



**UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

Dipartimento di Scienze Chimiche  
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari  
Indirizzo Scienze Chimiche  
CICLO XXVIII

**“Nanoparticelle d’oro e tecniche NMR:  
dallo studio della Formazione del  
Monostrato all’Interazione Molecolare”**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonino Polimeno

Supervisore: Prof. Fabrizio Mancin

**DOTTORANDA: Sara Springhetti**



*Alla mia famiglia.*

*A mamma, sempre così premurosa e presente.*

*A papà, lavoratore instancabile.*

*A mia sorella, per essere la mamma di due pesti che adoro.*

*A Davide, perché con te tutto diventa magia.*



*Someone once said...*  
*“Work is the bridge*  
*Between dreams and reality.”*  
*So, just be warned:*  
*if you have big dreams*  
*Be ready for a ton of work.*

*-Jared Leto-*



# Indice

---

<b>Riassunto.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduzione Generale .....</b>	<b>19</b>
I. Riconoscimento Molecolare e Chimica host-guest .....	20
II. Self-assembly .....	21
III. SAMs Monostrati Auto-Assemblati.....	22
IV. Nanoparticelle d'oro AuNp .....	23
V. Bibliografia .....	25
<b>SEZIONE A: Il Processo di Formazione del Monostrato di Tioli su Nanoparticelle d'oro .....</b>	<b>27</b>
1. Introduzione.....	29
1.1 Sintesi di Nanoparticelle d'oro.....	29
1.2 Scambio di Tioli.....	31
1.3 Caratterizzazione delle Nanoparticelle .....	33
1.3.1 TEM: Microscopia Elettronica a Trasmissione .....	33
1.3.2 Spettrometria UV-Visibile .....	33
1.3.3 TGA: Termogravimetria .....	34
1.3.4 Spettroscopia NMR .....	35
1.4 Morfologia di Monostrati Misti.....	36

1.5 Studio della morfologia del monostrato .....	37
1.5.1 Spettroscopia NMR & Ioni Lantanidi.....	37
1.5.2 ESR: Risonanza di Spin Elettronico .....	39
1.5.3 MRI: Risonanza Magnetica per Immagini .....	40
1.5.4 STM: Microscopia a Effetto Tunnel .....	41
2. Risultati & Discussione .....	47
2.1 Morfologie del Monostrato .....	47
2.2 Processo di formazione di monostrati misti.....	48
2.2.1 Sintesi del Monostrato Misto Alchile <b>24</b> /Fosforilcolina <b>2</b> e analisi .....	49
2.2.2 Monostrati Misti: Aggiunta simultanea dei tioli .....	52
2.2.3 Monostrati Misti: Aggiunte successive dei tioli .....	53
2.2.4 Monostrati Misti: Aggiunta di nanoparticelle pre-ricoperte .....	57
2.2.5 Monostrati Misti: Scambio dei Tioli .....	60
2.2.6 Monostrati Misti: Effetto della rapporto molare tra i tioli .....	62
2.2.7 Sintesi del Monostrato misto TEGammide <b>1</b> /Fosforilcolina <b>2</b> .....	64
3. Conclusioni .....	69
4. Materiali & Metodi .....	73
4.1 Strumentazione: .....	73
4.2 Materiali.....	74
5. Bibliografia.....	83

## **SEZIONE B: Interazioni del Monostrato delle Nanoparticelle con Piccole Molecole: NMR Chemosensing e Molecular Switches .87**

1. Introduzione.....	89
1.1 Chemosensori.....	89
1.1.1 Sensori fluorescenti .....	91
1.1.2 Sensori colorimetrici basati sull'assorbanza .....	96
1.1.3 Sensori elettrici ed elettrochimici .....	103
1.1.4 Sensori basati sul rilassamento.....	106
1.1.5 Sensori basati sull'NMR .....	107
2. Risultati & Discussione .....	111
2.1 NMR Chemosensing: NOE-PUMPING .....	111
2.1.1 NMR Sensing: AuNp <b>1</b> TEG-Ammide.....	114
2.1.2 NMR Sensing: AuNp <b>2</b> Fosforilcolina.....	118
2.1.3 NMR Sensing: AuNp <b>3</b> TEG-AmmideLong .....	119
2.1.4 NMR Sensing: Test su campioni di urina .....	120
2.2 NMR Sensing: Incremento dell'Affinità .....	122
2.2.1 NMR Sensing: AuNp <b>9</b> Ammonio .....	123
2.2.2 NMR Sensing: AuNp <b>10</b> Piridinio.....	130
2.3 NMR Chemosensing: DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) .....	131
2.4 Studio su altri analiti: Naprossene .....	135
2.5 Affinity NMR: AuNp <b>10</b> Piridinio .....	139
2.6 Molecular Switches .....	141
2.6.1 Azobenzene.....	141
2.6.2 Spiropirano.....	151
3. Conclusioni.....	153

4. Materiali & Metodi .....	157
4.1 Strumentazione .....	157
4.2 Materiali.....	159
5. Bibliografia.....	175
"NMR Chemosensing" using Monolayer-Protected Nanoparticles as Receptors .....	183
Nanoparticle-Assisted NMR Detection of Organic Anions: from Chemosensing to Chromatography.....	187
Ringraziamenti.....	195

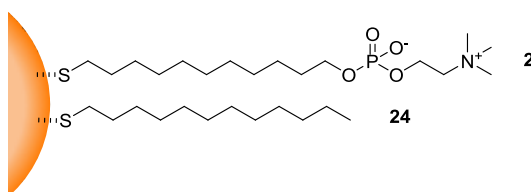




# Riassunto

L'abilità di controllare l'autoassemblaggio di un monostrato organico di molecole che ricopre una nanoparticella d'oro è un'importante meta della ricerca nell'ambito delle nanoscienze. Per guadagnare questa abilità è necessario comprendere non solo la struttura ma anche il processo di formazione del monostrato e la sua evoluzione nel tempo. In questa tesi di dottorato sono stati riportati i risultati ottenuti dallo studio del processo di formazione del monostrato in presenza di coppie di tioli diverse. Utilizzando la sintesi proposta da Peng<sup>1</sup> e successivamente modificata da Scrimin<sup>2</sup>, che permette di gestire in maniera separata la formazione del nucleo d'oro da quella del monostrato di tioli che passiva le nanoparticelle, sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro con monostrato misto e ne sono state studiate composizione, morfologia e funzioni.

In particolare, nell'ambito di questo progetto di dottorato è stato messo a punto un protocollo per la sintesi, l'isolamento e lo studio di nanoparticelle passivate da differenti coppie di tioli, basato sulla loro solubilità. Sono stati selezionati un tiolo a carattere zwitterionico **2** Fosforilcolina e un tipo di tiolo neutro a carattere Alchilico **24** (Fig. A1). Le nanoparticelle che si ottengono hanno delle intrinseche proprietà chimiche e di solubilità che sono diverse dalle proprietà che manifestano le nanoparticelle ricoperte dai singoli tioli.



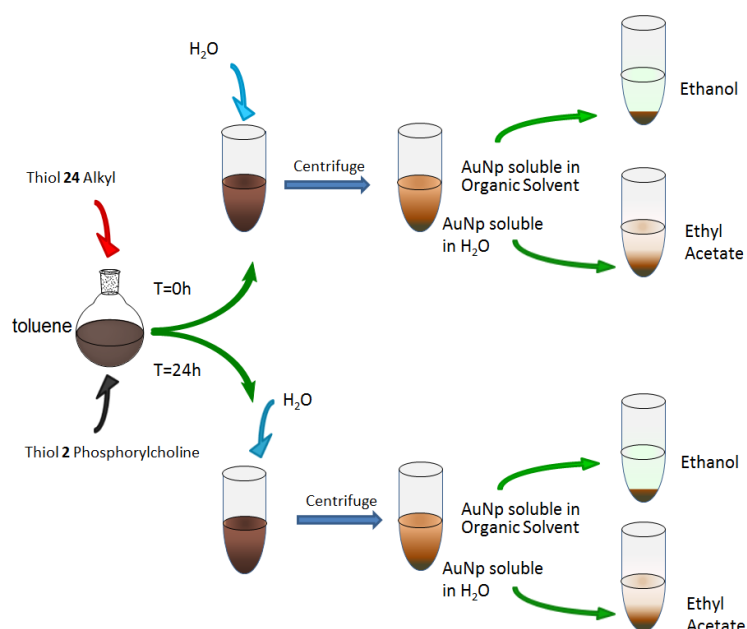
**Figura A1:** Rappresentazione dei tioli che passivano le nanoparticelle.

Le varie popolazioni ottenute vengono separate in base alla loro solubilità e analizzate mediante l'utilizzo della spettroscopia NMR accoppiata con l'uso di ioni lantanidi.

In questi esperimenti, i tioli selezionati vengono aggiunti ad una soluzione di particelle stabilizzate con diottilammina e la miscela di reazione viene immediatamente divisa in

due porzioni. Una delle due viene lasciata sotto agitazione per 24 h, mentre la seconda viene immediatamente interrotta e analizzata ( $t=0$ ). In questo modo è possibile ottenere informazioni sulla composizione dei monostrati appena formati che corrispondono al prodotto cinetico della reazione, e dopo un tempo sufficientemente lungo a far evolvere il sistema verso una situazione termodinamicamente più stabile.

L'analisi prevede due passaggi: 1) viene aggiunta acqua e separata la frazione di particelle idrofile; 2) la miscela di reazione (toluene) viene evaporata ed il residuo purificato per eliminare i reagenti in eccesso (diotilammina e tetraottilammonio) e isolare le particelle (Fig. A2).



**Figura A2:** Schema di separazione delle nanoparticelle in base alla loro solubilità.

Quando i due tioli vengono aggiunti simultaneamente quello che si verifica è una segregazione totale su diverse nanoparticelle, situazione che tende a mutare muovendosi verso la formazione di nanoparticelle miste se i due tioli vengono aggiunti a 24 h di distanza l'uno dall'altro. Quello che sembra verificarsi è un processo complesso: il tiolo **24** Alchilico, il primo ad essere aggiunto, ricopre velocemente alcune particelle per poi ridistribuirsi sulle altre in un tempo relativamente lungo, la successiva aggiunta del tiolo **2** Fosforilcolina congela la situazione permettendo l'analisi. La composizione del monostrato è quindi controllata da un sottile bilancio tra la velocità dei processi coinvolti.

Titolarioni NMR con ioni  $Gd^{3+}$  hanno sottolineato come questa coppia di tioli tenda a disporsi in maniera casuale sul nucleo d'oro, indicando, probabilmente, la formazione di un prodotto cinetico. Se il monostrato misto è invece ottenuto mediante scambio di tioli ciò che emerge è una distribuzione a piccole isole, indicando probabilmente la formazione di un prodotto termodinamico.<sup>3</sup>

Parallelamente, agli studi sulla formazione del monostrato questo progetto di dottorato si è incentrato anche sull'ideazione di un sensore NMR basato su nanoparticelle d'oro, per l'identificazione di molecole interagenti.

Un problema ancora irrisolto nell'ambito dei sensori molecolari è quello di identificare in maniera univoca le molecole rilevate dal sensore in una miscela complessa; infatti spesso ciò che viene rilevato fa parte di una proprietà intrinseca del sensore stesso, ma non fornisce nessuna informazione certa sulla natura dell'analita. E', quindi, facile immaginare, come anche un interferente possa generare la medesima risposta in un sensore. Nel laboratorio dove è stato svolto questo progetto di dottorato è stato messo a punto un nuovo protocollo basato sulla spettroscopia NMR, che permette l'identificazione e la quantificazione di miscele complesse. Infatti, studi precedenti hanno messo in evidenza come le nanoparticelle ricoperte da un monostrato di molecole organiche siano in grado di agire come recettori supramolecolari.<sup>4,5</sup>

Il primo esperimento utilizzato è stata la tecnica *NOE-pumping*<sup>6</sup> (Fig. A3), che utilizza l'effetto nucleare *Overhauser* di diffusione assistita. Il concetto è quello di riuscire a identificare le piccole molecole interagenti da tutte le molecole che non si legano alla nanoparticella attraverso il trasferimento della magnetizzazione da questa agli analiti.

L'esperimento è suddiviso in due parti: la prima è composta da un filtro di diffusione in cui tutte le coerenze delle piccole molecole, ma non delle nanoparticelle, vengono eliminate causando, di fatto, una cancellazione dei segnali delle molecole per la loro veloce diffusione; la seconda parte è composta da un esperimento NOE, alla conclusione del quale, i segnali rilevati derivano dal trasferimento di polarizzazione dalle nanoparticelle, sopravvissute al filtro di diffusione, alle specie che interagiscono con esse. Le nanoparticelle d'oro servono, quindi, a immagazzinare la polarizzazione e a trasferirla selettivamente ai soli analiti "riconosciuti" dalle nanoparticelle stesse.

A questo punto, quindi, i segnali rilevati non derivano dal sensore, ma bensì, direttamente dall'analita.

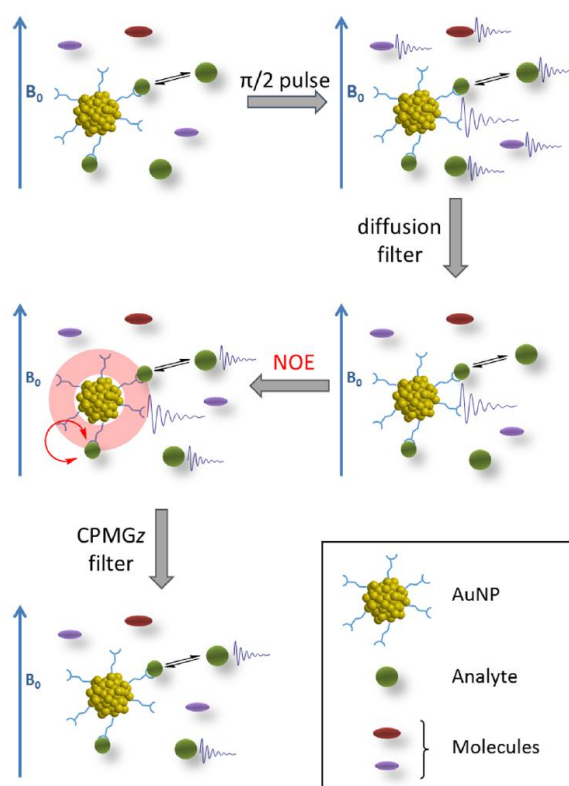


Figura A3: Schema riguardante l'esperimento di "NMR chemosensing".

Quando l'interazione è selettiva e l'analita è in regime di scambio veloce con la nanoparticella nella scala dei tempi della diffusione, la nanoparticella può essere usata come fonte di magnetizzazione che può essere trasferita selettivamente alla molecola interagente sfruttando il NOE. In questo modo, solo i segnali delle specie interagenti saranno visualizzati nello spettro NMR finale, quindi, l'esperimento NOE-pumping permette di discriminare gli analiti per la loro affinità con le nanoparticelle stesse.

Non solo è possibile rilevare molecole interagenti per trasferimento della magnetizzazione, ma anche, per perturbazione dei coefficienti di diffusione, utilizzando la tecnica DOSY. Inoltre, esperimenti condotti su un diazobenzene,<sup>7</sup> hanno permesso di stabilire che queste tecniche possono essere utilizzate per studiare sistemi che possiedono comportamenti responsivi.

✓ **Bibliografia**

- (1) Jana, N. R.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14280.
- (2) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120.
- (3) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Scrimin, P.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7200.
- (4) Perrone, B.; Springhetti, S.; Ramadori, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11768.
- (5) Salvia, M.-V.; Ramadori, F.; Springhetti, S.; Diez-Castellnou, M.; Perrone, B.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 886.
- (6) Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258.
- (7) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 1809.



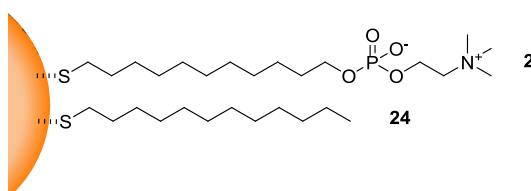


# Abstract

The ability to control the self-assembly of a gold nanoparticle monolayer made of organic molecules is an important goal in nanoscience research. To achieve the control, it is necessary to understand both the monolayer structure and the monolayer formation process and its evolution in time.

In this PhD thesis are reported the results obtained from a study of the monolayer formation process in the presence of a couple of thiols. Exploiting the Peng<sup>1</sup> synthesis protocol and its implementation by Scrimin<sup>2</sup> (that allows the formation of the gold colloid to be separated from the passivation of the surface) mixed monolayer gold nanoparticles have been synthesized and studied concerning their composition, morphology and function.

In particular, the synthesis, the purification steps and the studies have been finely tuned relying on the gold nanoparticles solubility. A Phosphorylcholine, zwitterionic thiol **2** and an Alkyl, neutral thiol **24** have been selected (Fig. A1). The resulting nanoparticles have intrinsic chemical and physical properties that are different from those shown by the relative mono-thiol protected nanoparticles.



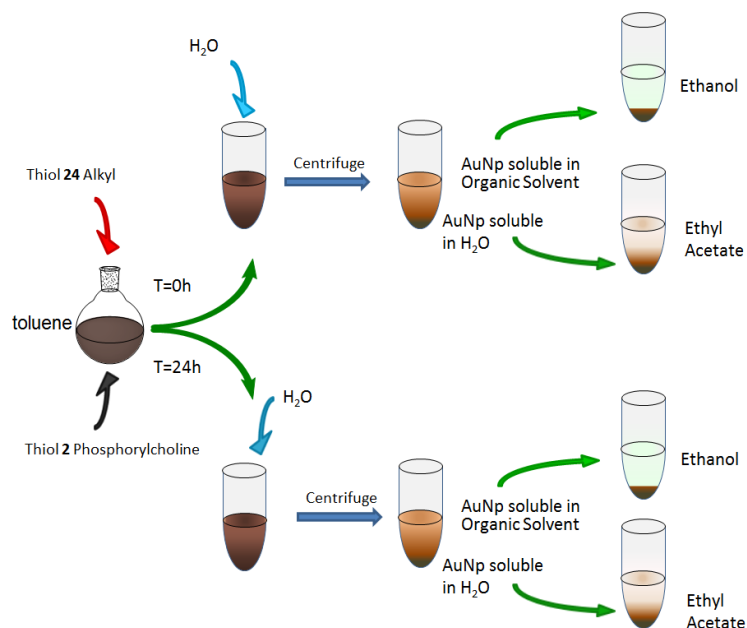
**Figure A1:** Representation of the thiols passivating the nanoparticles.

The different mixed monolayer populations are separated relying on their solubility and analyzed by NMR spectroscopy coupled with lanthanides ions.

In the experimental protocol, the selected thiols are added onto a solution of gold nanoparticles stabilized with dioctylamine and the reaction mixture is immediately splitted. The first portion is allowed stirring for 24 hours, while the second portion is readily analyzed (t=0). In this way it is possible to obtain information about the early monolayer composition that is the kinetic product of the reaction. Moreover allowing

the system stirring for 24 hours it is possible to obtain information about the thermodynamic product of the reaction too.

Purification requires two steps: 1) water is added to the reaction mixture and the hydrophilic nanoparticles are extracted; 2) the remaining reaction mixture (toluene) is evaporated and the residue is washed to eliminate the reagent excess (dioctylamine and tetraoctylammonium) and to isolate the hydrophobic nanoparticles (Fig. A2).



**Figure A2:** Separation protocol of the nanoparticles relying on their solubility.

When the thiols are simultaneously added, what happens is a total segregation on different nanoparticles. This situation changes if the thiols are added within a 24 hours delay: in this case mixed monolayer nanoparticles are obtained. The process seems to be very complex: the Alkyl **24** thiol (the first thiol to be added) rapidly and completely covers some nanoparticles and equally redistributes in a longer time. The following thiol Phosphorylcholine freeze the system allowing the analysis. The monolayer composition is hence driven by the velocity of the involved processes.

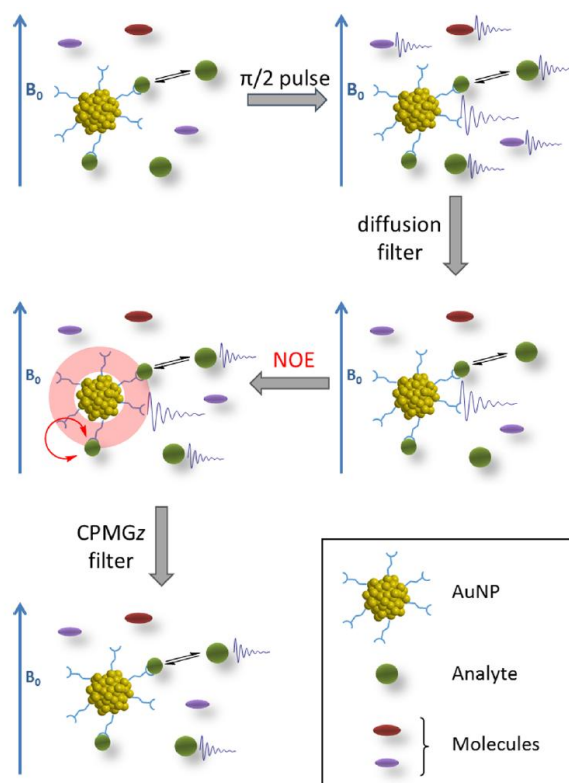
NMR titrations with  $Gd^{3+}$  ions marked the tendency of this couple of thiols to randomly cover the nanoparticle surface, indicating the probable formation of a kinetic product. On the other hand, if the mixed monolayer is obtained by thiol exchange, the results show the formation of patches monolayer, indicating the probable formation of a thermodynamic product.<sup>3</sup>

Beside the monolayer formation studies, the PhD focused also on the creation of a NMR sensor basing on gold nanoparticles for the identification of interacting molecules.

One of the biggest problem with molecular sensors is the univocal identification of the molecules in a complex mixture; in fact what is normally detected is a variation of a property of the sensor and not a property of the analyte. This may lead to false positive/negative results because even and interfering molecules could give the same results as the analyte. A new protocol based on NMR spectroscopy that allows the identification and the quantification of complex mixtures is shown.<sup>4, 5</sup>

Previous studies marked that organic monolayer protected nanoparticles act as a supramolecular sensor. The first experimental protocol exploits the NOE-pumping technique<sup>6</sup> (Fig. A3), the Overhauser nuclear effect assisted diffusion. The principle is to discriminate little interacting molecules from non-interacting molecules by magnetic transfer of the nanoparticle to the interacting analytes.

The experiment is divided in two steps: the first features a diffusion filter that eliminates all the coherences of little molecules (not the nanoparticles') basing of their fast diffusion coefficients; the second features a NOE experiment where the signals come from the polarization transfer from the nanoparticle, that survived the diffusion filter, to the interacting molecules. Hence, gold nanoparticles are polarization storages and selectively transfer it to the interacting analytes. The resulting signals directly come from the analytes and not from the sensor.



**Figure A3:** Schema riguardante l'esperimento di "NMR chemosensing".

When interaction is selective and the analyte rapidly exchanges with nanoparticles in the diffusion time scale, nanoparticles can serve as magnetization source that can be selectively transferred to the interacting molecule. In this way, only the signals of the interacting molecules will appear on the final NMR spectrum demonstrating that NOE-pumping is a useful technique to discriminate analytes basing on their affinity for the nanoparticles.

Interacting molecules can also be detected by diffusion coefficient perturbation exploiting DOSY technique. Furthermore, experiments performed on diazobenzene,<sup>7</sup> showed that these techniques can be exploited to study system with responsive behaviours.

✓ **Bibliografia**

- (1) Jana, N. R.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14280.
- (2) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120.
- (3) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Scrimin, P.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7200.
- (4) Perrone, B.; Springhetti, S.; Ramadori, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11768.
- (5) Salvia, M.-V.; Ramadori, F.; Springhetti, S.; Diez-Castellnou, M.; Perrone, B.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 886.
- (6) Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258.
- (7) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 1809.





# Introduzione Generale

---

## Chimica Supramolecolare

La chimica supramolecolare nasce come ramo della chimica organica ed è ora una delle aree della chimica sperimentale tra le più popolari ed in rapida crescita; la sua interdisciplinarietà la rende un terreno di costante sperimentazione attraendo gli interessi non solo di chimici organici, inorganici e analitici, ma anche di biologi, biotecnologi, ingegneri, fisici e molti altri.

Due importanti chimici hanno cercato di definire il concetto di chimica supramolecolare:

“La chimica supramolecolare è la chimica del legame intermolecolare e prende in esame le strutture e le funzioni di nuove entità chimiche che si formano in seguito all’associazione tra due o più specie chimiche diverse.”

Jean Marie Lehn<sup>1</sup>



“La chimica supramolecolare può essere definita come la chimica “oltre le molecole”, la chimica delle interazioni intermolecolari. In una supramolecola le informazioni sono conservate sotto forma di aspetti strutturali specifici.”

Fritz Vögtle<sup>2</sup>

La chimica supramolecolare si basa su due principi fondamentali: le interazioni deboli e la complementarità.

