONE, limitato in volume totale disponibile per l'elaborazione. È quindi necessario effettuare un campionamento significativo di fiale simili per trarre conclusioni generalizzabile a campioni comparabili, registrazione dell'origine, tracciabilità e controllo di qualità durante lo stoccaggio e il trasporto prima dell'analisi.

*Napoli, 05 luglio 2021.*

*Ing. Vincenzo Marcello Bellini*