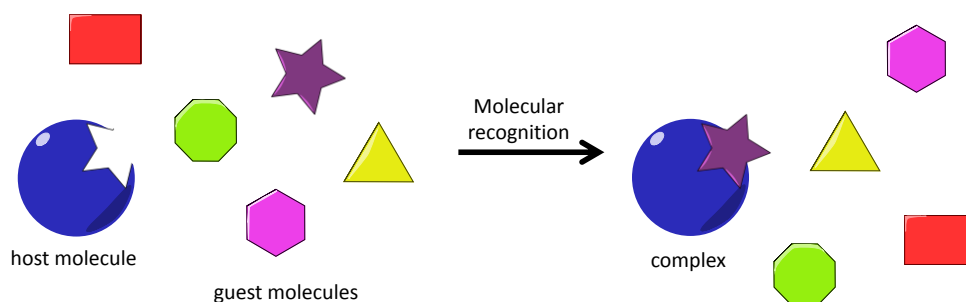
Storicamente, le supermolecole derivano dall'associazione di due o più molecole attraverso legami non covalenti, quali le interazioni elettrostatiche, quelle idrofobiche, i legami a idrogeno, i  $\pi$ -*stacking*, i legami di coordinazione. La presenza dei legami deboli garantisce al sistema la reversibilità. Recentemente, la chimica supramolecolare ha allargato il suo interesse ai legami covalenti reversibili. Questi infatti, pur non essendo interazioni deboli, garantiscono la reversibilità accompagnata da una maggior stabilità delle supramolecole (più correttamente, molecole reversibili) che li implementano.

Il concetto di complementarità si riferisce alla corrispondenza reciproca tra le parti della supramolecola. Esso si estende a forme, superfici e cariche tra le molecole che si vogliono far interagire ed è, quindi, legato al concetto di selettività.

## ***I. Riconoscimento Molecolare e Chimica host-guest***

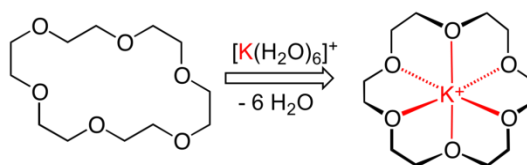
La chimica *host-guest*, che dà attuazione pratica al concetto di riconoscimento molecolare, riunisce i due concetti appena descritti, la presenza di interazioni deboli e la complementarità.

Il processo di riconoscimento molecolare avviene attraverso una serie di interazioni intermolecolari, strutturalmente ben definite, in cui la formazione dei legami deboli tra i gruppi funzionali del substrato (*host*) con i gruppi funzionali del recettore (*guest*) consente la formazione selettiva della macromolecola (Fig. I.1)



**Figura I.1:** Schematizzazione del riconoscimento molecolare: la molecola *host* presenta il sito di legame vuoto, mentre le varie molecole *guest* sono libere in soluzione. In seguito al riconoscimento molecolare si ha la formazione del complesso *host-guest* con il recettore esatto.

Uno dei primi esempi di sistemi atti ad esibire il riconoscimento molecolare è rappresentato dagli eteri corona, composti in grado di legare selettivamente specifici cationi (Fig. I.2).



**Figura I.2:** Riconoscimento molecolare di un 18-corona-6 etere per uno ione potassio.

## II. Self-assembly

Un altro concetto di enorme importanza che sta alla base della chimica supramolecolare è l'auto-assemblaggio. Questo è un processo spontaneo e reversibile tramite il quale le molecole si organizzano in strutture ordinate e ben definite utilizzando interazioni non covalenti. La prima proprietà dei sistemi auto-assemblanti appena suggerita è la spontaneità: le interazioni responsabili della formazione del sistema agiscono strettamente a livello locale e, in altre parole, determinano una strutturazione autonoma della nanostruttura che si costruisce da sola.<sup>3</sup>

Tre sono le caratteristiche che identificano in maniera distinta il concetto di auto-assemblaggio. La prima è l'ordine. Le strutture auto-assemblate sono altamente ordinate rispetto ai componenti isolati. Il secondo importante aspetto è rappresentato dalle interazioni deboli, che giocano un ruolo primario nell'assemblaggio di queste strutture, garantendo la reversibilità del processo e la sua evoluzione verso la struttura

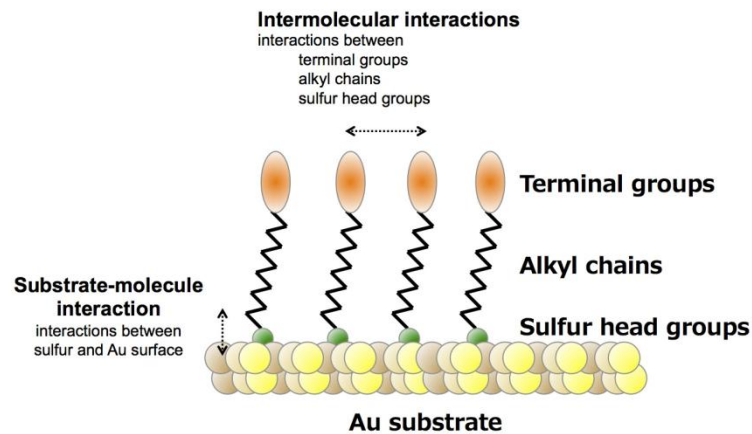
termodinamicamente più stabile. La terza caratteristica è definita dal fatto che la struttura base (*building block*) può essere composta anche da strutture nano- e mesoscopiche e non solo da atomi e molecole.<sup>4</sup>

Molti sono gli esempi di strutture auto-assemblanti, quali i cristalli molecolari, i colloidi, il doppio strato lipidico e i monostrati auto-assemblati.<sup>5</sup>

### ***III. SAMs Monostrati Auto-Assemblati***

I monostrati auto-assemblati (SAMs Self-Assembled Monolayers) costituiscono un sistema di grande interesse per comprendere il fenomeno dell'auto-organizzazione, la relazione tra struttura e proprietà e i fenomeni che si instaurano all'interfaccia tra il monostrato medesimo ed il *bulk*. I monostrati auto-assemblati si formano per adsorbimento di costituenti molecolari da una soluzione o da fase gassosa sulla superficie di solidi in un processo in cui gli adsorbati si organizzano spontaneamente in strutture cristalline o semi-cristalline. Le molecole o ligandi che formano i SAMs aderiscono alla superficie poiché presentano un'opportuna funzionalità chimica che manifesta una specifica affinità per la stessa: diverse funzionalità permettono l'adesione a specifici metalli, ossidi di metalli e semiconduttori.

Nel caso dei monostrati più studiati, cioè quelli costituiti da tioli alchilici su lamine di oro, argento, rame, palladio, platino e mercurio, il gruppo tiolico mostra un'elevata affinità per la superficie di metalli nobili e di transizione; ciò permette di ottenere superfici organiche ben definite che possono presentare funzionalità chimiche modificabili e che determinano le proprietà dell'interfaccia esposta all'ambiente esterno.<sup>6</sup>



**Figura I.3:** Schema di un SAM in cui sono visibili i vari componenti: il substrato d'oro, i gruppi funzionali dei ligandi che interagiscono con la superficie (gruppi tiolici), lo *spacer* composto dalle catene alchiliche e i gruppi funzionali terminali che si occupano dell'interazione con l'ambiente esterno.

Il monostrato più studiato e descritto è quello costituito da tiolati alchilici che formano strutture altamente ordinate e organizzate su sottili film d'oro (Fig. I.3).

L'oro, per alcune delle sue caratteristiche, è considerato un buon substrato per studiare i SAMs; innanzitutto è facile da ottenere sia in forma di film sottile sia in quella di colloidale, è un materiale facile da modellare e piuttosto inerte da poter essere manipolato in condizioni ambientali. Inoltre, l'oro è un materiale biocompatibile che interagisce con le cellule senza manifestare un'evidente tossicità.<sup>6</sup>

#### ***IV. Nanoparticelle d'oro AuNp***

Un'importante classe di materiali nanometrici è rappresentata dai colloidali e dai nanocristalli; queste strutture tipicamente presentano un diametro che può variare da 1 a 20 nm e sono composti da metalli, ossidi di metalli o semiconduttori.

Le piccole dimensioni di questi materiali generano delle proprietà fisiche uniche quali il superparamagnetismo, la fluorescenza con elevate rese quantiche ecc. Le proprietà appena descritte rendono le nanoparticelle estremamente utili in campo biologico, ma anche nella catalisi, nei materiali e nella diagnostica. In molti casi, queste nanoparticelle sono ricoperte da SAMs di molecole opportune (tioli per le particelle d'oro, carbossilati o fosfati per le particelle di ossidi di ferro, ecc.), la cui struttura dipende grandemente dalla curvatura e dai difetti presenti sulla superficie. Questi

SAMs svolgono simultaneamente due ruoli: stabilizzano la superficie delle particelle e presentano dei gruppi funzionali all'interfaccia particelle-solvente.

Tra molti tipi di nanoparticelle, quelle d'oro hanno maggiormente attratto l'interesse per una combinazione di proprietà fisiche e chimiche uniche. Le nanoparticelle d'oro sono composte da un nucleo d'oro passivato da un monostrato di molecole organiche, tipicamente tioli. La formazione del nanosistema avviene mediante un processo *self-assembly* guidato dalla formazione del legame stabile Au-S, che porta alla formazione di un sistema multivalente con elevata stabilità.<sup>7,8</sup> La formazione delle nanoparticelle d'oro (e di altri metalli) può avvenire attraverso due principali strategie: la riduzione di sali metallici o l'aggregazione controllata del metallo nello stato di ossidazione zero. La prima strategia sintetica riportata è quella maggiormente utilizzata.

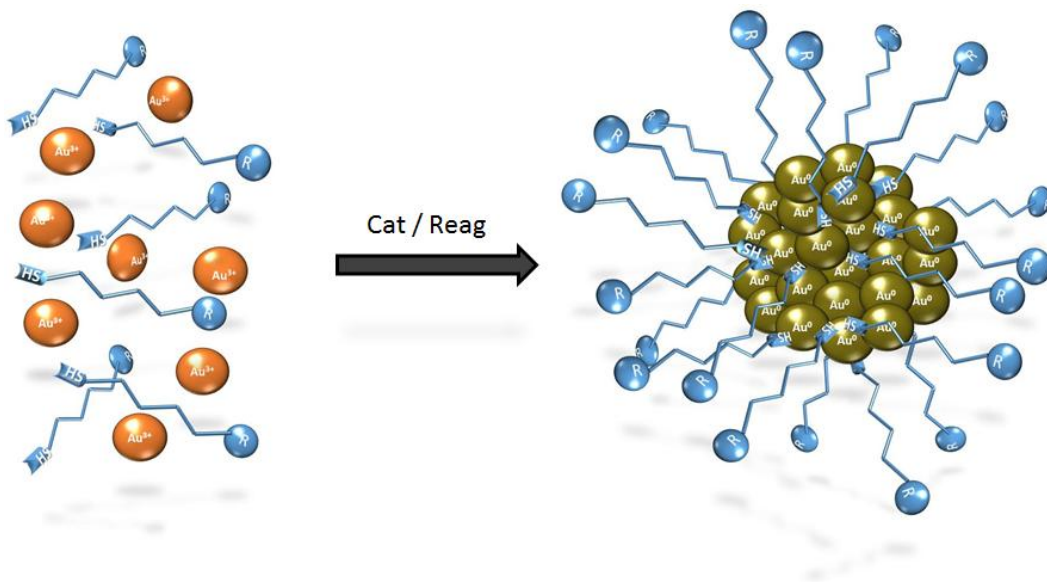


Figura I.4: Rappresentazione schematica della formazione di nanoparticelle d'oro a partire dai costituenti base.

## ***V. Bibliografia***

- (1) Lehn, J.-M. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1988**, 27, 89.
- (2) J.L. Atwood, J. E. D., D.D. MacNicol, F.Vogtle and J.-M. Lehn, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon, 1996.
- (3) Schreiber, F. *Progress in Surface Science* **2000**, 65, 151.
- (4) Whitesides, G. M.; Boncheva, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 4769.
- (5) Kumar, A.; Abbott, N. L.; Biebuyck, H. A.; Kim, E.; Whitesides, G. M. *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 219.
- (6) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chemical Reviews* **2005**, 105, 1103.
- (7) Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W. *Accounts of Chemical Research* **2000**, 33, 27.
- (8) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chemical Reviews* **2004**, 104, 293.







# SEZIONE A

Il Processo di Formazione del Monostrato di  
Tioli su Nanoparticelle d'Oro



# 1. Introduzione

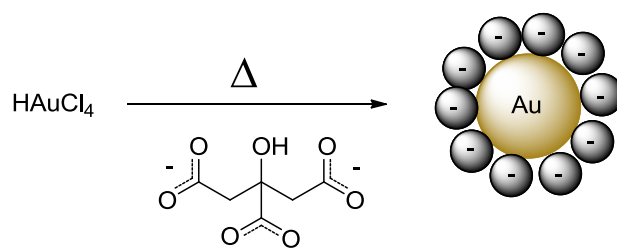
---

## ***1.1 Sintesi di Nanoparticelle d'oro***

La formazione di nanoparticelle metalliche può avvenire attraverso due principali strategie: la riduzione di sali metallici o l'aggregazione controllata del metallo nello stato di ossidazione zero. La prima strategia sintetica riportata è quella maggiormente utilizzata.

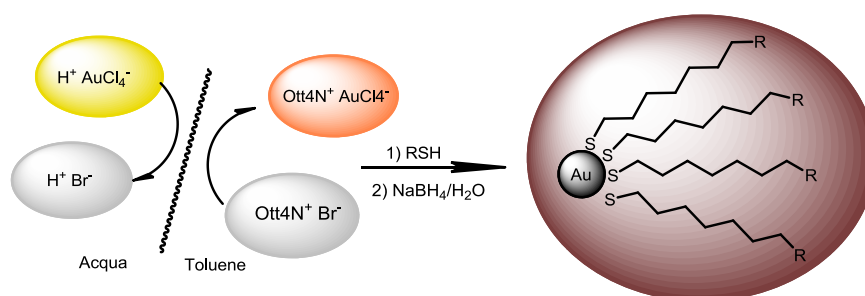
Diverse sono le possibilità sintetiche di ottenere nanoparticelle d'oro in soluzione, quali il metodo di Turkevich, quello ideato da Brust e Schiffrin oppure ancora quello di Peng-Scrimin.<sup>1</sup>

Il metodo messo a punto da Turkevich, nel 1951, sintetizza nanoparticelle omogenee in acqua di dimensioni comprese tra i 10 e 50 nm di diametro utilizzando un sale di oro, generalmente l'acido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), e il sodio citrato, che ha la doppia funzione di agire sia come riducente che come stabilizzante (Fig. 1.1).<sup>2</sup>



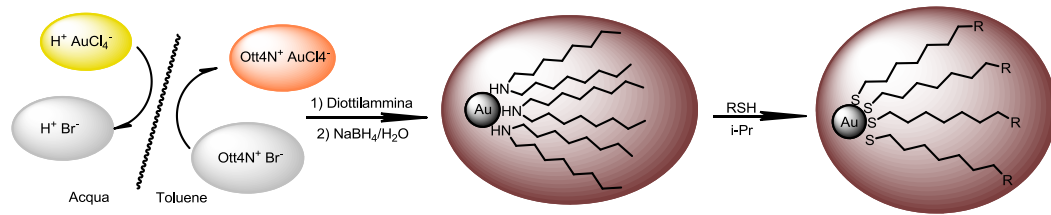
**Figura 1.1:** Schema di sintesi di nanoparticelle d'oro secondo il metodo Turkevich.

Il metodo riportato da Brust e Schiffrin è anche noto con il nome di sintesi in due fasi (Fig. 1.2). Si ottengono nanoparticelle di grandezza relativamente uniforme, di diametro tra 1.5 e 5 nm, dalla riduzione dell'acido tetrachloroaurico. Questo, inizialmente sciolto in acqua, viene trasferito in toluene grazie all'utilizzo di tetraottilammonio bromuro (TOABr). La riduzione ad oro metallico avviene aggiungendo sodioboridruro acquoso, ( $\text{NaBH}_4$ ) alla soluzione in presenza del tiolo. Il tetraottilammonio agisce come trasferitore di fase mentre il tiolo passiva la superficie della nanoparticella controllandone la superficie.<sup>3</sup>



**Figura 1.2:** Schema sintetico del metodo Brust-Schiffrin.

Il metodo inizialmente proposto da Peng<sup>4</sup> e poi modificato da Scrimin (Fig. 1.3) è, come la precedente, una sintesi in due fasi, si parte dal medesimo sale d'oro trasferito in toluene grazie allo stesso trasferitore di fase. In questo caso, però, il controllo dimensionale ed una prima parziale riduzione sono affidati alla diottilammina (DOA); la riduzione con  $\text{NaBH}_4$  porta alla formazione delle nanoparticelle (stabilizzate dalla diottilammina), e la successiva aggiunta dei tioli porta alla formazione del monostrato per sostituzione dell'ammina.<sup>5</sup>



**Figura 1.3:** Schema sintetico del metodo Peng-Scrimin.

Per ottenere particelle monodisperse deve avvenire, innanzitutto, una rapida nucleazione che porti la concentrazione di precursore (gli atomi di Au(0)) sotto la concentrazione critica di nucleazione (la soluzione rimane comunque sovrasatura). Successivamente, la crescita dei nuclei consuma i precursori rimasti. Una concentrazione di precursori sufficientemente alta da dar luogo alla nucleazione può essere ottenuta per decomposizione dei precursori metallici ad alte temperature oppure per veloce aggiunta di riducente ad una soluzione di sali di oro. Per controllare la velocità di crescita e limitare l'aggregazione devono essere aggiunti surfattanti (tioli per la sintesi di Brust e ammine per quella di Scrimin) alla soluzione durante la formazione delle nanoparticelle, che ha il compito di abbassare l'energia libera della superficie delle nanoparticelle, diminuendone la reattività.

## 1.2 Scambio di Tioli

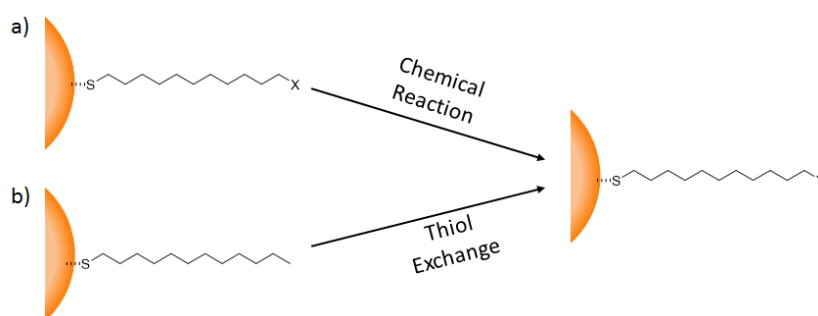
Il monostrato della nanoparticella può subire delle modifiche anche dopo il processo di sintesi, due risultano essere le strategie per controllarne la morfologia:

- La modifica del tiolo per reazione chimica;
- Il tiolo presente viene scambiato con un altro tiolo funzionalizzato.

È stato dimostrato come i tioli funzionalizzati in posizione terminale possano subire reazioni chimiche che ne modificano la struttura (Fig. 1.4 a). In particolare, reazioni di *coupling* per dare ammidi o esteri sono molto utilizzate, perché sono, innanzitutto, reazioni ben conosciute, facili da eseguire e permettono la formazione di un gran numero di sostituenti diversi.<sup>6</sup>

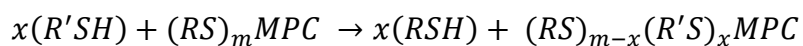
Lo scambio di un ligando (Fig. 1.4 b) con un altro è un secondo metodo per modificare la superficie organica delle nanoparticelle dopo la loro formazione. Questo metodo è

particolarmente utilizzato quando il tiolo con cui si desidera passivare la nanoparticella non riesca a sopravvivere con l'ambiente di reazione eccessivamente riducente, oppure sia estremamente difficile o costoso da ottenere, quindi, non se ne può usare un eccesso, oppure si vogliono ottenere dei monostrati misti che sono difficilmente controllabili in fase sintetica.



**Figura 1.4:** Schematizzazione dei due processi che portano alla modifica della funzionalizzazione del monostrato.

Il meccanismo di scambio dei tioli è stato studiato in modo accurato sia dal punto di vista cinetico che termodinamico; la stechiometria della reazione è 1:1, quindi per ogni tiolo del monostrato che esce ne entra uno che prima si trovava libero in soluzione (eq. 1):

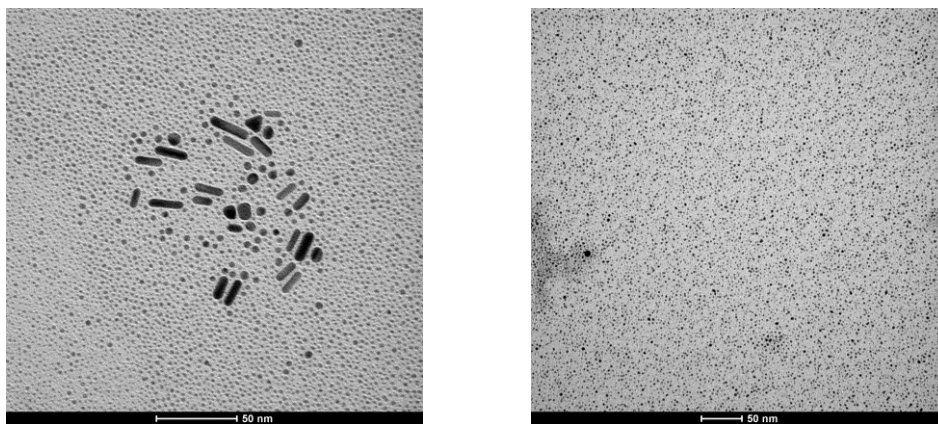


I risultati ottenuti supportano un meccanismo associativo per la reazione di scambio ed inoltre suggeriscono che ad elevate temperature vi sia una piccola quantità di tioli che spontaneamente tende a desorbirsi dalla superficie e che specie ossidate quali, ad esempio, i disolfuri, non danno luogo alla reazione di scambio.<sup>7</sup>

## 1.3 Caratterizzazione delle Nanoparticelle

### 1.3.1 TEM: Microscopia Elettronica a Trasmissione

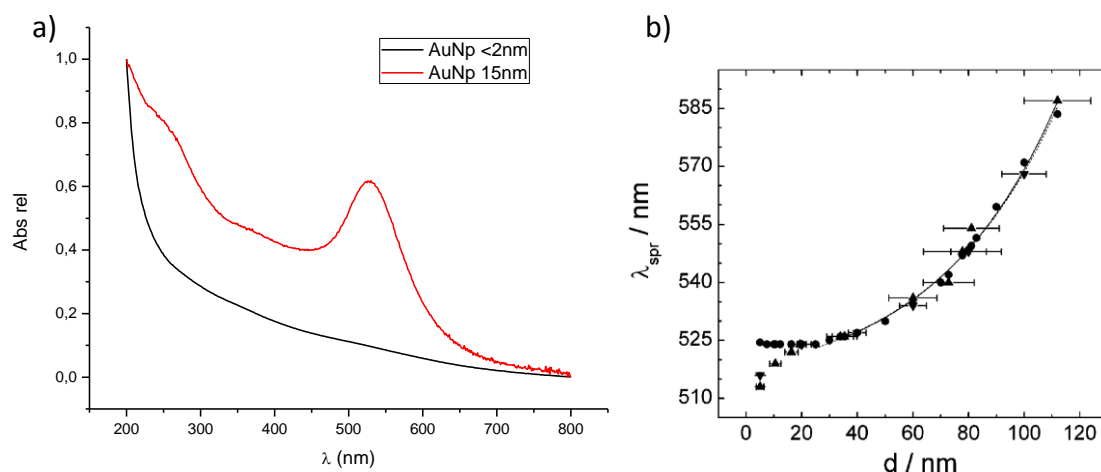
Informazioni sul *nucleo* d'oro, quali ad esempio la forma e la grandezza, si possono ottenere dalla microscopia elettronica a trasmissione, TEM. L'immagine registrata deriva dall'interazione tra un fascio di elettroni emesso dallo strumento che passa attraverso il campione. L'interferenza che il campione induce sul fascio elettronico viene poi convertita in un'immagine visibile come ombra su sfondo; ne consegue che con la tecnica TEM si possono ottenere solo immagini bidimensionali (Fig. 1.5).



**Figura 1.5:** Immagini TEM di nanoparticelle d'oro; a sinistra sono visibili oltre alle nanoparticelle di piccole dimensioni anche delle altre forme.

### 1.3.2 Spettrometria UV-Visibile

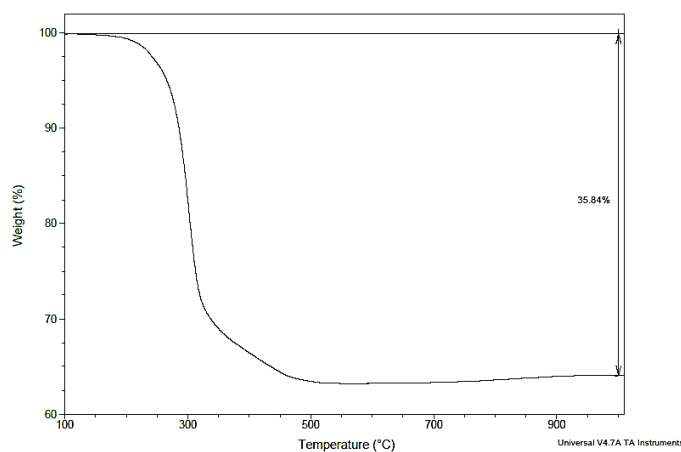
Un modo efficace per ottenere rapidamente informazioni strutturali risiede nella spettroscopia UV/Visibile. Le nanoparticelle con diametro al di sopra dei 2 nm presentano una caratteristica banda di assorbimento intorno a 520 nm nota come banda plasmonica. Tale banda sale a lunghezze d'onda maggiori all'aumentare delle dimensioni medie delle popolazioni presenti nel campione ed è, perciò, un buon metodo per l'analisi dimensionale (Fig. 1.6).<sup>8</sup> L'indagine spettroscopica è molto sensibile e permette, inoltre, di rilevare dei cambiamenti nell'intorno della nanoparticella, come la funzionalizzazione con leganti cromoforici oppure l'aggregazione.



**Figura 1.6:** a) Spettro UV-Vis di nanoparticelle d'oro di due dimensioni, a 2 nm non si vede la plasmonica a 520nm mentre a 15nm è molto visibile. b) Posizione del picco riferito alla plasmonica in funzione del diametro delle nanoparticelle d'oro.<sup>8</sup>

### 1.3.3 TGA: Termogravimetria

Altre tecniche danno informazioni su entrambe le parti della particella. Un'analisi piuttosto usata è la TGA, l'analisi termogravimetrica, con cui è possibile risalire alla composizione del campione in termini di percentuale di massa inorganica rispetto alla massa organica mediante l'ottenimento di un termogravigramma (Fig. 1.7). In particolare, si effettua la registrazione delle variazioni di massa di un campione sottoposto ad un gradiente di temperatura: all'aumentare della temperatura si avrà la combustione o la pirolisi della componente organica (con relativa perdita di massa) e ciò che rimarrà, raggiunta la temperatura più elevata, saranno le specie inorganiche presenti.

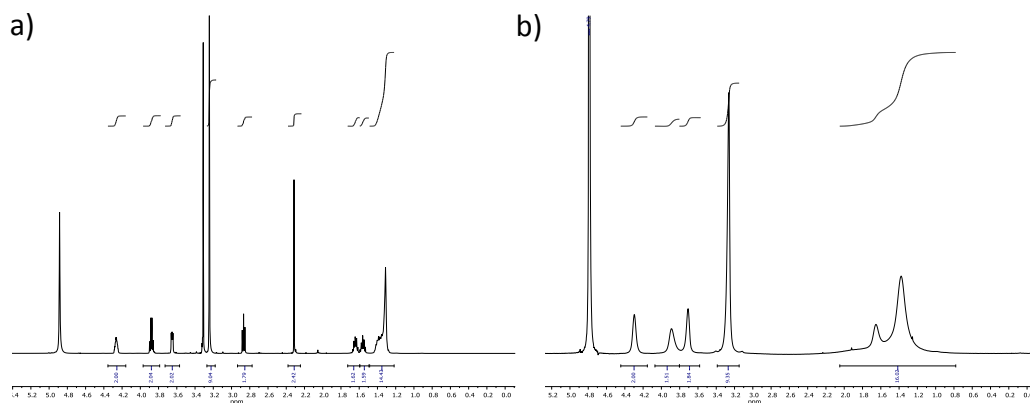


**Figura 1.7:** Analisi TGA effettuata su un campione di nanoparticelle.

Informazioni sulle nanoparticelle possono essere ottenute anche con altre tecniche quali l'XPS (stato di ossidazione e quantità relative), il *neutron scattering* (morfologia), il *dynamic light scattering* (raggio idrodinamico).

### 1.3.4 Spettroscopia NMR

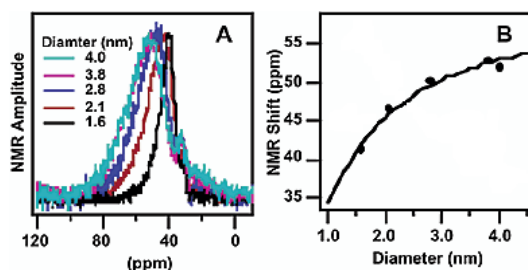
Riguardo la porzione organica, una tecnica di fondamentale importanza e molto utilizzata per studiare le proprietà del monostrato delle nanoparticelle e la sua composizione è la spettroscopia NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . In particolare l'NMR in fase liquida permette di studiare le piccole particelle, circa attorno ai 2 nm. Gli spettri presentano segnali tipicamente allargati senza struttura iperfine se paragonati ad uno spettro standard, i segnali sono tanto più allargati quanto più i protoni considerati sono vicini al nucleo d'oro arrivando addirittura a sembrare assenti (Fig. 1.8).



**Figura 1.8:** Confronto fra lo spettro  $^1\text{H}$ -NMR del tiolo libero (protetto allo zolfo con acetile) a sinistra e stesso tiolo con cui son state passivate le nanoparticelle a destra.

I fattori che contribuiscono a questo effetto sono molteplici: i gruppi metilenici più vicini alla superficie d'oro sono densamente impaccati e quindi possiedono una libertà conformazionale più bassa rispetto ai metileni più lontani, che invece hanno tempi di rilassamento trasversale più simili a quelli dei tioli liberi; la struttura della superficie del *nucleo* metallico produce differenze nei siti di legame e di conseguenza una distribuzione negli spostamenti chimici (*chemical shifts*); il tempo di rilassamento spin-spin ( $T_2$ ) dipende dalla mobilità delle molecole in soluzione che, nel caso di monostrati su nanoparticelle, è piuttosto bassa e varia con la distanza dal nucleo.

All'aumentare delle dimensioni del nucleo, però, non aumenta solo la larghezza dei picchi ma anche il loro spostamento chimico. Marcando il carbonio attaccato allo zolfo, infatti, è possibile correlare lo spostamento chimico del picco  $^{13}\text{C}$  con la grandezza del nucleo delle nanoparticelle (Fig. 1.9).<sup>9</sup>



**Figura 1.9:** a) Spettro  $^{13}\text{C}$  di nanoparticelle passivate con otiliolo marcato in  $^{13}\text{C}_1$  di differenti dimensioni, b) Grafico in cui è riportata la dipendenza dello spostamento chimico dal diametro delle nanoparticelle.

## 1.4 Morfologia di Monostrati Misti

Nanoparticelle con monostrati misti sono molto interessanti poiché, se i tioli vengono scelti con particolare attenzione, permettono di modulare le proprietà della superficie. È, quindi, di estrema importanza comprendere in maniera profonda la morfologia del monostrato, cioè come i tioli si dispongono sulla superficie, se tendono a segregarsi oppure se si dispongono in maniera da generare dei motivi strutturali quali piccole o grandi isole oppure strisce, oppure se tendono a disporsi in maniera completamente disordinata (Fig. 1.10).



**Figura 1.10:** Rappresentazione di alcuni dei possibili motivi strutturali del monostrato in presenza di tioli misti, da sinistra le disposizioni sono: *random*, *patch* o isole, *stripes* e *janus*.

## ***1.5 Studio della morfologia del monostrato***

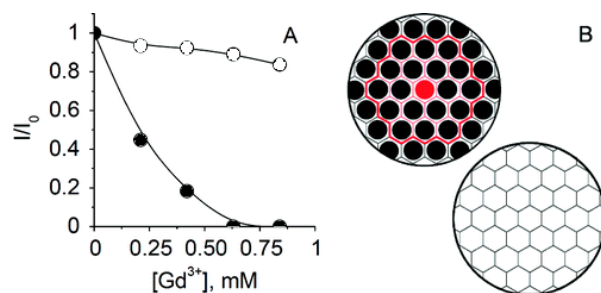
Risulta, quindi, immediatamente evidente come sia di fondamentale importanza la caratterizzazione di queste nanoparticelle. Le tecniche di caratterizzazione si possono distinguere in due classi: quelle che forniscono informazioni sul nucleo d'oro e quelle che analizzano il monostrato, la sua composizione e addirittura la distribuzione dei tioli sulla superficie.

### ***1.5.1 Spettroscopia NMR & Ioni Lantanidi***

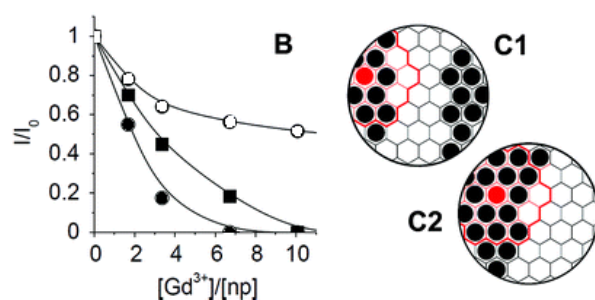
Tra le tecniche descritte per la caratterizzazione delle nanoparticelle, l'NMR si presta anche alla più approfondita indagine della morfologia del monostrato. In particolare, nel gruppo di ricerca in cui il lavoro sperimentale è stato effettuato, l'uso della spettroscopia NMR è stata combinata con l'uso di ioni lantanidi come tecnica per indagare la morfologia dei monostrati misti.

Gli ioni lantanidi sono specie paramagnetiche ampiamente usati nel contesto dell'NMR per la loro abilità di indurre un aumento del rilassamento paramagnetico (PRE). Questo effetto provoca nei segnali degli spin risonanti, che circondano o sono direttamente legati al centro metallico, un allargamento ed eventualmente una scomparsa dallo spettro. In campo biochimico, il PRE è stato ampiamente utilizzato per l'analisi strutturale del sito di legame di uno ione paramagnetico ad una proteina.<sup>10</sup>

Analogamente, analizzando quali segnali vengono rimossi dallo spettro delle nanoparticelle in seguito all'interazione con lo ione lantanide è possibile ottenere informazioni sulla composizione della zona circostante il sito di legame, è, quindi, evidente come diverse morfologie del monostrato generino differenti pattern di segnali allargati. Variando le coppie di tioli utilizzate, si sono rilevate morfologie di tipo "miscela casuale" o a grandi domini ("janus").<sup>11</sup>



**Figura 1.11: a)** Intensità relative dei segnali NMR in funzione della concentrazione di  $Gd^{3+}$  (●○ identificano particelle passivate con due differenti tioli); **b)** Interpretazione schematica dell'esperimento, dove lo ione  $Gd^{3+}$  si lega unicamente al tiolo ●.



**Figura 1.12: b)** Intensità relative dei segnali NMR in funzione della concentrazione di  $Gd^{3+}$  (●○ identificano i due diversi tioli presenti sulla nanoparticella, in cui uno, ● lega il  $Gd^{3+}$ , mentre l'altro, ○ non lo lega, ■ rappresenta i dati per la particella interamente passivata con il tiolo ● che lega il  $Gd^{3+}$ ); **c)** Interpretazione schematica dell'esperimento, dove lo ione  $Gd^{3+}$  si lega unicamente al tiolo ●, che è presente sulla nanoparticella a dare un motivo strutturale a isole.

L'aumento del rilassamento paramagnetico può originare da due meccanismi, uno intermolecolare che è a lungo raggio e varia come  $1/r$  e uno intramolecolare, a corto raggio, che varia come  $1/r^6$ , dove  $r$  è la distanza dal centro metallico allo spin risonante. Dalle figure 1.11 e 1.12 sopra riportate, si vede come siano sufficienti circa 6 ioni gadolinio per rimuovere del tutto il segnale NMR, questo perché ogni ione metallico legato induce il progressivo allargamento dei segnali in  $\sim 12$  tioli vicini. Questo allargamento nel caso di monostrati in cui i tioli si dispongano in maniera casuale si manifesta, anche, per prossimità, ai tioli che non legano il metallo, generando un andamento decrescente per i segnali provenienti da entrambi i tioli a differenza della disposizione a grandi isole o "janus", in cui l'andamento dei picchi relativi ai due tioli sarà estremamente diversificato.

### **1.5.2 ESR: Risonanza di Spin Elettronico**

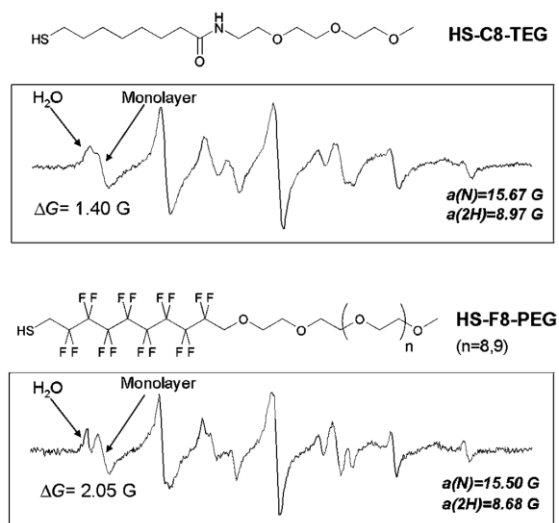
Un'ulteriore tecnica utilizzata per analizzare la composizione del monostrato è la risonanza di spin elettronico, ESR. Questa tecnica prevede l'uso di radicali organici stabili, i cui elettroni spaiati, se esposti ad un forte campo magnetico, assorbono radiazioni nelle microonde. L'ipotesi che sta alla base di questo protocollo è che il segnale prodotto dal radicale risenta in modo netto dell'intorno in cui è immerso. La scala dei tempi dell'esperimento ESR è sufficientemente piccola da consentire di separare le sonde legate alle particelle da quelle in soluzione, derivando, in questo modo, la costante di associazione della molecola al monostrato.

Ad esempio, l'associazione del radicale nitrossido, utilizzato come sonda, alle nanoparticelle risulta maggiore quando le particelle sono più piccole, questo perché i tioli sono meno densamente impaccati quando la curvatura è elevata e lasciano degli spazi dove i radicali possano entrare a costo energetico inferiore.<sup>12</sup>

La sonda è anche sensibile alla natura chimica dei leganti, permettendone l'utilizzo nello studio della morfologia del monostrato, ad esempio, si può utilizzare con tioli contenenti una porzione fluorocarburica. Questi presentano proprietà che derivano dallo spiccato carattere anfifilico della molecola. Risultano particolarmente interessanti grazie alla loro elevata idrofobicità e fluorofilicità, che promuovono l'auto-aggregazione, l'organizzazione molecolare, la separazione di fase e l'esclusione di soluti non altamente fluorurati, presentano inoltre elevata inerzia chimica e ottima resistenza alle alte temperature, che sono indice della forza del legame C-F, della bassa polarizzabilità e del carattere elettronegativo del fluoro.<sup>13</sup> Inoltre, grazie all'elevata capacità di solubilizzare ossigeno trovano applicazione in campo biomedico come *carriers* nel rilascio intravascolare di ossigeno, oppure come farmaci antiinfiammatori, poiché prevengono la formazione di liquido nel film fosfolipidico, o ancora come agenti di contrasto per i test ecografici.<sup>14</sup> Di recente è stato riportato il primo esempio di nanoparticelle d'oro idrosolubili ricoperte da un monostrato di tioli fluorurati anfifilici (F8-PEG).<sup>15</sup> Lo spettro ESR del probe nitrossido-derivato, quando localizzato sul monostrato, è caratterizzato da *splitting* dei segnali derivanti da azoto e idrogeno significativamente più contenuto rispetto a quello osservato per monostrati alchilici (C8-TEG) (Fig. 1.13). Questa differenza riflette la minore polarità dell'ambiente



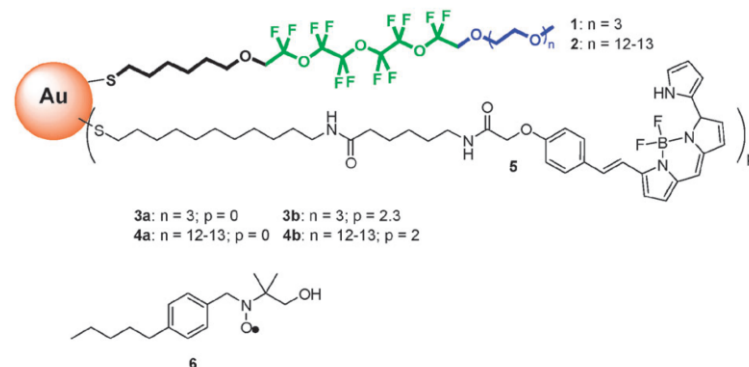
fluorurato e può essere sfruttata per definire la topologia di monostrati misti composti da tioli alchilici o perfluorurati.<sup>16</sup>



**Figura 1.13:** Spettro ESR del *p*-pentilbenzil-(1-idrossi-2-metil-2-propil)nitrossido in presenza di nanoparticelle d'oro passivate con HS-C8TEG (sopra) e HS-F8-PEG (sotto).

### 1.5.3 MRI: Risonanza Magnetica per Immagini

Il nucleo  $^{19}\text{F}$  risulta estremamente importante anche nel campo della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, NMR, poiché possiede elevata sensibilità, oltre ad essere presente in quantità praticamente zero a livello endogeno, caratteristiche che lo rendono un nucleo estremamente importante anche per studi MRI in campo biologico. Le molecole fluorurate proposte come agenti di immagine  $^{19}\text{F}$  sono molte, ma spesso presentano problemi di solubilità in acqua, infatti, vengono emulsionate in micro/nano particelle di lipidi per applicazioni biologiche. La combinazione di una nanoparticella inorganica utilizzata come *scaffold*, passivata da ligandi fluorurati, che possiedono peculiari caratteristiche nel MIR  $^{19}\text{F}$ , può offrire alcuni vantaggi: tra i quali la facilità nell'introdurre altre funzionalità per scopo terapeutico o diagnostico, l'eliminazione dei surfattanti e le dimensioni di questo sistema che è un ordine di grandezza inferiore rispetto alle nanoemulsioni.



**Figura 1.14:** Strutture dei ligandi fluorurati **1** e **2**, del tiolo HS-Bodipy **5**, e della nanoparticella e della sonda radicalica **6**.

Il tiolo HS-Bodipy consente l'ottenimento di immagini anche per fluorescenza; l'aggiunta del radicale nitrossido ne permette l'analisi anche con la tecnica EPR. Le immagini MIR della nanoparticella **4b** (Fig. 1.14) evidenziano come l'internalizzazione a livello cellulare avvenga a livello del citoplasma ma non nel nucleo. Gli studi EPR, in cui la sonda radicalica mima un ipotetico farmaco idrofobico, hanno suggerito che il radicale si disponga all'interno del monostrato e che il gruppo NO è localizzato in prossimità della regione fluorurata.

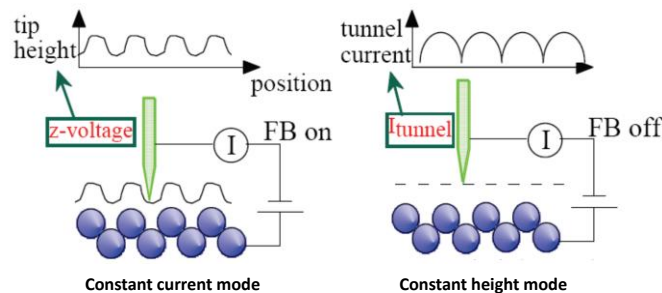
I risultati ottenuti suggeriscono che il monostrato di queste nanoparticelle è in grado di solubilizzare meglio piccole molecole idrofobiche rispetto al monostrato studiato in precedenza.<sup>17</sup>

#### 1.5.4 STM: Microscopia a Effetto Tunnel

Una tecnica di indagine innovativa che ha condotto a importanti scoperte è quella della microscopia a effetto tunnel, STM, utilizzata da Stellacci.

Questa tecnica si avvale dell'uso di un microscopio elettronico che permette di ottenere un'immagine tridimensionale della superficie. Quando una punta metallica conduttrice è portata molto vicino alla superficie che si intende esaminare, una certa differenza di potenziale applicata tra i due può permettere agli elettroni di attraversare il vuoto tra di loro per effetto "tunnel". L'efficacia del "tunneling" dipende dallo spessore della superficie. Si possono usare due modalità per effettuare queste misure (Fig. 1.15), una prevede che l'altezza della punta resti costante, andando, quindi, a

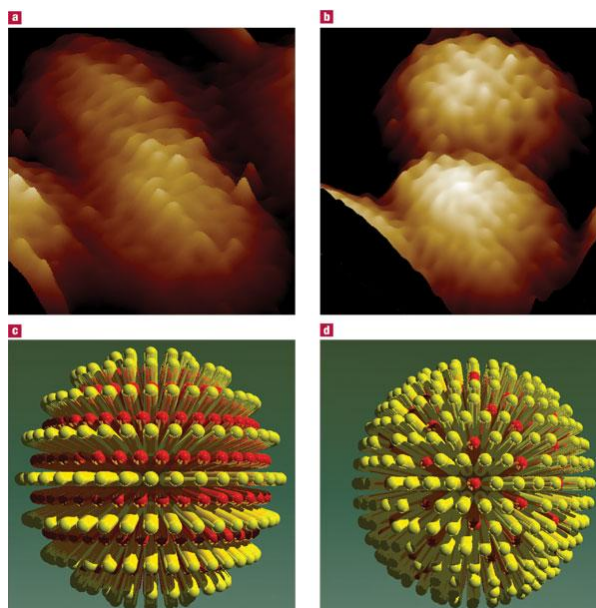
valutare direttamente la variazione di corrente. L'altra prevede che sia la corrente ad essere costante, l'altezza viene modificata costantemente in base alla superficie da dei piezoelettrici. In entrambi i casi l'immagine ottenuta può essere correlata con le variazioni di densità di carica della superficie. Mantenendo, quindi, questa differenza di tensione costante si ha una mappatura della superficie atomo per atomo di ogni nanoparticella.



**Figura 1:** Rappresentazione schematica dei due metodi di misura: a corrente costante (a sinistra), e ad altezza costante (a destra).

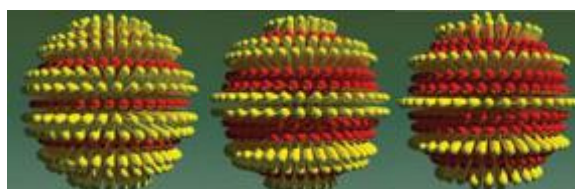
Ottenere immagini STM di nanoparticelle con risoluzione molecolare, non è affatto semplice ed è necessario effettuare la media su numerose immagini al fine di ottenere dei dati significativi.

Le prime osservazioni all'STM di nanoparticelle d'oro composte da due tioli, l'ottantiolo e l'acido mercaptopropionico, in proporzioni 2:1, hanno evidenziato come i ligandi tendano, spontaneamente, ad ordinarsi in domini. Questi domini si allineano in strisce parallele che alle volte si avvolgono a spirale sul *core* della nanoparticella mentre alle volte si allineano semplicemente. Questi domini, ovviamente, non sono presenti su nanoparticelle passivate da un solo tiolo, infatti, le analisi STM rivelano un impaccamento esagonale dei gruppi di testa (Fig. 1.16).



**Figura 2:** Interpretazione tridimensionale delle immagini STM, **a)** Immagine STM di un monostrato misto composto da deciltiolo e acido mercaptopropionico (2:1) dove si vedono le strisce; **b)** Immagine STM di un monostrato misto composto da ottiltiolo e acido mercaptopropionico (10:1) dove non si vedono le strisce; **c)** e **d)** Rappresentazione schematica delle immagini STM.

Una delle proprietà che più hanno attratto l'interesse verso queste particelle è la facilità con cui si può modificare la morfologia del monostrato, per semplice variazione della stechiometria dei reagenti, si può controllare l'altezza delle strisce, la spaziatura e la forma dei domini (Fig. 1.17).<sup>18</sup>

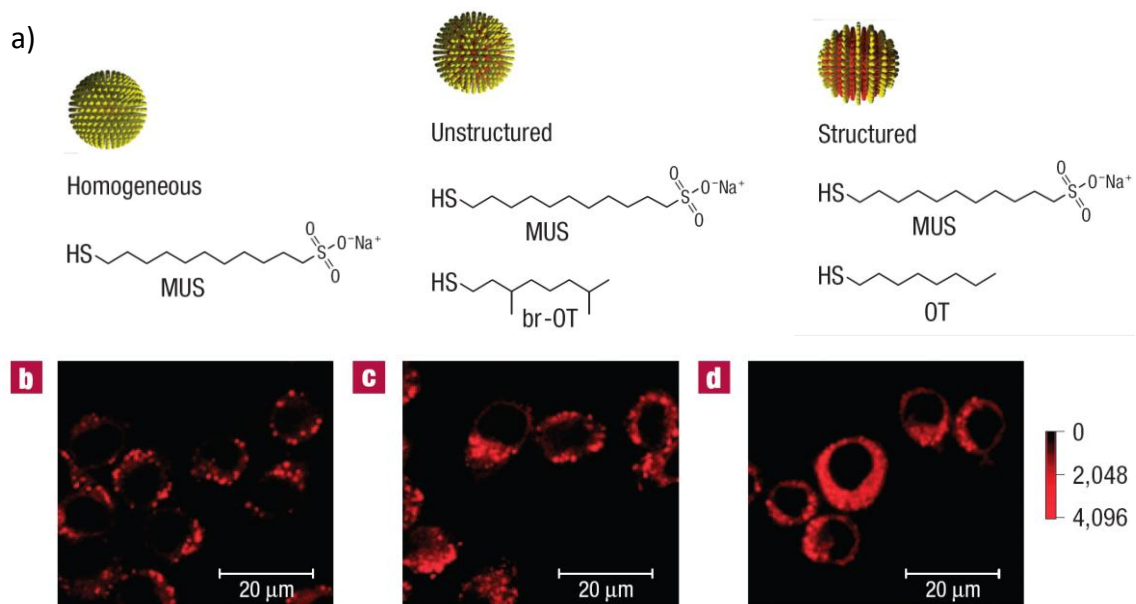


**Figura 1.17:** Rappresentazione schematica della variazione di altezza delle strisce al variare del rapporto molare dei tioli durante la sintesi.

La formazione delle strisce è dovuta alla competizione tra la perdita entalpica e il guadagno entropico al confine tra le fasi, mentre l'allineamento delle strisce potrebbe essere causato dalla curvatura presente nel nucleo. Infatti, si è visto come per nanoparticelle piccole i tioli tendono a disporsi a formare due grandi regioni, mentre per dimensioni più grandi si ha la formazione di strisce ordinate, mentre per dimensioni ancora maggiori del core è preferita la formazione di strisce disordinate o isole. Le nanoparticelle a strisce presentano proprietà uniche, ad esempio, presentano

una solubilità anomala e sono altamente resistenti all'assorbimento non specifico di proteine.<sup>19</sup> Inoltre, considerando la formazione di un monostrato autoassemblato, quindi in due dimensioni, su una superficie tridimensionale, la nanoparticella, l'unica possibilità che ciò avvenga, da un punto di vista vettoriale è che si formino due difetti ai poli opposti della nanoparticella.<sup>20</sup> Questi "poli" sono altamente reattivi e si possono funzionalizzare con reazioni di scambio, ad esempio per generare delle lunghe catene di nanoparticelle. Queste catene non solo sono generate per funzionalizzazione dei tioli ai poli, ma anche dalle dimensioni del nucleo d'oro, infatti, le catene si formano per nanoparticelle di dimensioni comprese tra ~2.5 e ~8.0 nm. Per estensione, questo implica che l'organizzazione a strisce del monostrato esiste solo in uno specifico *range* di dimensioni delle nanoparticelle.<sup>21</sup>

Le proprietà superficiali dei nanomateriali giocano un ruolo fondamentale anche nel determinare la loro interazione con le cellule,<sup>22</sup> infatti, le molecole di dimensioni nanometriche sono tipicamente internalizzate dalle cellule nelle membrane degli endosomi e difficilmente riescono ad avere accesso al citosol. L'analisi di tre tipi diversi di nanoparticelle ha evidenziato come per nanoparticelle composte da un unico monostrato composto da 11-mercapto-1-undecasolfonato vi sia internalizzazione a livello degli endosomi in cellule dendritiche a 37°C (Fig. 1.18 b). Nanoparticelle con monostrato misto ma non strutturato con teste composte da gruppi solfonati e metilici mostrano una distribuzione puntuale nelle cellule dendritiche, ma una bassa fluorescenza nel citosol, come accade per molti tipi di nanoparticelle (Fig. 1.18 c). Risultati molto interessanti sono stati ottenuti analizzando nanoparticelle con monostrato misto composto sempre da teste solfonate e metiliche, ma strutturate, nel caso a dare delle strisce. Infatti, con queste nanoparticelle, è stato registrato un andamento diffusivo della fluorescenza intracellulare, sovrapposto a dei siti puntuali di fluorescenza dovuti a endocitosi. Questo, suggerisce che una parte delle nanoparticelle sia passata nel citosol (Fig. 1.18 d).



**Figura 1.3:** a) Schema che rappresenta i ligandi che compongono i vari monostrati. b, c, d) Immagini di fluorescenza del BODIPY con cui sono state etichettate le nanoparticelle (~14 tioli per nanoparticella) nelle cellule dendritiche incubate con  $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$  delle varie nanoparticelle, per 3 ore in soluzione priva di siero a  $37^\circ\text{C}$ .

Questi esperimenti sottolineano l'importanza della struttura nell'interazione tra nanoparticelle e membrane cellulari.

Ma, la struttura risulta fondamentale non solo nel rapporto con le membrane cellulari, ma anche nel campo della catalisi. Le nanoparticelle sono risultate essere delle buone candidate come enzimi artificiali. La reazione di esterificazione di acidi carbossilici è fondamentale nelle trasformazioni organiche, ma soffre di alcuni problemi tra i quali una bassa velocità di reazione oltre alla reversibilità; catalizzatori acidi sono largamente utilizzati per aumentarne la velocità ma purtroppo possono causare reazioni parassite, corrodere l'attrezzatura, rischi per l'ambiente oltre che una finale difficoltà di separazione dalla miscela di reazione. Molti dei problemi elencati possono essere risolti ancorando il catalizzatore acido ad una nanoparticella, che quindi non è più corrosiva ed è facilmente recuperabile dalla miscela di reazione per centrifugazione o filtrazione. La reazione campione testata è l'acetilazione dell'alcol benzilico, il cui prodotto, l'acetato di benzile, è ampiamente utilizzato come plastificante, solvente, aroma chimico e ancora come precursore in chimica farmaceutica e agroalimentare. Il confronto tra il nuovo catalizzatore basato sulle nanoparticelle e quello normalmente utilizzato in queste reazioni, a base di zeoliti, ha evidenziato come la maggior parte delle nanoparticelle con monostrato misto strutturato a strisce, abbiano una selettività

vicina al 100% rispetto al catalizzatore basato su zeoliti che è attorno all'80%, una conversione per la maggior parte attorno all'80%, paragonato alla zeolite che è solo del 51% e un numero di turnover di oltre 700 rispetto alla zeolite che si aggira attorno all'80. Questi studi aprono, quindi, le porte ad una nuova generazione di enzimi artificiali.<sup>23</sup>

## 2. Risultati & Discussione

---

### ***2.1 Morfologie del Monostrato***

Da quanto esposto nel capitolo precedente, emerge un forte interesse nel comprendere l'intima organizzazione dei leganti che formano il monostrato protettivo delle particelle. Questo ha spinto allo sviluppo di tecniche e tecnologie sempre più innovative per ottenere informazioni sulla struttura del monostrato.

Come già accennato, tioli diversi possono disporsi in vari modi sulla superficie delle nanoparticelle e questo in ragione del tipo di interazioni esistenti fra di essi e del tentativo di ottimizzare l'energia libera del sistema. Oltre alla già citata disposizione a "*stripes*", in cui una coppia di tioli realizza interazioni estremamente ordinate lungo le circonferenze delle nanoparticelle, vi sono altri tipi di disposizioni. Tra queste si possono ottenere la formazione di domini o *patches*, che possono estendersi fino a costituire calotte emisferiche, oppure semplicemente disposizioni casuali (Fig. 2.1).

Va, però, sottolineato come le interazioni interlegante non siano le uniche in gioco. Vi è, infatti, la superficie di oro, probabilmente anisotropa, con cui i tioli stabiliscono la più forte interazione e vi sono ulteriori interazioni con il solvente. Altri parametri da considerare sono quelli entropici, inclusa la libertà conformazionale dei tioli legati alla particella, e cinetici, che riguardano la velocità dei processi di adsorbimento, scambio e movimento laterale.



**Figura 2.1:** Ricostruzioni 3D delle possibili distribuzioni dei tioli sulle nanoparticelle; da sinistra: *random*, *patch*, *stripe* e *janus*.<sup>24</sup>

Gli interrogativi ancora aperti nel campo della disposizione dei tioli sulle nanoparticelle e le ragioni che portano l'organizzazione finale verso un modello o un altro sono un interessante punto di riflessione scientifica e sperimentale.

Lo scopo della tesi è, quindi, quello di cercare di comprendere i meccanismi, sia dal punto di vista cinetico che termodinamico, che guidano la formazione del monostrato delle nanoparticelle.

## ***2.2 Processo di formazione di monostrati misti***

Proprio in ragione della necessità di lavorare con monostrati misti e di doverne studiare la composizione, nell'ambito del progetto di dottorato è stato messo a punto un protocollo per la sintesi, l'isolamento e lo studio di nanoparticelle passivate da differenti coppie di tioli, basato sulla loro solubilità. In queste coppie, un tiolo a carattere zwitterionico **2** Fosforilcolina viene affiancato da un tipo di tiolo neutro a carattere Alchilico **24** (Fig. 2.2). La nanoparticella che si ottiene ha delle intrinseche proprietà chimiche e di solubilità che sono diverse dalle proprietà che manifestano le nanoparticelle ricoperte dai singoli tioli.

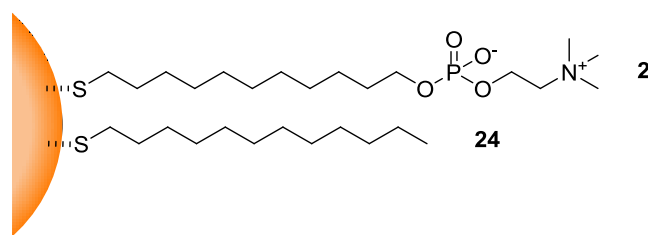


Figura 2.2: Rappresentazione dei tioli che passivano le nanoparticelle.

### 2.2.1 Sintesi del Monostrato Misto:

#### *Fosforilcolina (2)/Alchile (24) e analisi*

Come illustrato precedentemente, il protocollo sintetico preso in esame è quello che prevede la sintesi di nanoparticelle d'oro di circa 2 nm di diametro, che vengono preparate secondo la sintesi Peng-Scrimin (Fig. 2.3). Come spiegato in precedenza, la sintesi avviene in due fasi, acqua e toluene. Il primo stadio inizia con il trasferimento, mediato da tetraottilammonio, dell'anione tetracloroaurato in soluzione organica di toluene contenente diottilammina. La diottilammina agisce tanto da riducente preliminare (l'oro passa dallo stato di ossidazione +3 allo stato di ossidazione +1) che da passivante della superficie ed è in grado di contribuire al controllo dimensionale delle particelle ottenute. Inoltre, essendo un legante debole, subisce facilmente sostituzione da parte dei tioli in maniera estremamente veloce e quantitativa. Altri vantaggi nell'utilizzo di questo protocollo sintetico riguardano le condizioni di reazione, che sono compatibili con un maggior numero di gruppi funzionali, oltre al fatto che la quantità di tioli necessari alla formazione del monostrato finale risulta essere di molto inferiore a quella richiesta dal metodo di Brust e Schiffrin; infine, è possibile utilizzare miscele di tioli diversi ottenendo monostrati misti.

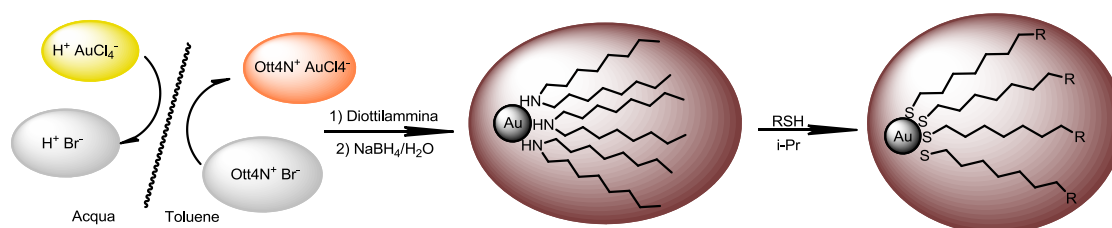
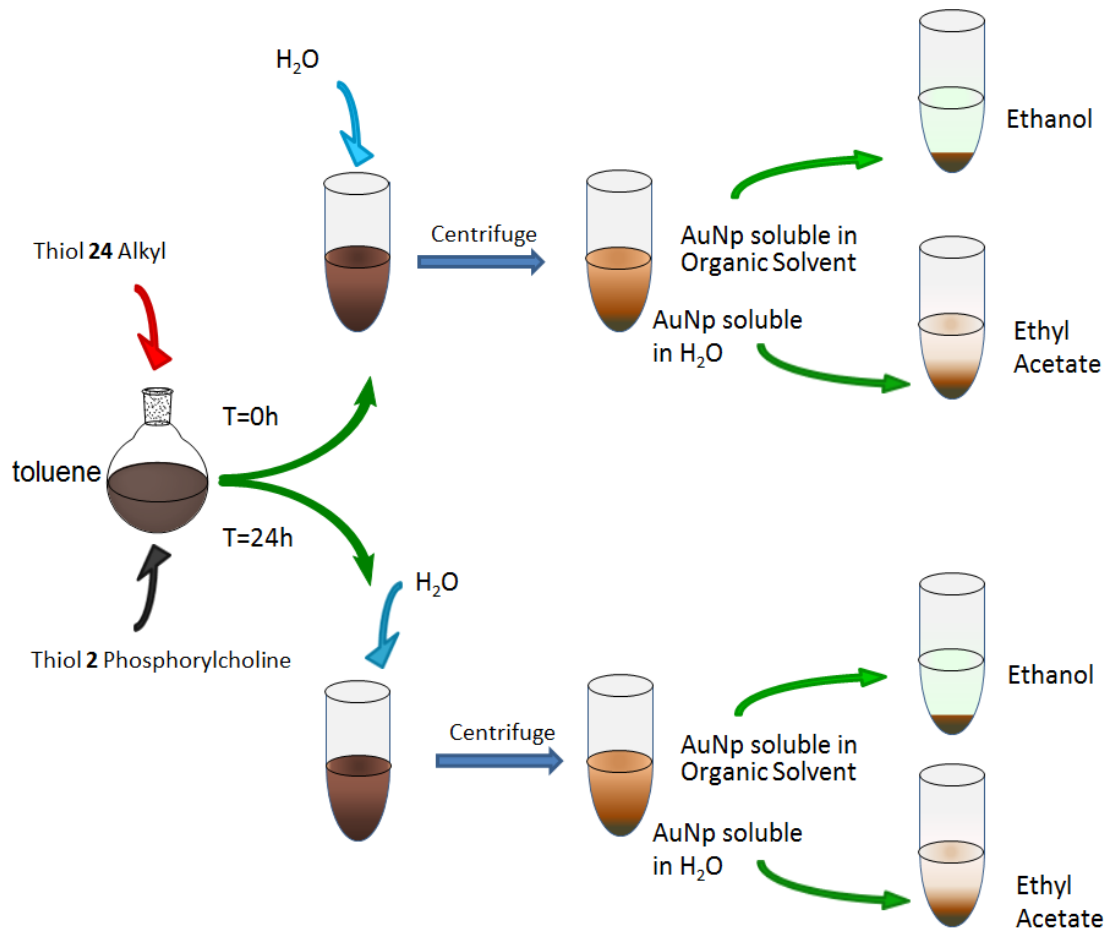


Figura 2.3: Rappresentazione schematica della sintesi di nanoparticelle secondo il metodo Peng-Scrimin.

Riguardo agli scopi prefissati, l'utilizzo di questo protocollo sintetico consentiva un ulteriore vantaggio: quello di separare lo stadio di formazione della particella da quello di formazione del monostrato. Infatti, la maggior parte degli altri protocolli utilizzati per la sintesi di nanoparticelle di oro prevedono la riduzione diretta dei sali metallici in presenza di un largo eccesso (3-5 equivalenti) di tiolo, necessario per garantire il controllo delle dimensioni finali delle nanoparticelle. In queste condizioni, la complessità del sistema è molto più elevata. Infatti, al di là della reazione di chemisorbimento dei tioli sulla superficie della particella, sono presenti molti altri processi quali: aggregazione di complessi oro-tiolato preformati, reazioni di scambio tiolo-tiolo, fenomeni di ricostruzione della superficie d'oro (*etching*). Nel caso della sintesi di Peng-Scrimin, in cui il monostrato di tioli viene assemblato successivamente alla formazione delle particelle, è possibile ipotizzare, in prima approssimazione, che la reazione di chemisorbimento dei tioli (che vanno a sostituire le molecole di diottilammina) sia l'unica rilevante. Infatti, la reazione può essere condotta utilizzando la quantità stechiometrica di tioli necessari a ricoprire la nanoparticella e la ricopertura avviene in tempi molto brevi (minuti). Queste due condizioni permettono di escludere contributi rilevanti sia di processi di scambio di tioli che di *etching*, solitamente piuttosto lenti a temperatura ambiente.

Per confermare questa ipotesi, come primo passaggio sono stati effettuati studi di composizione del monostrato e della sua evoluzione nel tempo. In questi esperimenti, i tioli selezionati vengono aggiunti ad una soluzione di particelle stabilizzate con diottilammina e la miscela di reazione viene immediatamente divisa in due porzioni. Una delle due viene lasciata sotto agitazione per 24 h, mentre la seconda viene immediatamente interrotta e analizzata ( $t=0$ ). In questo modo è possibile ottenere informazioni sulla composizione dei monostrati appena formati (la sostituzione delle ammine con i tioli avviene in pochi secondi), che corrispondono al prodotto cinetico della reazione, e dopo un tempo sufficientemente lungo a far evolvere il sistema verso una situazione termodinamicamente più stabile.

L'analisi prevede due passaggi: 1) viene aggiunta acqua e separata la frazione di particelle idrofile, poi purificate con etile acetato; 2) la miscela di reazione (toluene) viene evaporata ed il residuo nuovamente tritato con etanolo, per eliminare i reagenti in eccesso (diottilammina e tetraottilammonio) e isolare le particelle (Fig. 2.4).



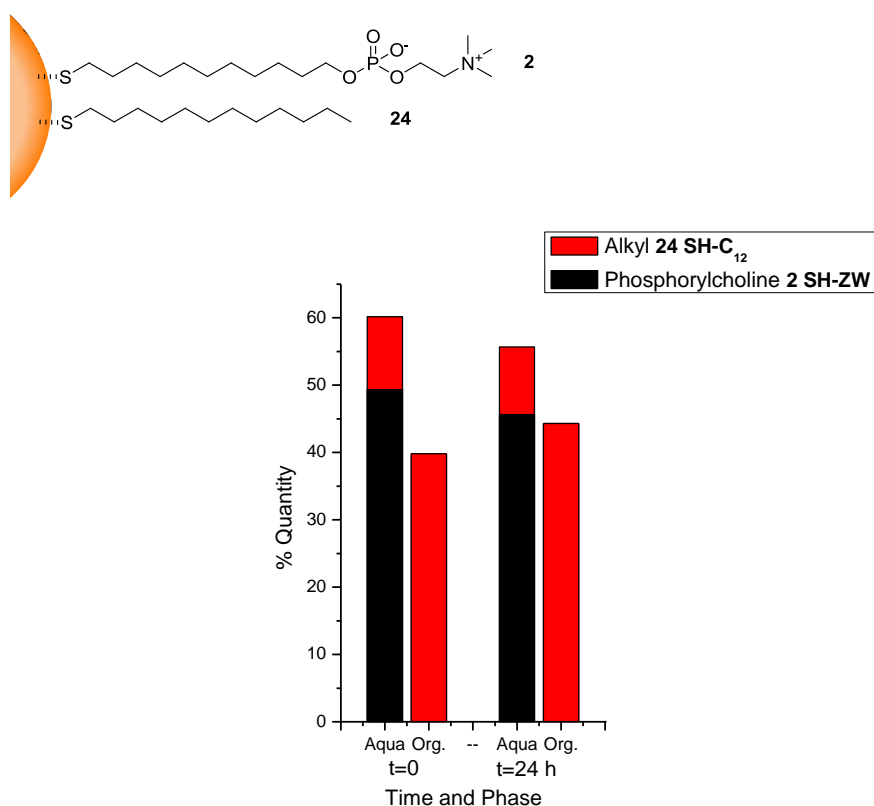
**Figura 2.4:** Schema di separazione delle nanoparticelle in base alla loro solubilità.

I campioni ottenuti sono, quindi, stati analizzati all'<sup>1</sup>H-NMR per verificare la formazione delle nanoparticelle con i relativi tioli: i picchi ottenuti sono molto allargati e perdono completamente la loro molteplicità indicando che i tioli si sono legati alle nanoparticelle.

Per verificare la percentuale relativa dei due tioli sulla superficie si procede trattando una quantità nota di campione con iodio. Lo iodio, agendo da ossidante, stacca i tioli dalla superficie delle nanoparticelle trasformandoli in disolfuri e ne permette un'analisi quali-quantitativa.

### 2.2.2 Monostrati Misti: Aggiunta Simultanea dei tioli

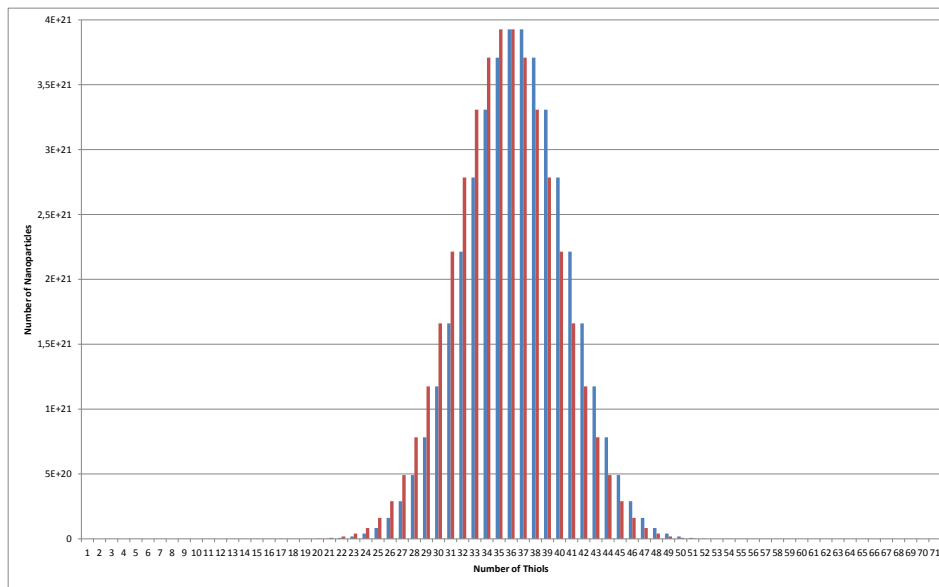
Nel caso della coppia Alchile **24**/Fosforilcolina **2** (Fig. 2.2), questo protocollo porta ad ottenere due popolazioni di particelle in quantità simili: la prima, solubile in acqua, è ricca del tiolo **2** Fosforilcolina (80% ca.), la seconda solubile in fase organica, è ricoperta interamente dal tiolo **24** Alchilico (Fig. 2.5). La composizione media delle due popolazioni immediatamente dopo la formazione del monostrato e dopo 24 ore non presenta differenze rilevanti, confermando che in queste condizioni non vi sono significative reazioni di scambio.



**Figura 2.5:** Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute a tempo 0 e 24 h.

La presenza di queste due popolazioni di nanoparticelle è già di per sé un fatto sorprendente. Infatti, nel caso di una distribuzione completamente casuale dei tioli ci si sarebbe dovuti aspettare una distribuzione binomiale di nanoparticelle con diversa composizione (Fig. 2.6). Come si nota analizzando la figura 2.6, tale distribuzione è piuttosto stretta intorno al valore medio e questo fa sì che sia del tutto impossibile estrarre, in quantità significativa, gruppi di particelle ricche in un solo tiolo. Al

contrario, qualsiasi suddivisione della distribuzione binomiale in due sottoinsiemi quantitativamente simili e caratterizzati da un eccesso di uno dei due tioli, porta ad ottenerne composizioni medie dell'ordine del 40/60%. L'aver ottenuto due popolazioni di particelle, simili per quantità, ma molto differenti in composizione, indica, quindi, che è avvenuto un qualche processo di mutua segregazione dei tioli tra le particelle.



**Figura 2.6:** Grafico della distribuzione binomiale delle composizioni dei monostrati ricoprenti un campione di nanoparticelle funzionalizzate con una miscela di tioli differenti in proporzioni 50/50.

### ***2.2.3 Monostrati Misti: Aggiunte successive dei tiolo***

Gli esperimenti sono, quindi, stati leggermente modificati per comprendere più in dettaglio il processo di formazione del monostrato.

Per questa ragione alle nanoparticelle stabilizzate con diottilammina si sono aggiunti i due tioli in sequenza, piuttosto che simultaneamente, ed a intervalli di tempo differenti. La composizione dei sistemi è stata analizzata come descritto prima (Fig. 2.4). In particolare, questi studi sono stati effettuati utilizzando il tiolo **24** Alchilico, aggiunto per primo, e quello **2** Fosforilcolinico che è stato aggiunto dopo intervalli di tempo di 2 e 60 minuti e 24 ore rispettivamente (Fig. 2.7).

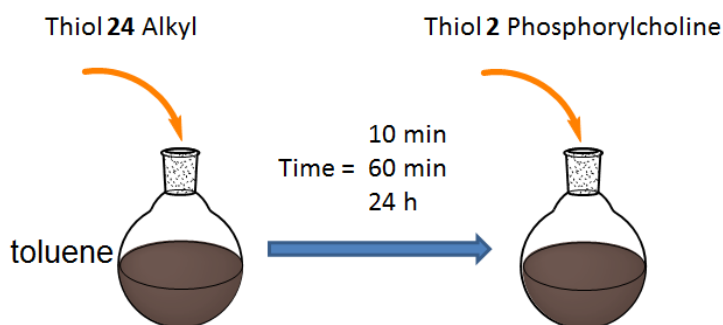


Figura 2.7: Schema di aggiunta separata dei tioli.

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando esattamente la quantità di tioli necessari a ricoprire le particelle teoricamente presenti nel campione. Nei due grafici in figura 2.8 sono riportati i risultati ottenuti. Come in precedenza, la composizione del campione è stata analizzata sia subito dopo l'aggiunta del tiolo 2 Fosforilcolina, che dopo 24 ore di incubazione della miscela sotto agitazione.

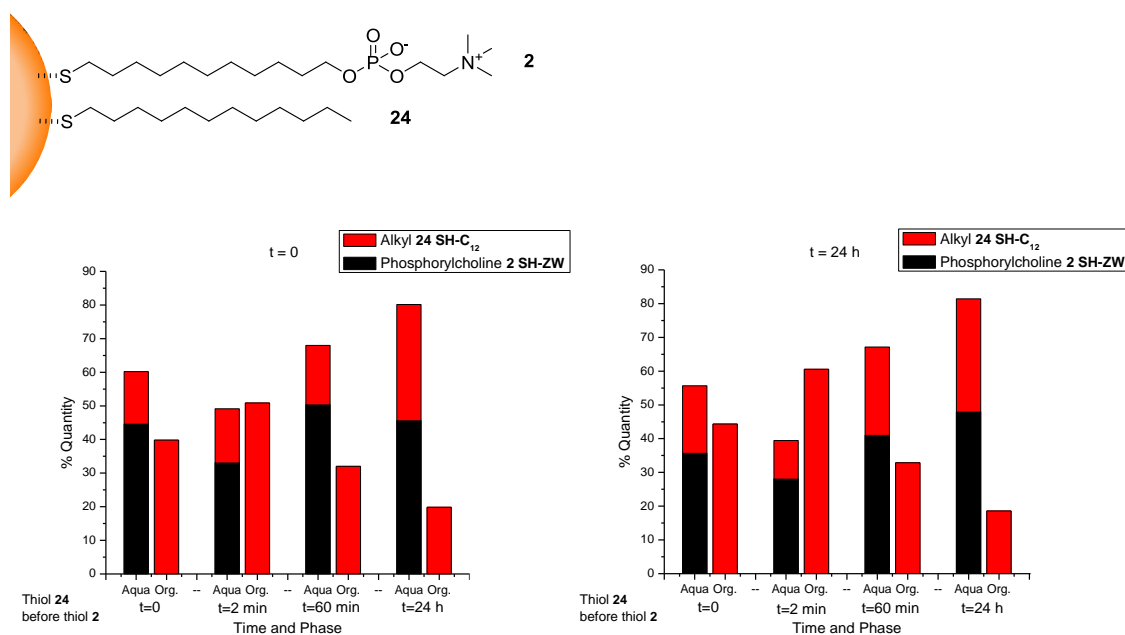


Figura 2.8: Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute a tempo 0 e 24 h, aggiungendo il tiolo 24 Alchile in tempi diversi prima del tiolo 2 Fosforilcolina.

La composizione e la quantità di tali campioni non varia significativamente dopo 24 ore di incubazione nel mezzo di reazione. Questo suggerisce che non vi sia alcuna riorganizzazione dei tioli una volta agganciati alle nanoparticelle.

Una variazione importante si osserva, invece, se i due tioli vengono aggiunti al campione in momenti differenti e diventa sempre più rilevante maggiore è l'intervallo di tempo che intercorre tra le due aggiunte. La prima variazione rilevante è la progressiva diminuzione quantitativa della frazione di particelle ricoperte esclusivamente dal tiolo **24** Alchilico. Quando i due tioli sono aggiunti a breve distanza, esse rappresentano il 50-60% delle particelle isolate, mentre quando le aggiunte sono separate da 24 ore, solo il 20% delle particelle isolate risulta ricoperto esclusivamente dal tiolo **24** Alchilico.

Va anche notato che quando i due tioli si aggiungono simultaneamente si ottengono risultati simili all'esperimento in cui le aggiunte sono distanziate solo da 2 minuti, però la frazione isolata di particelle ricoperte dal solo tiolo **24** Alchilico è inferiore e si attesta attorno al 40-45%.

I risultati di questi esperimenti rivelano interessanti dettagli sul processo di formazione del monostrato. Il primo punto rilevante è la disposizione non casuale dei due tioli sulle nanoparticelle e la formazione di popolazioni composte in prevalenza da uno dei due tioli. Abbiamo visto come questo effetto non può essere correlato in alcun modo ad una disposizione casuale dei tioli. D'altro canto non costituisce neppure una situazione di massima stabilità del sistema dal momento che, modificando il modo di preparazione del campione, esso evolve verso composizioni differenti.

L'osservazione da cui partire è il fatto che l'esperimento in cui la segregazione dei due tioli su nanoparticelle differenti è massima, è quello in cui il tiolo **24** Alchilico e quello **2** Fosforilcolina vengono aggiunti in sequenza con un intervallo di due minuti. E' bene ricordare che il processo di adsorbimento dei tioli, in queste condizioni, è molto veloce e si completa in pochi secondi. Quando il tiolo **2** Fosforilcolina viene aggiunto, il tiolo alchilico è già completamente adsorbito sulle particelle ma si è concentrato solo su di una parte di esse, ricoprendole completamente. Il tiolo **2** Fosforilcolina non può, quindi, che ricoprire le restanti. Un tale comportamento potrebbe essere spiegato in due modi: 1) un effetto di concentrazione locale: il tiolo si trova per un breve tempo concentrato nella zona di iniezione e l'adsorbimento è così veloce che le particelle presenti in quell'area vengono ricoperte completamente prima che la diffusione ed il mescolamento omogenizzino il contenuto della miscela di reazione; 2) si verifica un meccanismo di riconoscimento o di adsorbimento cooperativo, per cui una volta che

un tiolo si è legato alla superficie della particella, favorisce l'adsorbimento di suoi "simili" nelle aree circostanti.

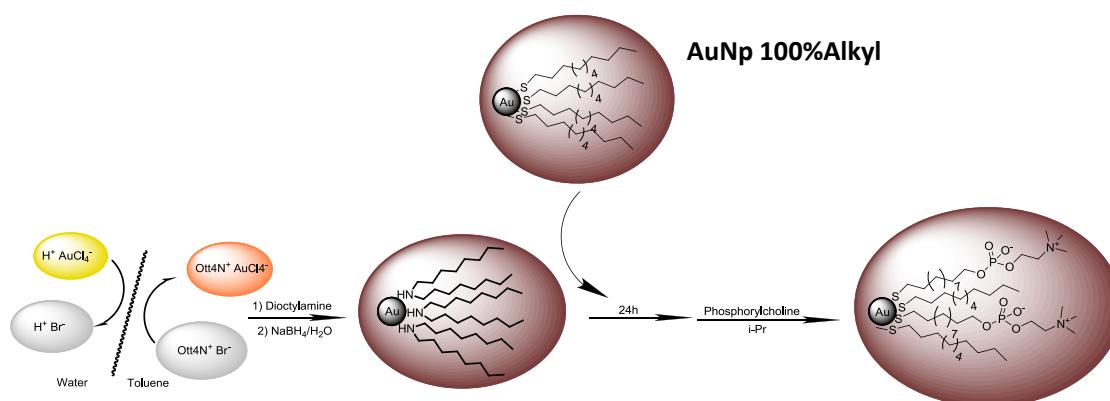
Dal momento che è piuttosto difficile ipotizzare meccanismi di riconoscimento molecolare tra gruppi alchilici in toluene, poiché anche le stesse molecole di diottilammina, che ricoprono le particelle portano delle catene alchiliche, la prima ipotesi è sembrata la più verosimile.

Quando i due tioli vengono aggiunti contemporaneamente, cioè mescolati nella stessa soluzione, il risultato che si ottiene è molto simile a quello ottenuto nell'aggiunta sequenziale con piccolo intervallo, anche se la quantità di nanoparticelle ricoperte dal solo tiolo **24** Achilico sembra essere leggermente minore. Questo risultato può essere spiegato ipotizzando che il tiolo **2** Fosforilcolina si adsorba più lentamente alla superficie delle particelle del tiolo **24** Alchilico. Di conseguenza il tiolo **24** Alchilico può ricoprire di nuovo le particelle presenti nella zona di iniezione prima che quello **2** Fosforilcolinico abbia modo di adsorbirsi in modo significativo sulle particelle. D'altro canto la simultanea presenza di **2** Fosforilcolina, che seppur più lentamente, è in grado di chemisorbirsi sulle particelle, riduce questo fenomeno portando ad una frazione inferiore di particelle ricoperte con il solo tiolo **24** Alchilico.

Quando le aggiunte dei due tioli vengono tra loro allontanate nel tempo, si osserva una progressiva diminuzione della quantità di particelle ricoperte dal solo tiolo **24** Achilico. Questo significa che la prolungata incubazione provoca una redistribuzione dei tioli tra le nanoparticelle. Questa redistribuzione non può che avvenire per reazione di scambio con la diottilammina presente nella miscela di reazione. La diottilammina è un legante debole e la sua abilità di sostituirsi ai tioli adsorbiti non può che essere piuttosto ridotta, in effetti, il processo non è ancora del tutto completo dopo 24 ore, indicando una riorganizzazione lenta. Al contrario, tale riorganizzazione non sembra essere possibile quando il tiolo di ricoprimento è la **2** Fosforilcolina, infatti, dopo l'aggiunta di questa, non si osserva più alcuna variazione della composizione del campione. In qualche modo, forse a causa delle interazioni dipolo-dipolo tra i residui di **2** Fosforilcolina all'interno del monostrato, la diottilammina non è più in grado di scambiarsi con il tiolo.

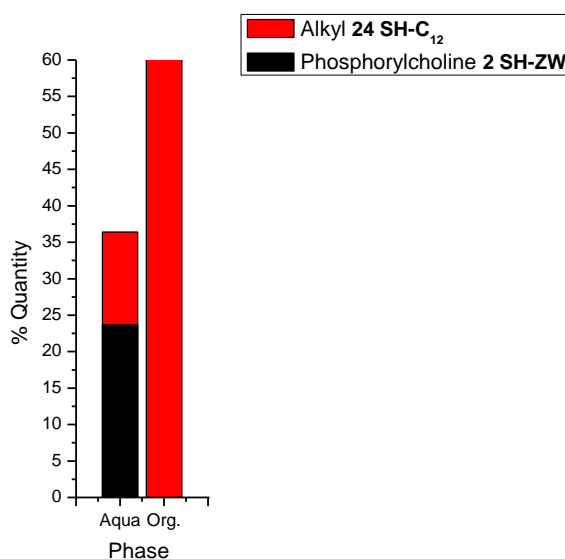
### 2.2.4 Monostrati Misti: Aggiunta di nanoparticelle pre-ricoperte

Il quadro sopra descritto è stato confermato da un esperimento di controllo, in cui un campione di nanoparticelle è stato ricoperto quantitativamente con il tiolo **24** Alchilico e quindi mescolato, prima della purificazione, con un'egual quantità di nanoparticelle ricoperte con la diottilammina (Fig. 2.9).



**Figura 2.9:** Schema di reazione modificato della sintesi di nanoparticelle miste per aggiunta di nanoparticelle **24** Alchiliche non purificate aggiunte ad un batch di nanoparticelle in formazione, in cui dopo 24 h è stato aggiunto il tiolo **2** Fosforilcolina.

Dopo 24 h di incubazione è stato aggiunto il tiolo **2** Fosforilcolina.



**Figura 2.10:** Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute nella sintesi.

I risultati ottenuti (Fig. 2.10) mostrano come, di nuovo, si siano ottenute due popolazioni di particelle una delle quali ricoperta da proporzioni simili dei due tioli: una parte del tiolo **24** Alchilico deve, quindi, essere stata rilasciata dalla prima porzione di nanoparticelle per trasferirsi sulla seconda.

Il campione di particelle miste ottenuto in questo esperimento è stato sottoposto a titolazione NMR con  $Gd^{3+}$  (Fig. 2.11).

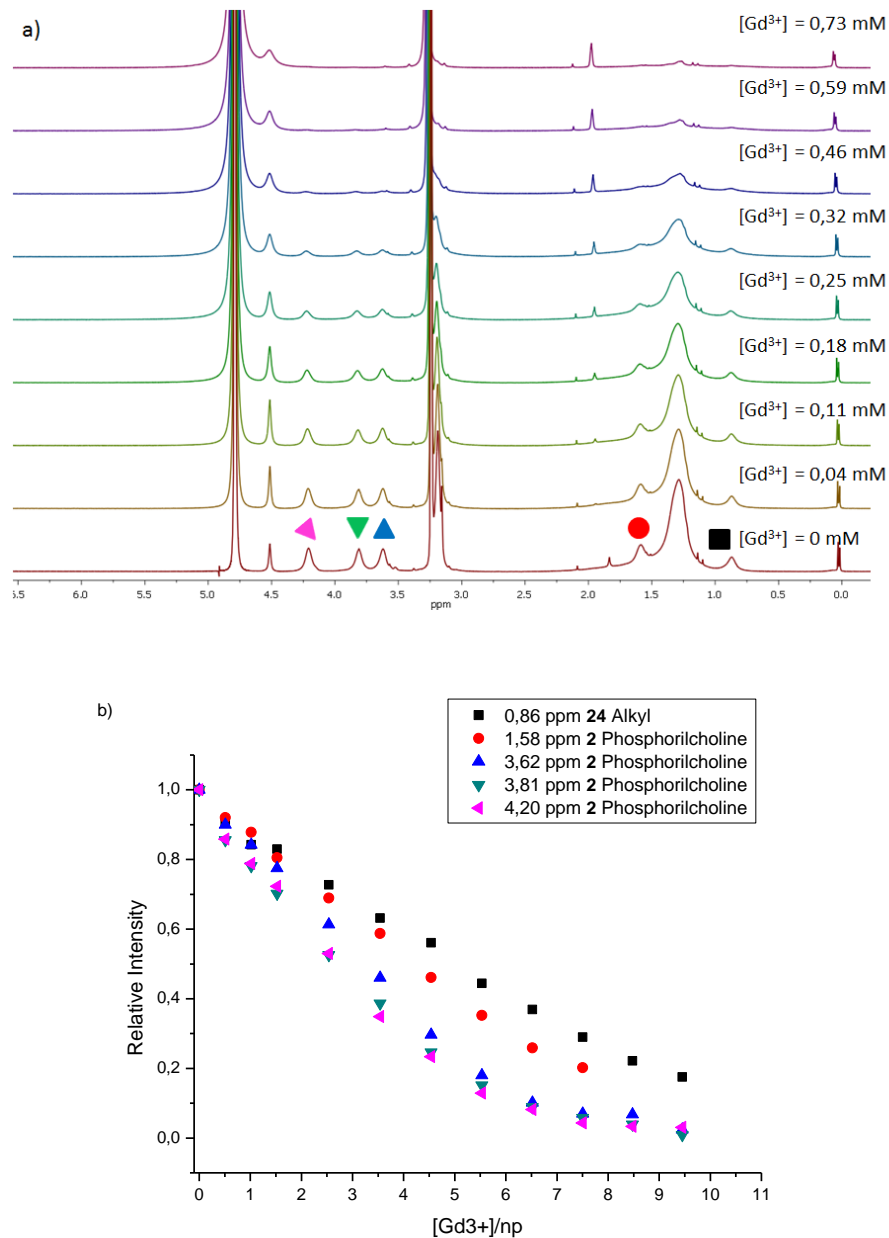
Infatti, per investigare la morfologia del monostrato è stato utilizzato il protocollo descritto nel capitolo precedente. L'utilizzo di ioni lantanidi paramagnetici nel contesto della spettroscopia NMR è ampiamente sfruttato per la capacità di indurre un effetto PRE: *Paramagnetic Relaxation Enhancement*. Questo effetto provoca nei segnali degli spin risonanti, che si trovano spazialmente vicini allo ione metallico, un progressivo allargamento e addirittura la cancellazione dei segnali stessi dallo spettro. Il legarsi degli ioni  $Gd^{3+}$  ai tioli che passivano le nanoparticelle d'oro può causare, quindi, la cancellazione dei segnali relativi dallo spettro NMR. La conseguenza è che, in presenza di nanoparticelle composte da monostrati misti, in cui uno solo dei due tioli è in grado di legare il centro metallico, differenti morfologie del monostrato genereranno andamenti progressivi di allargamento dei segnali specifici e differenti, permettendo di ottenere informazioni dirette sull'organizzazione del monostrato stesso.<sup>25</sup>

Il monostrato misto preso in considerazione riesce a legare il gadolinio attraverso gli atomi di ossigeno del gruppo fosforilcolinico, quindi il legame avviene solo con il tiolo **2** Fosforilcolina, e provoca l'allargamento dei segnali relativi alle molecole circostanti.

L'effetto PRE si manifesta con due meccanismi: uno intermolecolare e uno intramolecolare. Il primo è definito a lungo raggio ed ha una dipendenza dalla distanza come  $1/r$ , il secondo meccanismo è definito a corto raggio con una dipendenza di  $1/r^6$ . Quindi, un segnale allargato solo per un tiolo legato alla nanoparticella indica che lo ione metallico vi si lega in maniera forte a sufficienza da non indurre l'effetto PRE intermolecolare sulle altre molecole presenti in soluzione.<sup>11</sup>

L'effetto PRE intramolecolare è sufficientemente forte da cancellare, non solo i segnali dei protoni vicini al sito di legame, ma anche quelli vicini che possono appartenere al tiolo che di fatto non partecipa al *binding*. Di conseguenza nel caso di tioli disposti casualmente o a piccole isole si osserverà l'allargamento di tutti i segnali presenti nello spettro, mentre nel caso di una disposizione a grandi isole si osserverà l'allargamento

prevalente dei segnali del tiolo che è in grado di legare il centro metallico, nel caso il tiolo **2** Fosforilcolina, e la sopravvivenza di quelli del tiolo non interessato al legame, nel caso specifico il tiolo **24** Alchilico.



**Figura 2.11:** a) Spettri  $^1\text{H-NMR}$  di nanoparticelle ricoperte dai tioli **24** e **2** in proporzioni AuNp 35% **24** C<sub>12</sub> - 65% **2** Fosforilcolina in MeOD dopo aggiunta di quantità crescenti di  $\text{Gd}^{3+}$  in  $\text{CD}_3\text{CN}$ ;  
b) Intensità relativa dei picchi dei tioli **24** e **2** come indicato, in funzione del numero di ioni gadolinio per nanoparticella.

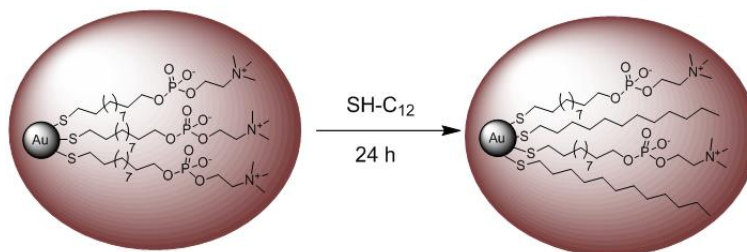
Dalla titolazione NMR (Fig. 2.11 a) sembra che i tioli siano disposti in modo casuale, o a piccole isole, sul nucleo d'oro. Infatti, si può vedere un progressivo abbassamento dei

segnali dovuto al loro allargamento che avviene per l'effetto PRE del gadolinio. Riportando in grafico l'intensità relativa dei picchi NMR che corrispondono al tiolo **2** Fosforilcolina e a quello **24** Alchilico in funzione del numero di ioni gadolinio per nanoparticella (Fig. 2.11 b), si vede come l'andamento dei segnali sia simile per entrambe le molecole, comportamento indice di una disposizione casuale o a piccole isole dei tioli.

Va notato che la reazione di scambio tiolo-diottilammina non sembra avvenire in modo apprezzabile, dopo l'aggiunta della Fosforilcolina, e in soluzione non è presente un eccesso di tioli tale da indurre reazioni di scambio tiolo-tiolo. L'unico percorso possibile rimanente è, perciò, la riorganizzazione del monostrato per diffusione laterale degli stessi, che è ormai ritenuta essere molto lenta. La morfologia casuale potrebbe, quindi, essere il prodotto cinetico ottenuto in seguito al veloce adsorbimento del tiolo **2** Fosforilcolina e non quello termodinamico. Per verificare questo punto si è provato ad ottenere un campione misto di nanoparticelle effettuando la reazione per scambio. Infatti, in regime di scambio prolungato, il monostrato di ricoprimento avrebbe la possibilità di riorganizzarsi raggiungendo il suo punto di equilibrio termodinamico.<sup>26</sup>

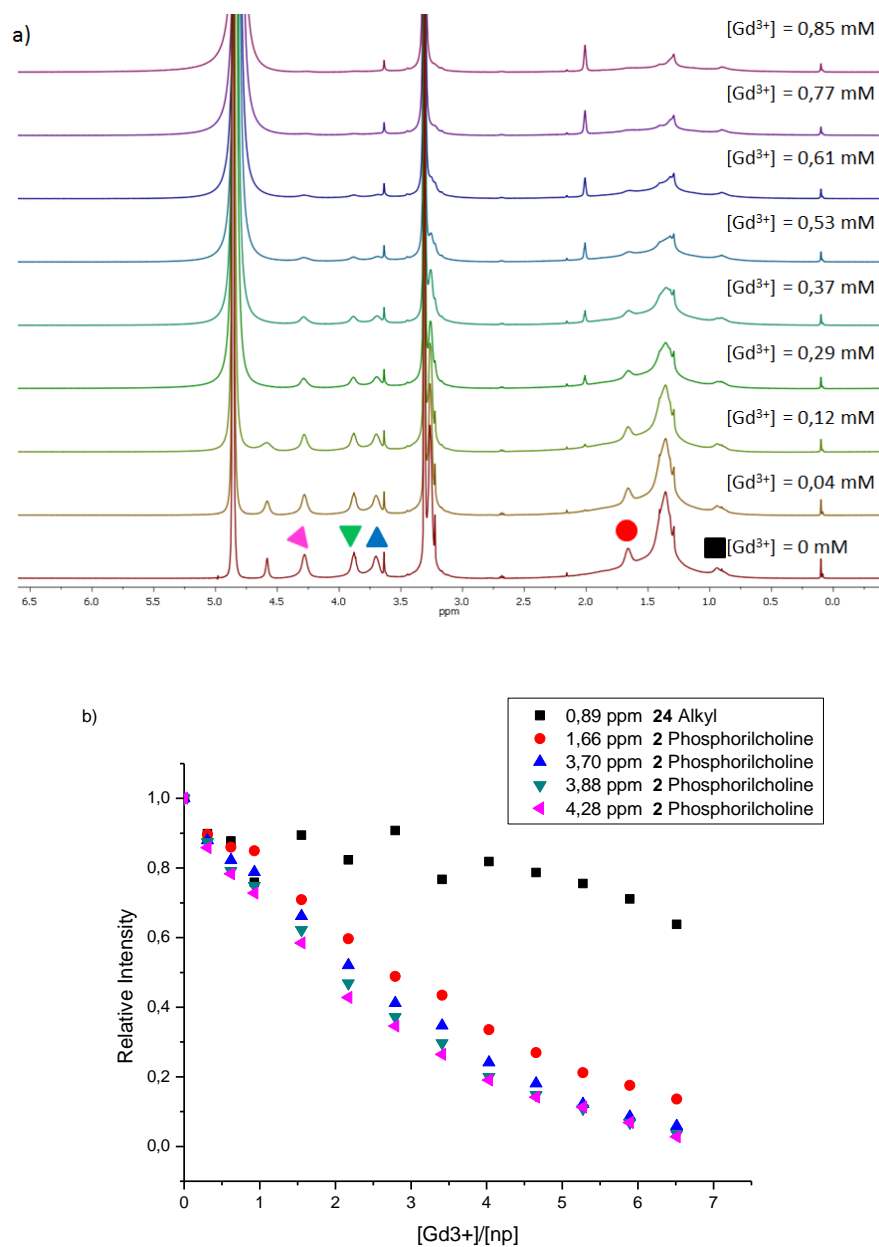
### 2.2.5 Monostrati Misti: Scambio di Tioli

Si è, quindi, provato ad effettuare lo scambio partendo da un campione di nanoparticelle ricoperte interamente da tiolo **2** Fosforilcolinico, sciolte in metanolo, con il tiolo **24** Alchilico (Fig. 2.12).



**Figura 2.12:** Schema di reazione per la sintesi di nanoparticelle miste per scambio di tioli. Ad un batch di nanoparticelle ricoperte dal tiolo **2** Fosforilcolina si aggiunge in metanolo del tiolo **24** Alchilico e si lascia ad incubare per 24 h.

In questo caso, si è ottenuto solo una popolazione composta per circa il 66% da tiolo **24** Alchilico. La titolazione NMR (Fig. 2.13) in questo caso, però, ha evidenziato come la morfologia ottenuta possa essere non più random ma a isole.

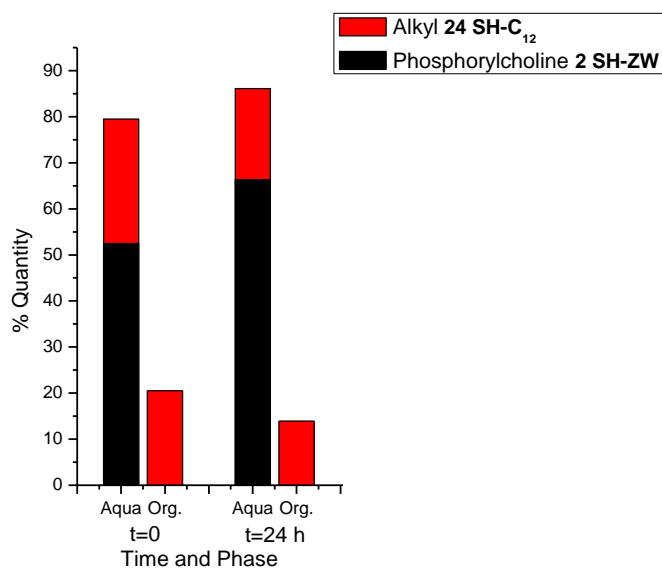


**Figura 2.13:** a) Spettri  $^1\text{H-NMR}$  di nanoparticelle ricoperte dai tioli **24** e **2** in proporzioni AuNp 66% **24** C<sub>12</sub> - 34% **2** Fosforilcolina in MeOD dopo aggiunta di quantità crescenti di  $\text{Gd}^{3+}$  in  $\text{CD}_3\text{CN}$ ;  
b) Intensità relativa dei picchi dei tioli **24** e **2** come indicato, in funzione del numero di ioni gadolinio per nanoparticella.

### 2.2.6 Monostrati Misti: Effetto della rapporto molare tra i tioli

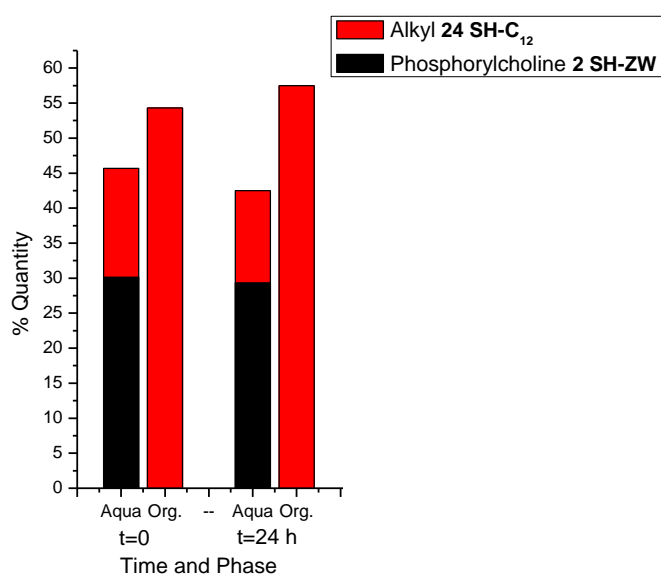
Sono stati svolti altri esperimenti volti a chiarire ulteriormente il meccanismo e la modalità con cui i due tioli si attaccano reciprocamente al monostrato. In particolare, sono stati eseguiti esperimenti in cui i due tioli venivano aggiunti simultaneamente ma in quantità non uguali e in eccesso rispetto a quanto necessario per ricoprire le particelle.

I dati di seguito riportati (Fig. 2.14) rappresentano un esperimento di passivazione standard in cui la somma dei due tioli è di 1.5 equivalenti con il tiolo **2** Fosforilcolina che da solo conta per 1.0 equivalente, mentre il tiolo **24** Alchile conta per i restanti 0.5 equivalenti, come negli esperimenti precedenti. Il primo dato che emerge è, nuovamente, che non vi è una differenza macroscopica tra la composizione della popolazione e le relative quantità a tempo 0 e dopo 24 h indicando che, anche in queste condizioni, in cui è presente una certa quantità di tioli in eccesso in soluzione, lo scambio di tioli è trascurabile. Inoltre, si vede come la quantità della popolazione ricoperta dal solo tiolo **24** Alchile sia nettamente calata rispetto a quella mista. Quello che non varia è la composizione relativa della popolazione mista, rispetto all'esperimento in cui i tioli sono aggiunti contemporaneamente, come in questo caso, ma in quantità esatte a ricoprire le nanoparticelle ed in rapporto 1:1.



**Figura 2.14:** Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute a tempo 0 e 24 h, aggiungendo i due tioli contemporaneamente Alchile **24** 0.50 equivalenti e Fosforilcolina **2** 1.0 equivalenti.

Lo stesso esperimento è stato eseguito a concentrazioni invertite, in cui la somma dei due tioli è sempre di 1.5 equivalenti con il tiolo **24** Alchile che da solo conta per 1.0 equivalente, mentre il tiolo **2** Fosforilcolina conta per i restanti 0.5 equivalenti (Fig. 2.15). In questo caso si vede, ancora, come non vi sia differenza tra le popolazioni a tempo 0 e a tempo 24 h. Quello che è evidente è la quantità di nanoparticelle ricoperte dal solo tiolo **24** Alchile. Anche in questo caso la composizione della popolazione mista ricorda quella ottenuta in assenza di eccesso di tioli, indicando che la reazione di scambio può essere considerata trascurabile.



**Figura 2.15:** Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute a tempo 0 e 24 h, aggiungendo i due tioli contemporaneamente Alchile **24** 1.0 equivalenti e Fosforilcolina **2** 0.5 equivalenti.

Anche questi esperimenti confermano il quadro emerso in precedenza. Il tiolo **24** Alchilico ricopre più velocemente le nanoparticelle. L'aggiunta dei tioli alla soluzione provoca la formazione momentanea di un gradiente di concentrazioni. Durante questo breve tempo, le particelle presenti nella zona ad alta concentrazione di tioli vengono coperte completamente dal tiolo alchilico. Se questo è presente in eccesso, il numero di particelle coperto completamente sarà più alto. Se invece è il tiolo **2** ad essere presente in quantità maggiore, la sua velocità di chemisorbimento sarà ovviamente più elevata e questo gli consentirà di competere più efficacemente con il tiolo alchilico e di ridurre la quantità di particelle ricoperte esclusivamente da questo.

## 2.2.7 Sintesi del Monostrato Misto:

### TEG-Ammide (1)/Fosforilcolina (2)

Per ottenere informazioni sulla validità generale dei risultati discussi nei paragrafi precedenti, si è deciso di investigare il comportamento di una diversa coppia di tioli: **1** TEG-Ammide e **2** Fosforilcolina (Fig. 2.16).

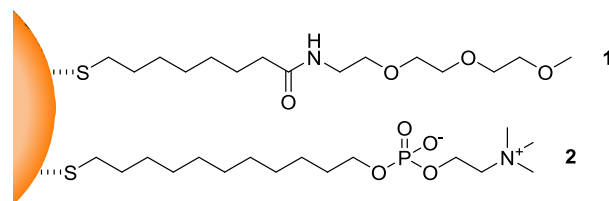


Figura 2.16: Rappresentazione dei tioli che passivano le nanoparticelle.

Diversamente da quanto descritto nei paragrafi precedenti, i due tioli ora considerati produrrebbero nanoparticelle entrambe solubili in acqua. D'altro canto, le particelle completamente ricoperte dal tiolo **1** TEG-Ammide sono solubili in toluene mentre quelle ricoperte dal tiolo **2** Fosforilcolina non lo sono. Di conseguenza, i processi purificativi sono stati modificati secondo le nuove esigenze. In particolare, l'analisi prevede due passaggi: 1) la soluzione viene centrifugata senza aggiunta di acqua per separare la frazione di particelle insolubili, che vengono poi purificate per triturazione con etile acetato; 2) alla miscela di reazione (toluene) restante viene aggiunta acqua per estrarre le restanti particelle, che vengono poi precipitate e purificate per triturazione con etile acetato (Fig. 2.17).

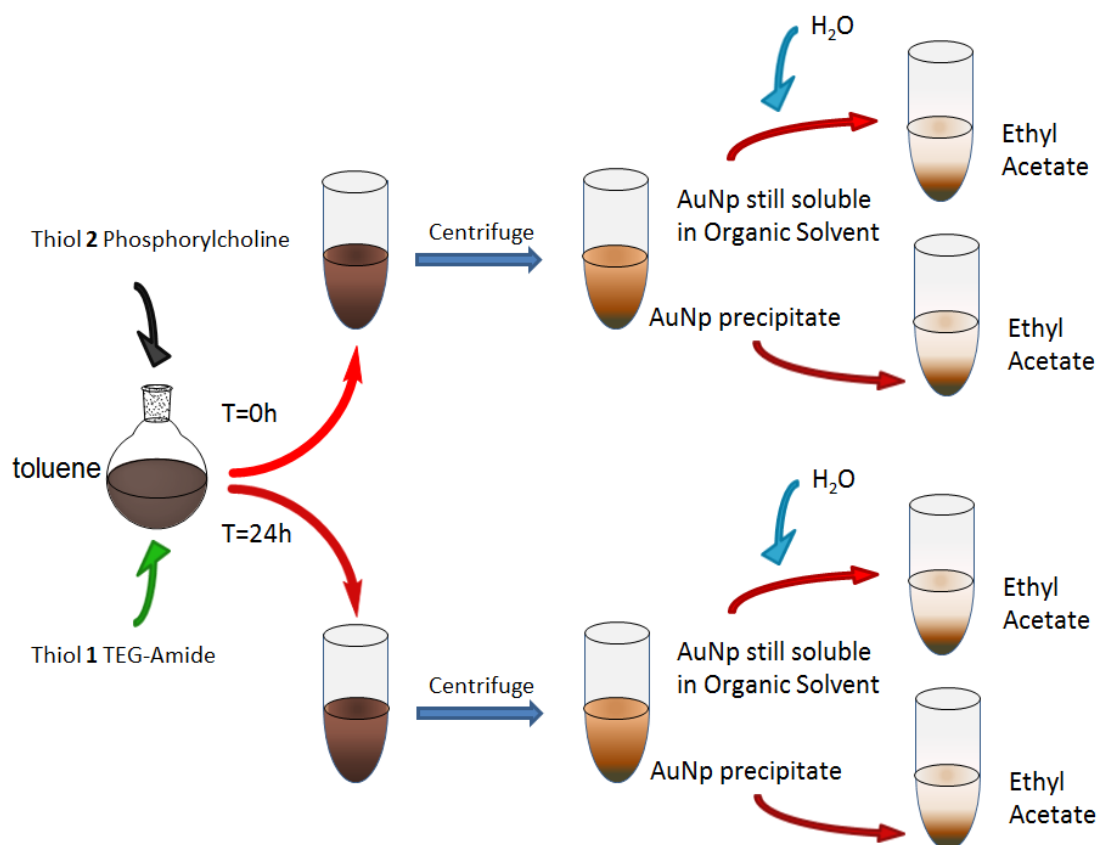
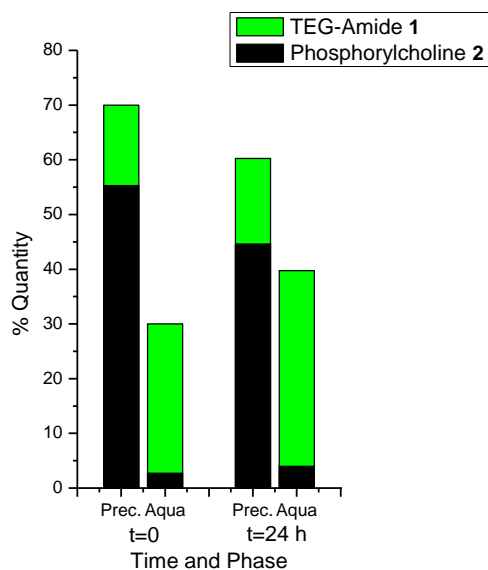


Figura 2.17: Schema di separazione delle solubilità delle varie nanoparticelle.

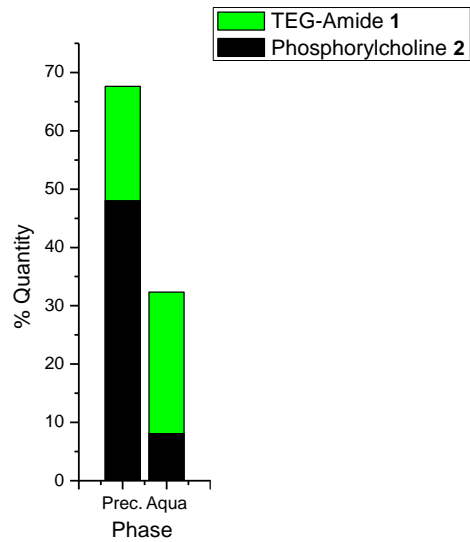
Una volta ottenuti i purificati ed analizzati all'<sup>1</sup>H-NMR si è scoperto, analogamente a quanto visto per la coppia **2** Fosforilcolina e **24** Alchile che, anche per la coppia **1** TEG-Amide e **2** Fosforilcolina si tende ad ottenere segregazione dei due tioli su diverse nanoparticelle (Fig. 2.18).



**Figura 2.18:** Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute a tempo 0 e 24 h, aggiungendo i due tioli contemporaneamente **2** Fosforilcolina e **1** TEG-Ammide.

Anche in questo caso, dopo aver lasciato la soluzione ad incubare per 24 h non si registra un significativo cambiamento né nella composizione delle due popolazioni né nella quantità delle stesse. Le popolazioni che precipitano da toluene sono essenzialmente ricoperte da tiolo **2** Fosforilcolina, mentre quelle che si isolano in acqua sono ricoperte da **1** TEG-Ammide (Fig. 2.18).

Si è, quindi, passati ad investigare se anche in questo caso il tiolo **1** TEG-Ammide potesse riorganizzarsi sulle nanoparticelle prima dell'aggiunta del tiolo **2** Fosforilcolina. Infatti, è stato effettuato un esperimento in cui in seguito all'aggiunta del tiolo **1** TEG-Ammide, la soluzione è stata lasciata per 24 h prima di aggiungere il tiolo **2** Fosforilcolina (Fig. 2.19).



**Figura 2.19:** Grafico a istogramma a barre divise che riporta la composizione delle nanoparticelle nelle diverse fasi e le loro relative quantità ottenute, aggiungendo il tiolo **1** TEG-Amide 24 h prima del tiolo **2** Fosforilcolina.

In questo caso, il tiolo **1** TEG-Amide non si ridistribuisce sulle nanoparticelle, infatti, le due popolazioni sono essenzialmente uguali a quelle ottenute con l'aggiunta contemporanea dei due tioli.



## 3. Conclusioni

---

I risultati ottenuti mettono in evidenza come i fenomeni di formazione e autorganizzazione del monostrato siano caratterizzati da un'elevata complessità.

Dagli esperimenti condotti emerge un quadro diversificato e inaspettato anche in una libreria molto limitata di molecole. Il primo punto sorprendente, già sottolineato, è la tendenza piuttosto generale di tutte le coppie di tioli studiate a segregarsi su nanoparticelle diverse, formando popolazioni ricche rispettivamente in uno dei due tioli. Sembra inoltre che, quando i tioli sono aggiunti in quantità stechiometrica rispetto alla superficie delle nanoparticelle da ricoprire, la distribuzione iniziale della composizione dei monostrati non subisca significative alterazioni nel tempo.

Quando ad una soluzione di nanoparticelle ricoperte di diottilammina viene aggiunta una miscela di tioli, possono verificarsi almeno 4 diversi eventi: i) scambio delle ammine con i tioli (molto veloce), ii) scambio dei tioli con le ammine (presumibilmente molto lento, ma le ammine sono presenti in grande eccesso), iii) scambio dei tioli con altri tioli (veloce), iv) movimenti laterali dei tioli (lento).



Nei primi esperimenti effettuati, il processo iii) (scambio di tioli) è trascurabile poiché nella miscela di reazione non è presente un eccesso significativo di tioli rispetto alle quantità necessarie alla ricopertura delle particelle. In effetti, in tutti i casi non si sono osservati significativi cambiamenti di distribuzione dei tioli nelle 24 ore successive alla formazione del monostrato. Il processo iv) ha scarsa rilevanza in questo studio (non altera la composizione del monostrato). Il processo dominante sembra essere i) lo scambio tioli-ammine, che sembra essere così veloce, come vedremo in seguito, da competere con la diffusione. Un ruolo significativo è giocato però anche dalla reazione ii) di scambio ammina-tiolo.

Le distribuzioni osservate sono, quindi, determinate essenzialmente dalla velocità di adsorbimento dei tioli sulla superficie e, nelle condizioni opportune, possono essere modulate dalla competizione tioli-ammine.

Un punto rilevante da sottolineare è il fatto che, una volta completata la formazione dei monostrati, non vi sono significative evoluzioni dei campioni. La reazione di scambio ammine-tioli sembra quindi essere efficace solo nel caso di particelle ricoperte da tioli alchilici o parzialmente ricoperte. D'altro canto, le modalità di preparazione delle particelle, ed in particolare l'ordine e la tempistica di aggiunta dei tioli, influenzano la distribuzione finale. I campioni di nanoparticelle ottenuti rappresentano quindi un prodotto cinetico e non un prodotto termodinamico.

Infatti, gli studi effettuati addizionando i due tioli in tempi diversi hanno evidenziato, come appena accennato, che all'aumentare dell'intervallo di tempo di aggiunta si assiste ad una progressiva evoluzione della distribuzione di popolazioni che passano da un'iniziale prevalenza di segregazione interparticella ad una finale prevalenza del mescolamento intraparticella dei due tioli.

I tioli aggiunti alla soluzione di nanoparticelle raggiungono per brevi momenti una elevata concentrazione nel volume circostante il punto di iniezione. In questa fase, il tiolo **24** Alchilico, quando aggiunto da solo, ricopre velocemente le prime particelle incontrate (quelle presenti nella porzione di volume circostante il punto di iniezione) per poi raggiungere progressivamente le altre particelle che vengono funzionalizzate in modo parziale. L'aggiunta del tiolo **2** congela questa situazione evidenziando una distribuzione di tipo segregato dei tioli sulle particelle.

Se la miscela rimane in incubazione per un tempo sufficientemente lungo, le reazioni di scambio diottilammina-tiolo riescono a provocare la redistribuzione del tiolo **24** verso le altre particelle. Poiché la diottilammina ed il tiolo **24** Alchilico sono chimicamente omogenei (cioè sono entrambe molecole caratterizzate da una catena alchilica lineare), ci si può aspettare che la redistribuzione avvenga in modo casuale. Il tiolo **2** Fosforilcolina, una volta aggiunto, “congela” la situazione mantenendo la morfologia casuale.

Quando i due tioli vengono aggiunti simultaneamente, si ottiene, ancora, una distribuzione segregata. Questo suggerisce che la velocità di adsorbimento del tiolo **24** sia maggiore rispetto al tiolo **2**, che si vede quindi sottratta la superficie delle particelle presenti nel volume di soluzione prossima al punto di iniezione e deve andare a reagire con le particelle più lontane.

L'analisi NMR con sonda gadolinio di campioni misti **2** Fosforilcolina/**24** Alchile ottenuti in questo modo ha indicato che la morfologia del monostrato sembra essere di tipo casuale. Le ipotesi appena discusse suggeriscono però che i monostrati così ottenuti non rappresentino una situazione di equilibrio termodinamico. Infatti, quando un monostrato misto di composizione simile è ottenuto dall'esperimento per scambio del tiolo **2** Fosforilcolinico con quello **24** Alchilico, i tioli sembrano essersi disposti in piccole isole. Nell'esperimento di scambio il tiolo **24** Alchilico va ad inserirsi in un monostrato composto da **2** Fosforilcolina. Dal momento che i due tioli sono profondamente diversi, ci si potrebbe aspettare che le due molecole tendano a raggrupparsi in isole omogenee, la formazione delle quali sarebbe favorita dai ripetuti scambi.

Gli esperimenti effettuati in presenza di un eccesso di uno dei due tioli aggiungono ulteriori informazioni, infatti, l'aumento della quantità di uno dei due tioli porta ad uno sbilancio delle quantità e composizione delle popolazioni ottenute. Questa osservazione conferma ulteriormente come i risultati ottenuti siano il risultato di un delicato bilancio di fenomeni chimici. Infatti, l'aumento della concentrazione di tiolo **2**, seppur solo raddoppiata, lo rende in grado di competere più efficacemente con il tiolo **24** per il ricoprimento delle particelle. D'altro canto, l'aumento del tiolo **2**, di nuovo raddoppiata, non è sufficiente ad ottenere un ricoprimento quasi esclusivo delle



particelle come dovrebbe succedere se la reazione di adsorbimento di questa molecola fosse molto superiore a quella di adsorbimento del tiolo **24**.

Sostituire il tiolo **24** Alchilico con il tiolo **1** TEG-ammidico cambia significativamente la situazione. In questo caso, infatti, la possibilità di formare interazioni intermolecolari supplementari tra le molecole di TEG ammina rallenta le reazioni di scambio ammina-tiolo e i monostrati, seppur incubati per 24 ore prima di aggiungere il tiolo **2** non subiscono riorganizzazione.

La composizione, e forse anche la morfologia, dei monostrati ottenuti per scambio di leganti deboli con tioli è quindi il risultato di un complesso bilancio di fattori in cui interazioni deboli ed altri parametri elusivi possono giocare un ruolo rilevante. Progettare sistemi in grado di programmare distribuzione e morfologia dei leganti sulla superficie di una particella richiederà un attento controllo di tutti i parametri in gioco.

## 4. Materiali & Metodi

---

### 4.1 Strumentazione:

#### ✓ Analisi NMR

Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker AVIII 500 con probe 5 mm BBI z gradient che opera a 500,13 MHz per  $^1\text{H}$ . Gli spettri sono stati registrati a 25°C; i *chemical shift* ( $\delta$ ) sono riportati in ppm usando, come riferimento interno, il picco residuo del solvente [ $\text{CDCl}_3$ : 7.26 ppm;  $\text{D}_2\text{O}$ : 4.79 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ : 3.31 ppm]. Le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz, la molteplicità dei segnali e stata indicata in accordo a quanto segue: **s**: singoletto; **d**: doppietto; **t**: tripletto; **q**: quartetto; **m**: multipletto; **dd**: doppietto di doppietti; **br**: banda allargata; **sa**: singoletto allargato. Gli spettri sono stati analizzati utilizzando i software Topspin, Mestre Nova e per gli esperimenti DOSY Dynamic Center.

✓ **Analisi Massa**

Gli spettri ESI-MS sono stati registrati utilizzando un LC/MSD Trap SL Agilent serie 1100 operante in condizione di infusione in flusso del campione, con ionizzazione di tipo *elettrospray* (ESI) ed analizzatore di massa a trappola ionica (IT).

✓ **Spettroscopia UV-Vis**

Per la registrazione degli spettri UV/Vis sono stati utilizzati gli spettrofotometri Varian Cary 50 e Varian Cary 100, equipaggiato con porta-celle termostata a circolazione d'acqua. Per le misure si sono usate celle di quarzo HELMA con cammino ottico di 10 mm. Gli spettri si intendono registrati a 25°C. Tutti i dati sono stati analizzati con il programma Origin.

✓ **Analisi TEM**

Le immagini TEM sono state registrate con un microscopio elettrico Jeol 300 PX. Una goccia del campione viene depositata su un vetrino e il solvente viene lasciato evaporare. Le immagini TEM vengono elaborate utilizzando il software ImageJ.

✓ **Analisi TGA**

Analisi di termogravimetria sono state effettuate con lo strumento TA modello Q5000 IR. Sono utilizzati 1-2 mg di campione con una sequenza da 30 a 1000°C sotto flusso continuo di aria.

## **4.2 Materiali**

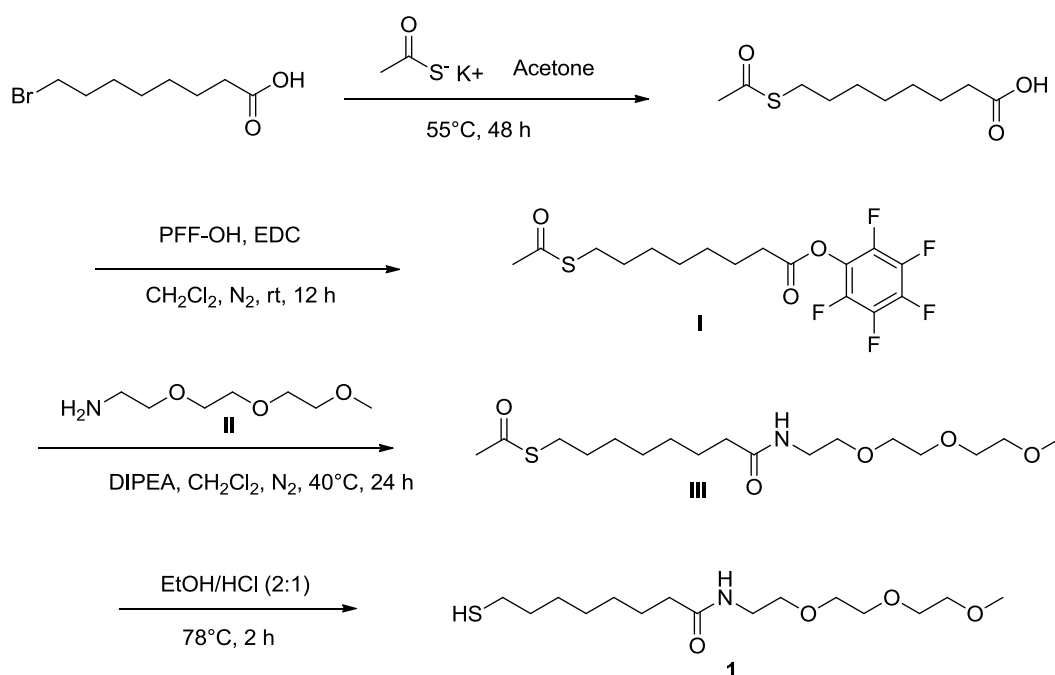
Tutti i reagenti e solventi commerciali sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Analisi TLC sono state effettuate utilizzando lastre di vetro alluminio o plastica pre-caricate con gel di silice Merck 60 F<sub>254</sub>. Per le colonne cromatografiche è stato utilizzato gel di silice 60 Macherey-Nagel (70-230 mesh).

### ✓ Preparazione dei campioni NMR:

La concentrazione di nanoparticelle nel tubo NMR per la titolazione con ioni gadolinio è stata determinata per peso considerando che con il nostro protocollo si ottengono nanoparticelle di formula media  $\text{Au}_{180}\text{RS}_{70}$  e nel caso di nanoparticelle miste la quantità dei due tioli è stata stimata per decomposizione delle stesse con iodio e successiva integrazione dei segnali isolati. Le titolazioni sono state effettuate in metanolo deuterato con una soluzione di  $\text{Gd}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$  in acetonitrile deuterato di provenienza Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriori purificazioni.

### ✓ Sintesi e caratterizzazione del tiolo 1 TEG-Amide

La sintesi del tiolo **1** TEG-Amide è stata eseguita seguendo lo schema riportato:



#### **8-tioacetil pentafluorofenilottanoato (I).**

L'acido 8-Bromoottanoico (1.5 g, 6.7 mmol) è sciolto in acetone e messo a riflusso per 48 ore con aggiunta di tioacetato di potassio (1.03 g, 8.7 mmol). La soluzione viene evaporata e il solido residuo viene ripreso in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20mL). La soluzione organica viene estratta con acqua (5 x 20 mL) e anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Dopo l'evaporazione del solvente si ottengono 1.01 g (70%) di acido 8-(tioacetil)-ottanoico.

[ $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$ : 2.82 (t, 2H, 7 Hz), 2.30 (t, 2H, 7 Hz), 2.28 (s, 3H), 1.56 (m, 4H), 1.30 (m, 6H)].

L'acido 8-(tioacetil)-ottanoico (1.01 g, 4.6 mmol) è stato sciolto con il pentafluorofenolo (1.1 g, 6.0 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL). In seguito all'aggiunta di idrocloruro N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etil-carbodiimmide (EDC, 1.15 g, 6.0 mmol) la miscela viene lasciata ad agitare sotto ghiaccio inizialmente e poi a temperatura ambiente, in atmosfera controllata di  $\text{N}_2$  per 12 ore. La soluzione organica viene estratta con acqua (3 x 20 mL) e anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Dopo evaporazione del solvente il crudo di reazione viene purificato attraverso cromatografia flash (gel di silice, eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Etere di petrolio 5:5).

Si ottengono 1.1 mg (60%) di **I** sotto forma di olio giallo.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$ : 2.82 (t, 2H, 7 Hz), 2.62 (t, 2H, 7 Hz), 2.27 (s, 3H), 1.72 (qn, 2H, 7 Hz), 1.54 (qn, 2H, 7 Hz), 1.34 (m, 6H).

### **7-{{2-[2-(2-metossietossi)etossi]etil}carbamil)eptil etantolato (III).**

8-tioacetil pentafluorofenilottanoato (**I**) (0.56 mg, 1.46 mmol) è stato sciolto con 2-(2-(2-metossietossi)etossi)etanamina<sup>27</sup> (0.29 mg, 1.75 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), è, quindi stata aggiunta della N,N-diisopropiletilammina (DIPEA, 0.23 g, 1.75 mmol) e posto a riflusso per 24 ore sotto  $\text{N}_2$ . Dopo l'evaporazione del solvente, il crudo di reazione è stato purificato attraverso cromatografia flash (gel di silice, eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Etile acetato 90:5).

Si ottengono 0.40 mg (75%) di **III**.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.02 (br, 1 H); 3.67–3.50 (m, 10 H); 3.44 (m, 2 H); 3.39 (s, 3 H); 2.86 (t, 2 H,  $J \sim 7.25$ ); 2.32 (s, 3 H); 2.17 (t, 2 H,  $J \sim 8.0$ ); 1.72–1.45 (m, 4 H); 1.45–1.2 (m, 6 H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $^1\text{H}$ ) (62.90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 195.94, 173.07, 71.83, 70.40, 70.36, 70.06, 69.85, 58.93, 39.01, 36.50, 30.55, 29.35, 29.03, 28.98, 28.73, 28.51, 25.52.

ESI-MS (1 mg  $\text{ml}^{-1}$ , MeOH)  $m/z$ : 385 (100,  $\text{M} + \text{Na}$ ).

**N-1-{2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}-8-sulfanilottanamamide (1) TEG-Ammide.**

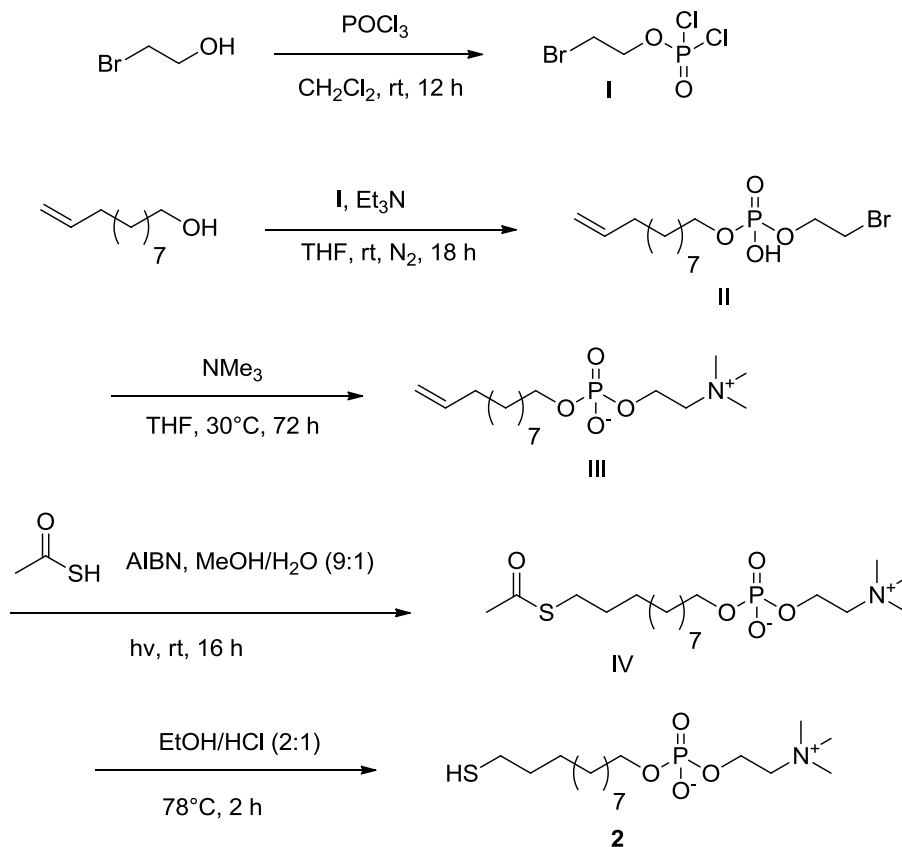
0.043 g (0.118 mmol) di **III** viene sciolto in etanolo (2.0 mL), viene aggiunto HCl 6 M (2.0 mL) e la soluzione viene lasciata agitare a 78°C per circa 2 ore. Il solvente viene, quindi, evaporato.

Si ottengono 0.036 g (95%) di **1** sotto forma di un olio leggermente giallo.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,02 (br, 1 H); 3.67–3.50 (m, 10 H); 3.44 (m, 2 H); 3.39 (s, 3 H); 2,51 (m, 2 H); 2.17 (t, 2 H, J ~ 8.0); 1.72–1.45 (m, 4 H); 1.45–1.20 (m, 6 H).

✓ **Sintesi e caratterizzazione del tiolo 2 Fosforilcolina (ZW):**

La sintesi del tiolo 2 Fosforilcolina è stata eseguita seguendo lo schema riportato:

**2-bromoetil fosforodidclidrato (I).**

Bromoetanolo (10.0 g, 80 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia, per un periodo di 5 minuti a temperatura ambiente, ad una soluzione di POCl<sub>3</sub> (22.0 g, 144 mmol) in diclorometano (6 mL). La miscela di reazione viene lasciata agitare per 12 h e poi viene aggiunto toluene (10 mL). Si ottiene un olio incolore dopo l'evaporazione dell'eccesso

di  $\text{POCl}_3$  e solvente. Il prodotto viene utilizzato per lo step successivo senza procedere ad ulteriori purificazioni.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) 4.61-4.52 (m, 2H), 3.60 (t, 2H).

### **2-bromoetil 10-undecen-1-il idrogeno fosfato (II).**

Una soluzione di 10-undecen-1-olo (5.1 g, 30 mmol) e trietilammina (4.54 g, 45 mmol) è stata sciolta in THF (120 mL) e aggiunta lentamente a una soluzione di **I** (10.9 g, 45 mmol) in THF (80 mL) a temperatura ambiente. Dopo aver lasciato ad agitare per 24 h, è stato aggiunto toluene (300 mL) per far precipitare il sale trietilammonio cloruro. La soluzione è stata filtrata e il solvente è stato evaporato. L'olio residuo è stato nuovamente sciolto in THF (600 mL) e 0.5 M  $\text{NaHCO}_3$  (600 mL) e posto ad agitare per 24 h. La soluzione è quindi stata acidificata (pH  $\sim$ 3) con una soluzione di  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrato, si è ottenuto un solido bianco che è stato estratto con etere etilico (5  $\times$  300 mL). La fase organica è quindi stata anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate ed evaporate. Si è ottenuto un olio (10.8 g), che è risultato sufficientemente puro da non subire ulteriori purificazioni.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) 5.81-5.68 (m, 1H), 4.97-4.86 (m, 2H), 4.27-4.19 (q, 2H), 4.05-3.96 (q, 2H), 3.48 (t, 2H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.31-1.29 (s, 14 H).

### **2-(trimetilammonio)etil undec-10-en-1-il fosfato (III).**

Una soluzione di trimetilammina (75 mL; 33% in etanolo) è stata aggiunta ad una soluzione del composto **III** in THF anidro (250 mL) e lasciata ad agitare in un pallone chiuso a 30°C per 72 h. La trimetilammina è, quindi, stata rimossa dalla miscela di reazione per evaporazione sotto flusso di  $\text{N}_2$ . Il crudo di reazione si presenta come un solido bianco che è stato purificato attraverso cromatografia flash (gel di silice, eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  4:4).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) 5.85-5.75 (m, 1H), 5.02-4.90 (m, 2H), 4.28 (br.s., 2H), 3.85-3.77 (m, 4H), 3.42 (s, 9H), 2.06-1.98 (m, 2H), 1.60-1.55 (m, 2H), 1.38-1.25 (s, 14 H).

ESI-MS  $m/z$ : 336.3 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 358.1 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

**11-(tioacetil)undecil (2-(trimetilammonio)etil)fosfato (IV).**

Una soluzione di **III** (1.4 g, 4.18 mmol), acido tioacetico (5.0 mL), AIBN (0.14 g, 0.82 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1; 7 mL) è stata posta ad agitare sotto flusso di N<sub>2</sub> e lasciata ad irradiare con fotoreattore UV (500 w) per 5 h e poi per una notte a temperatura ambiente. Un solido bianco cristallino è stato rimosso per filtrazione e la soluzione è stata diluita con etere etilico (400 mL). Un solido bianco ha iniziato a precipitare. Al termine della precipitazione si è ottenuto un solido bianco cristallino (1.5 g, 87%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) 4.26 (br.s., 4H), 4.16-4.13 (m, 4H), 3.38 (s, 9H), 2.83 (t, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.55-1.50 (m, 4H), 1.22 (s, 14 H)

ESI-MS *m/z*: 412.3 (M+H)<sup>+</sup>.

**11-mercaptoundecil (2-(trimetilammonio)etil)fosfato (2) Fosforilcolina ZW.**

0.025 g (0.060 mmol) di **IV** viene sciolto in etanolo (2.0 mL), viene aggiunto HCl 6 M (2.0 mL) e la soluzione viene lasciata agitare a 78°C per circa 2 ore. Il solvente viene, quindi, evaporato.

Si ottengono 0.021 g (95%) di **1** sotto forma di un solido bianco.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) 4.55-4.48 (m, 2H), 3.96-3.91 (m, 4H), 3.37 (s, 9H), 2.43 (t, 2H), 1.58-1.46 (m, 4H), 1.28-1.25 (s, 14H).

ESI-MS *m/z*: 370.0 (M+H)<sup>+</sup>, 392.0 (M+Na)<sup>+</sup>.

✓ **Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro (AuNp).**

La sintesi delle nanoparticelle d'oro è preparata in accordo con la procedura a due fasi precedentemente indicata.<sup>5</sup> Tutta la vetreria da laboratorio è precedentemente e accuratamente lavata con acqua regia per eliminare eventuali siti di nucleazione per l'oro. HAuCl<sub>4</sub> è un sale altamente igroscopico, per questo si è deciso di procedere effettuando delle soluzioni stock in acqua MilliQ che vengono conservate in freezer. Una soluzione di HAuCl<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O (0.050 g, 0.127 mmol) in acqua viene estratta con una soluzione di tetraottilammonio bromuro (0.278 g, 0.508 mmol) in toluene (125 mL divise in 3 porzioni) precedentemente lasciata a degasare per 15 minuti. Alla soluzione arancione ottenuta si aggiunge la diottilammina (0.767 mL, 2.539 mmol), calcolata in modo da ottenere nanoparticelle d'oro di 2 nm di diametro.

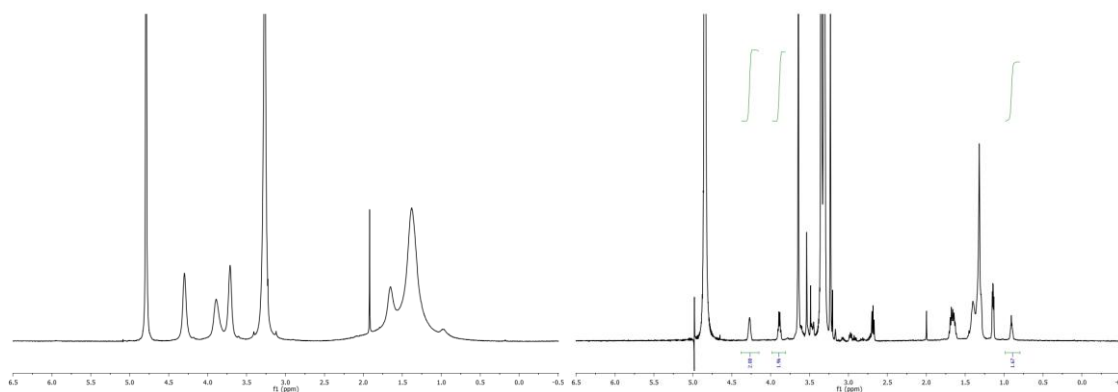
La miscela di reazione viene lasciata sotto N<sub>2</sub> in vigorosa agitazione per 30 minuti. Durante questo periodo di tempo la soluzione diventa incolore. Si aggiunge, quindi, rapidamente una soluzione di NaBH<sub>4</sub> (0.048 g, 1.27 mmol) in acqua (1 mL). Il colore della soluzione vira rapidamente al marrone molto scuro indicando la formazione delle nanoparticelle. Dopo due ore viene rimossa l'acqua e si aggiungono alle nanoparticelle i tioli desiderati sciolti in 2 mL di isopropanolo.

Si ottengono nanoparticelle di  $1.8 \pm 0.4$  nm con una formula media di Au<sub>180</sub>SR<sub>70</sub>.

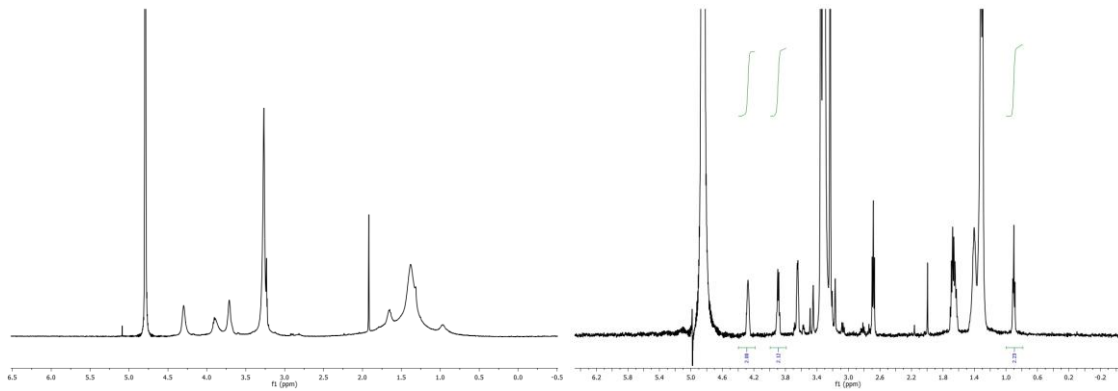
Le nanoparticelle solubili in acqua: vengono purificate mediante centrifugazione con etile acetato e Sephadex G25, mentre quelle solubili in solventi clorurati vengono purificate per triturazione con etanolo e etere etilico ed eventualmente con resina Biorad Bio-Beads S-X1.

#### ✓ Caratterizzazione di nanoparticelle miste Fosforilcolina (2) e Alcile (24)

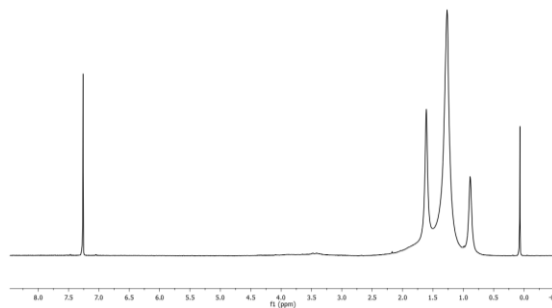
La caratterizzazione dei campioni di nanoparticelle miste è avvenuta essenzialmente mediante <sup>1</sup>H-NMR. La determinazione della quantità relativa dei due tioli è stata effettuata trattando una parte delle nanoparticelle con iodio.



**Figura 4.1:** **a sinistra)** Spettro <sup>1</sup>H-NMR del campione acquoso di nanoparticelle ottenuto dalla sintesi aggiungendo il tiolo **24** Alcile contemporaneamente al tiolo **2** Fosforilcolina; **destra)** Stesso campione trattato con iodio: la composizione risulta essere 36% **24** Alcile-64% **2** Fosforilcolina.



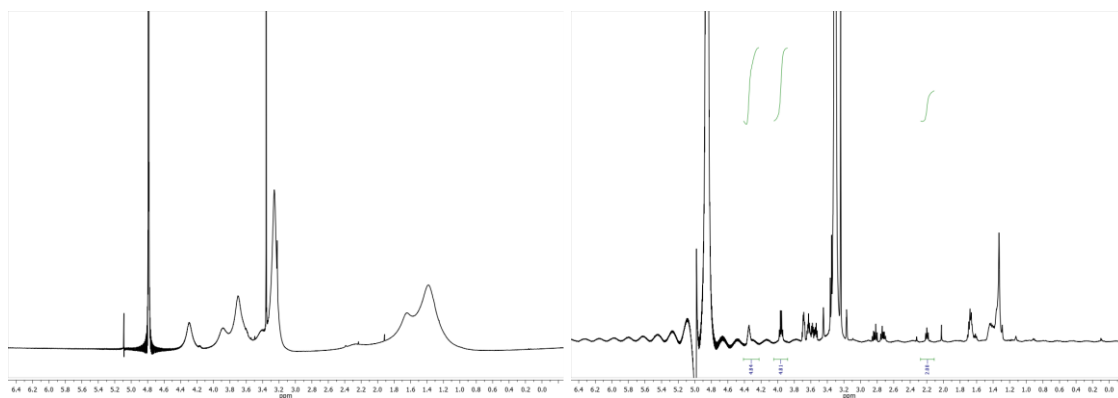
**Figura 4.1:** a sinistra) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione acquoso di nanoparticelle ottenuto dalla sintesi aggiungendo il tiolo **24** Alchile 24 h prima del tiolo **2** Fosforilcolina; destra) Stesso campione trattato con iodio: la composizione risulta essere 43% **24** Alchile-57% **2** Fosforilcolina.



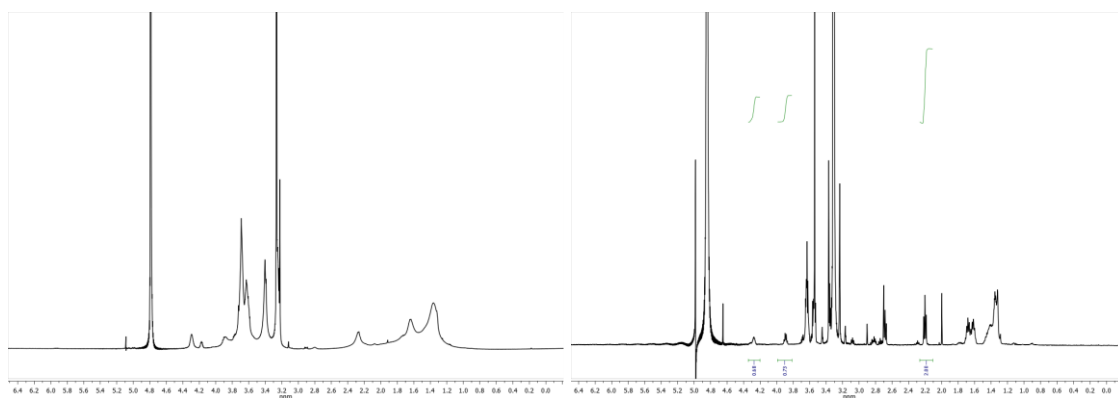
**Figura 4.1:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione organico di nanoparticelle, la composizione è 100% **24** Alchile.

#### ✓ Caratterizzazione di nanoparticelle miste TEG-Amide (1) e Fosforilcolina (2)

La caratterizzazione dei campioni di nanoparticelle miste è avvenuta essenzialmente mediante  $^1\text{H-NMR}$ . La determinazione della quantità relativa dei due tioli è stata effettuata trattando una parte delle nanoparticelle con iodio.



**Figura 4.1:** a sinistra) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione precipitato di nanoparticelle ottenuto dalla sintesi aggiungendo il tiolo **1** TEG-Amide 24 h prima del tiolo **2** Fosforilcolina; destra) Stesso campione trattato con iodio: la composizione risulta essere 29% **1** TEG-Amide-71% **2** Fosforilcolina.



**Figura 4.1:** a sinistra) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione acquoso di nanoparticelle ottenuto dalla sintesi aggiungendo il tiolo **1** TEG-Amide 24 h prima del tiolo **2** Fosforilcolina; destra) Stesso campione trattato con iodio: la composizione risulta essere 75% **1** TEG-Amide-25% **2** Fosforilcolina.

---

## 5. Bibliografia

---

- (1) Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 4630.
- (2) Enustun, B. V.; Turkevich, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3317.
- (3) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1994**, 801.
- (4) Jana, N. R.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14280.
- (5) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120.
- (6) Templeton, A. C.; Hostetler, M. J.; Warmoth, E. K.; Chen, S.; Hartshorn, C. M.; Krishnamurthy, V. M.; Forbes, M. D. E.; Murray, R. W. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 4845.
- (7) Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 3782.
- (8) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215.
- (9) Zelakiewicz, B. S.; de Dios, A. C.; Tong *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 18.
- (10) Clore, G. M.; Iwahara, J. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 4108.

- (11) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Scrimin, P.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7200.
- (12) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Gentilini, C.; Polizzi, S.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16384.
- (13) Riess, J. G. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4113.
- (14) Krafft, M. P.; Riess, J. G. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, *45*, 1185.
- (15) Gentilini, C.; Evangelista, F.; Rudolf, P.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Pasquato, L. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 15678.
- (16) Gentilini, C.; Franchi, P.; Mileo, E.; Polizzi, S.; Lucarini, M.; Pasquato, L. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 3060.
- (17) Boccalon, M.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Delgado, J. J.; Sousa, F.; Stellacci, F.; Zucca, I.; Scotti, A.; Spreafico, R.; Pengo, P.; Pasquato, L. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 8794.
- (18) Jackson, A. M.; Myerson, J. W.; Stellacci, F. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 330.
- (19) Jackson, A. M.; Hu, Y.; Silva, P. J.; Stellacci, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11135.
- (20) DeVries, G. A.; Brunnbauer, M.; Hu, Y.; Jackson, A. M.; Long, B.; Neltner, B. T.; Uzun, O.; Wunsch, B. H.; Stellacci, F. *Science* **2007**, *315*, 358.
- (21) Carney, R. P.; DeVries, G. A.; Dubois, C.; Kim, H.; Kim, J. Y.; Singh, C.; Ghorai, P. K.; Tracy, J. B.; Stiles, R. L.; Murray, R. W.; Glotzer, S. C.; Stellacci, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 798.
- (22) Rice, C. V. In *Environmental and Molecular Mutagenesis*; Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 2007; Vol. 48, p 533.
- (23) Ghosh, A.; Basak, S.; Wunsch, B. H.; Kumar, R.; Stellacci, F. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2011**, *50*, 7900.
- (24) Liu, X.; Yu, M.; Kim, H.; Mamei, M.; Stellacci, F. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 9.
- (25) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 1523.
- (26) Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Baxter, R.; Teobaldi, G.; Zerbetto, F. *Langmuir* **2003**, *19*, 5172
- (27) Pengo, P.; Polizzi, S.; Battagliarin, M.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13*, 2471.







# SEZIONE B

Interazioni del Monostrato delle  
Nanoparticelle con Piccole Molecole:  
NMR Chemosensing e Molecular Switches



# 1. Introduzione

---

## **1.1 Chemosensori**

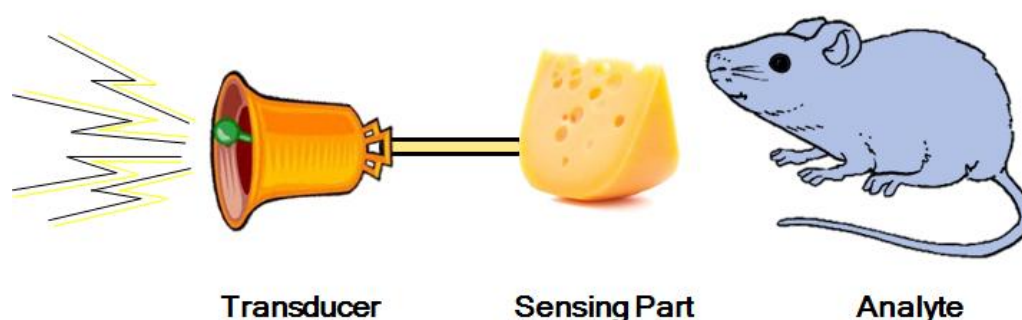
La ricerca sui “chemosensori” ha subito una rapida crescita negli ultimi anni, guidata in gran parte dalle necessità della medicina diagnostica, dal monitoraggio dell’ambiente e dalle analisi tossicologiche, oltre alla necessità di indagare, attraverso la scoperta di nuovi *probes*, la profonda relazione esistente tra la presenza di *markers* chimici o biologici e le loro implicazioni.

La parola chemosensore assume diversi significati nei vari ambiti della ricerca. In biologia esso è definito come un recettore basato su macromolecole biologiche, quali peptidi, proteine e acidi nucleici, che trasduce un segnale chimico in un’azione potenziale. In chimica, invece, ed in particolare nel campo supramolecolare, il termine chemosensore è associato a recettori sintetici in grado di segnalare o produrre un segnale in presenza dell’analita.



Ancora, un sensore, nell'ambito della chimica analitica, è uno strumento che misura la quantità di analita presente in un campione.<sup>1</sup>

Per risolvere questo conflitto di definizioni, nel 1993 Anthony W. Czarnik ha proposto la seguente definizione di chemosensore: “un composto di origine abiotica che genera un complesso con un analita con concomitante trasduzione di un segnale”, (Fig. 1.1).<sup>2</sup>



**Figura 1.1:** Rappresentazione di un sensore chimico: il topolino, che funge da analita, genera un segnale rilevabile, il suono della campanella, quando arriva al formaggio, in questo caso il sensore.

I criteri da seguire per la costruzione di un chemosensore sono: la selettività e l'affinità verso uno specifico analita; l'efficienza nella produzione di un segnale, che deve essere facilmente rilevabile e quantificabile; la cinetica di rilevamento, che deve essere rapida e possibilmente reversibile; la facilità di produzione. Un altro importante criterio per valutare un sensore è la minima quantità di analita che è in grado di segnalare (limite di rilevabilità): più questa è bassa più il sensore è sensibile. Normalmente, un limite di rilevabilità molto piccolo richiede un'alta affinità del sensore per l'analita, in modo da ottenere una risposta misurabile. Tuttavia, alta affinità e alta selettività si trovano spesso su fronti diversi dello schieramento. Infatti, i recettori con alte costanti di *binding*, definita come costante di equilibrio per la formazione del complesso recettore-analita, spesso legano molti analiti, al contrario, recettori con elevata selettività spesso presentano basse costanti di *binding*.<sup>3</sup>

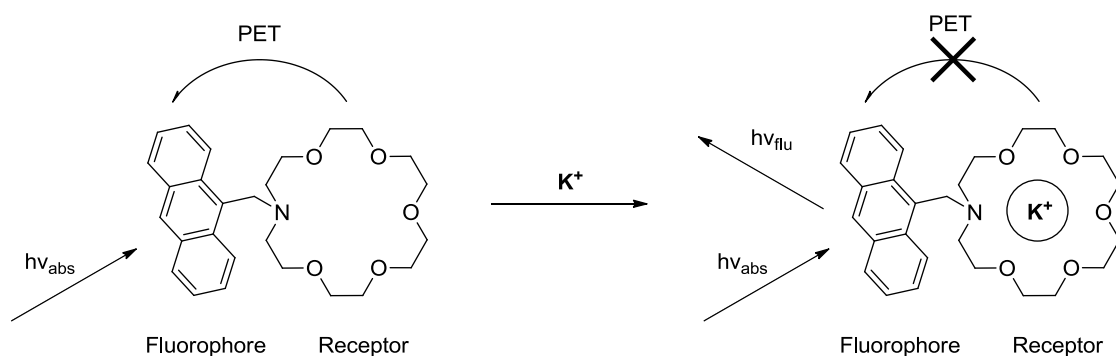
Al cuore di ogni meccanismo di *sensing* molecolare, come appena evidenziato, si trova un evento di riconoscimento di varia natura, ad esempio la protonazione di un gruppo silanolato sulla superficie di un elettrodo a vetro per la misurazione del pH oppure il riconoscimento anticorpo-antigene in un saggio elisa. È proprio questo evento di

*binding* a indurre la generazione di un segnale misurabile, che può essere di fluorescenza<sup>4</sup>, di assorbanza<sup>5</sup>, di potenziale redox<sup>6</sup>, di rilassamento<sup>7</sup> o di qualsiasi altra proprietà rilevabile.

### 1.1.1 Sensori fluorescenti

Tutte queste tecniche portano numerosi vantaggi: in particolare la fluorescenza, che ha riscosso il successo maggiore, è una tecnica estremamente sensibile che può arrivare a rilevare anche la singola molecola; permette di poter lavorare accendendo o spegnendo la fluorescenza; ha una risoluzione spaziale nanometrica e una risoluzione temporale inferiore al nanosecondo.<sup>4</sup>

Un esempio semplice di sensore che genera un segnale di fluorescenza è riportato in Figura 1.2 ed è basato su un sistema etere corona-antracene.<sup>8</sup> L'etere corona è deputato al riconoscimento dello ione potassio, mentre l'antracene è il generatore del segnale. Quando l'antracene è legato all'etere corona, la sua fluorescenza viene spenta a causa del trasferimento di un elettrone dal doppietto elettronico libero presente sull'azoto dell'etere corona. In presenza del potassio, il doppietto elettronico è coinvolto nella complessazione dello ione metallico ed il trasferimento elettronico non è più possibile, permettendo all'antracene di generare il segnale di fluorescenza. Questo tipo di sensore è chiamato sensore PET (*Photon-induced Electron Transfer*).<sup>3</sup>



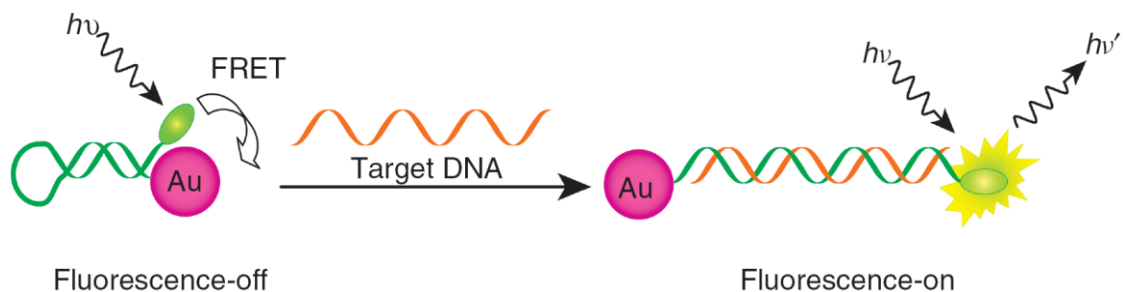
**Figura 1.2:** Schema di funzionamento del sensore PET basato su un sistema antracene-etere corona. Inizialmente la fluorescenza dell'antracene è spenta per retrodonazione degli elettroni liberi presenti sull'azoto al fluoroforo; in seguito ad interazione con l'analita, lo ione potassio, gli elettroni liberi dell'azoto si trovano impiegati nel legame e l'antracene è libero di emettere segnale.

Anche le nanoparticelle possono essere utilizzate come sensori fluorescenti, ed in particolare possono essere considerate come cromofori non-molecolari con coefficienti di estinzione molare particolarmente elevati, per esempio per nanoparticelle d'oro di 20 nm di diametro il coefficiente di estinzione molare è di  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  che è di tre ordini di grandezza superiore rispetto a dei comuni coloranti organici.<sup>9</sup> Per questo motivo, le nanoparticelle possono essere utilizzate come *quencher* se vicine a dei fluorofori. La capacità di agire come *quencher* delle nanoparticelle le rende degli eccezionali accettori di energia in saggi FRET per il rilevamento di diversi analiti. Ad esempio, la formazione di un complesso tra  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ , un complesso cationico, e nanoparticelle d'oro ricoperte da tiopronina, un sistema anionico, è guidata da delle interazioni elettrostatiche ed è impiegata nell'individuazione di ioni metallici.<sup>10</sup> In questo sistema, inizialmente, la fluorescenza della parte poli-piridinica è spenta e può essere attivata in seguito alla dissociazione del complesso per aggiunta di elettroliti come sali di  $\text{K}^+$ ,  $\text{Bu}_4\text{N}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Entrambi i processi di spegnimento e riattivazione della fluorescenza, seguono la relazione di Stern-Volmer, permettendo la rilevazione degli analiti.

Lo stesso principio è utilizzato nell'ideazione di un sensore per ioni  $\text{Hg}^{2+}$  basato su nanoparticelle d'oro passivate con rodamina-B.<sup>11</sup> In maniera molto simile, nanoparticelle d'oro su cui vi è stato adsorbito del rosso Nile sono utilizzate per il rilevamento selettivo di amminotoli.<sup>12</sup> Tang e i suoi collaboratori hanno sintetizzato un sensore per il colesterolo basato sul FRET che utilizza una molecola che agisce da ponte tra il fluoroforo e le nanoparticelle.<sup>13</sup> Allo stesso scopo sono state funzionalizzate nanoparticelle d'oro con  $\beta$ -ciclodestrina (CD). L'inclusione nella cavità della ciclodestrina di fluoresceina (FL) genera un nuovo complesso AuNp-CD-FL, che mantiene donatore ed accettore nella giusta posizione affinché avvenga FRET. La presenza del colesterolo nel sistema causa l'interruzione del FRET poiché sostituisce la fluoresceina nella cavità della ciclodestrina. La liberazione della fluoresceina è proporzionale alla concentrazione di colesterolo, che viene rilevato fino a concentrazioni nanomolari.

Un saggio, sempre basato su FRET per l'individuazione di DNA è stato ottenuto marcando un oligonucleotide con un fluoroforo e con l'addotto così ottenuto sono state passivate le nanoparticelle.<sup>14,15</sup> Come mostrato in figura 1.3, il fluoroforo è stato

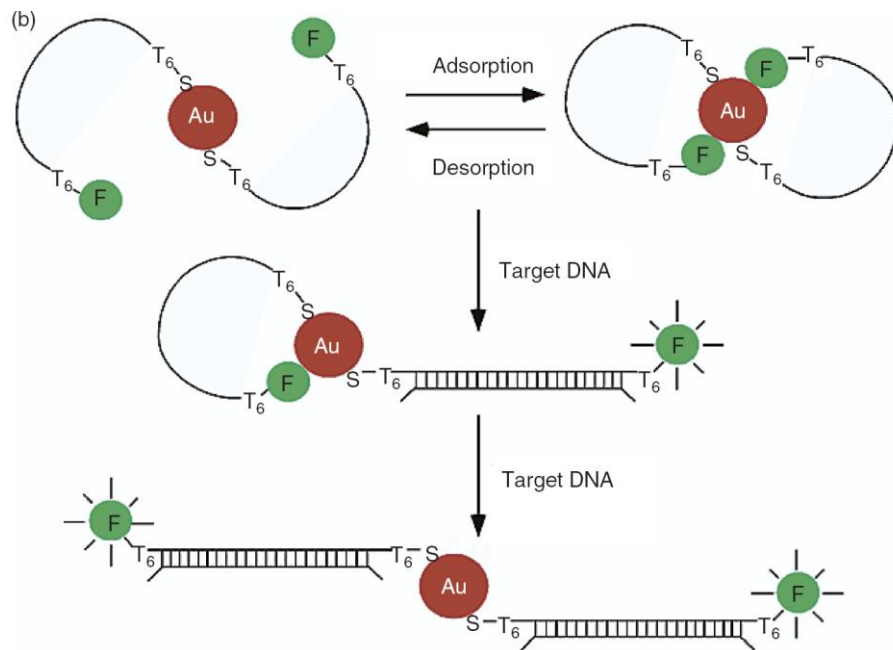
coniugato con la nanoparticella alla fine di una struttura a forcina. La struttura a forcina chiusa mantiene, inizialmente, fluoroforo e nanoparticella vicine, provocando lo spegnimento della fluorescenza attraverso il FRET.



**Figura 1.3:** Rappresentazione schematica del sensore basato su FRET per rilevare il DNA utilizzando una nanoparticella d'oro marcata con una sonda molecolare.

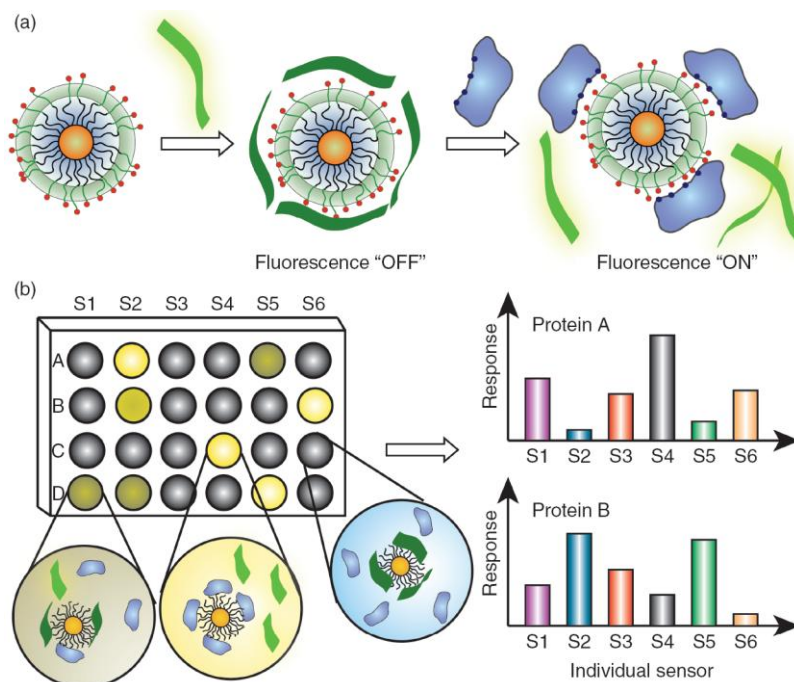
In seguito al *binding* del DNA complementare, la struttura a forcina si apre, incrementando la distanza donatore-accettore che interrompe il FRET e determina, quindi, un aumento della fluorescenza. Questa sonda molecolare basata su nanoparticelle d'oro mostra un incremento di 100 volte in sensibilità verso il singolo filamento di DNA che non accoppia in maniera corretta rispetto ai comuni *quencher* molecolari.

Utilizzando un approccio simile, Nie et al.<sup>16</sup> hanno mostrato che nanoparticelle funzionalizzate con un oligonucleotide a singolo filamento terminante con un fluoroforo, possono assemblarsi spontaneamente in una conformazione rigida assomigliante ad un arco. Come si può vedere dalla figura 1.4, nello stato assemblato il fluoroforo è spento a causa della vicinanza tra donatore ed accettore. In seguito al legame della molecola target (una molecola di DNA complementare), si osserva uno stiramento del filamento indotto dall'ibridizzazione. Di conseguenza, la conformazione costretta si apre ed il fluoroforo si allontana dalla superficie d'oro della nanoparticella, con conseguente aumento dell'emissione di fluorescenza dovuta all'aumento di distanza tra donatore e accettore.<sup>17</sup>



**Figura 1.4:** Sensore per DNA basato su nanoparticelle d'oro che utilizza la capacità delle nanoparticelle di spegnere la fluorescenza.

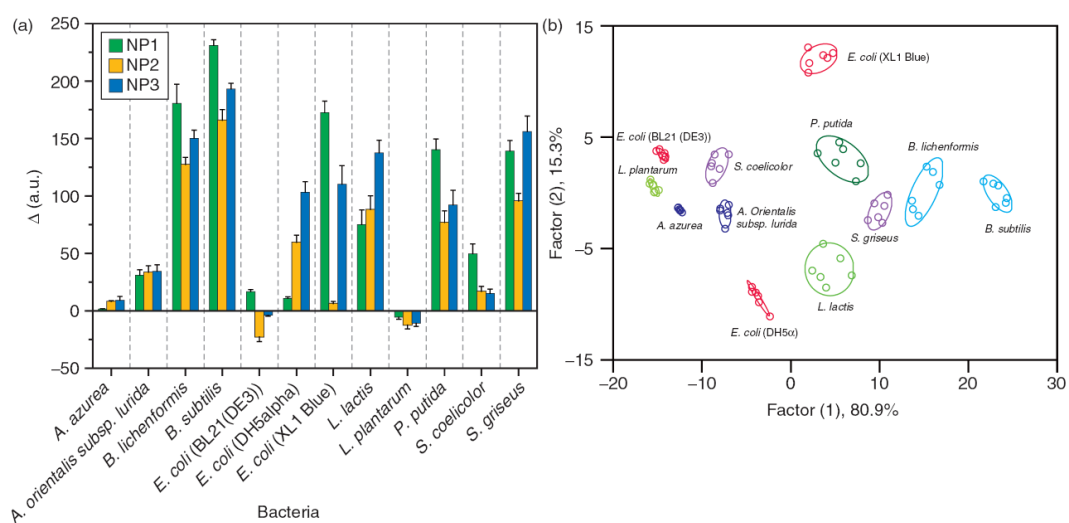
Recentemente, Rotello e i suoi collaboratori<sup>18</sup> hanno sintetizzato un sensore composto da una matrice di sei diverse nanoparticelle d'oro cationiche e un polimero anionico composto da poli(*p*-fenilene)etilenene (PPE) (Fig. 1.5).



**Figura 1.5:** Illustrazione schematica della matrice "chemical nose". (a) Il *binding* competitivo tra proteine e complessi polimero-AuNp a fluorescenza smorzata porta al ripristino di quest'ultima. (b) Per proteine singole la combinazione di una matrice di sensori genera un pattern di risposte caratteristiche.

Questo sistema si basa su un saggio di spiazzamento di un indicatore fluorescente accoppiato all'approccio del "chemical nose" e può rilevare, identificare e quantificare sette comuni proteine. Nella progettazione di questo sensore, la fluorescenza intrinseca del polimero è inizialmente smorzata dalle nanoparticelle attraverso la formazione di complessi polimero-nanoparticella guidati da interazioni elettrostatiche. La presenza di proteine rompe l'interazione di cui sopra attraverso *binding* competitivo, ripristinando la fluorescenza. Le interazioni proteina-nanoparticella sono governate dalle loro rispettive caratteristiche strutturali (ad esempio: carica, idrofobicità, idrofilicità e siti di legame a idrogeno). Perciò, le diverse affinità fra nanoparticelle e proteine portano a *pattern* caratteristici di risposta per singole proteine.

I sistemi coniugati nanoparticella-polimero sono stati utilizzati in maniera simile per identificare i batteri<sup>19</sup>, che sono di grande importanza nelle scienze alimentari, mediche, forensi e ambientali. Il polimero SW-CO<sub>2</sub> è stato combinato con tre nanoparticelle cationiche per generare un costrutto a fluorescenza smorzata. In presenza di batteri i polimeri PPE riguadagnano la loro fluorescenza con pattern di risposta distintivi. Questo tipo di sensore è stato in grado di identificare 12 tipi di specie di batteri compresi gram positivi (es. *Anchusa azurea*, *Bacillus subtilis*) e gram negativi (es. *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*) (Fig. 1.6 a).



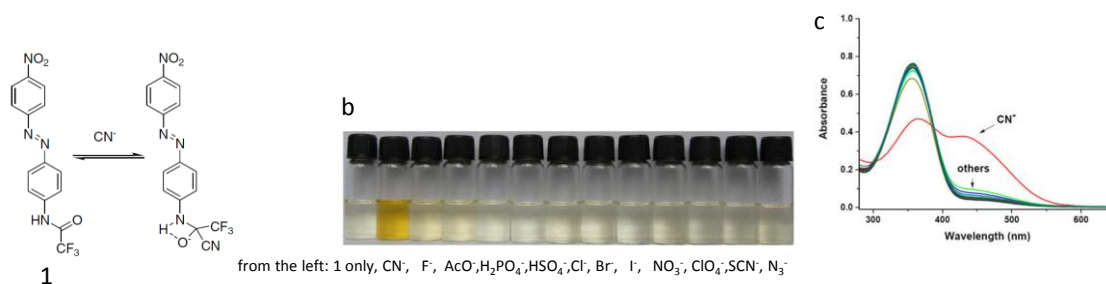
**Figura 1.6:** a) Pattern di risposta di fluorescenza dei costrutti nanoparticelle-polimero in presenza di diversi batteri. b) Plot canonico per i pattern di risposta processati con analisi discriminante lineare.

Il principio di questo tipo di sensore è stato applicato per distinguere la differenziazione rapida ed effettiva tra cellule normali e cellule tumorali, un problema importante per la diagnosi e il trattamento dei tumori.<sup>20</sup> Recentemente, i sistemi coniugati nanoparticelle-polimeri sono stati sostituiti da coniugati nanoparticelle-proteina verde fluorescente (AuNPs-GFP) per ottenere un sistema più efficace adatto al *sensing* delle proteine nel siero.<sup>21</sup>

### 1.1.2 Sensori colorimetrici basati sull'assorbanza

L'utilizzo dell'assorbanza, e, nel suo limite massimo, dell'occhio umano, ha l'indiscusso vantaggio di utilizzare strumentazione non sofisticata, di essere veloce e di avere un basso limite di rilevabilità, anche se superiore a quello ottenibile con la luminescenza.<sup>5</sup>

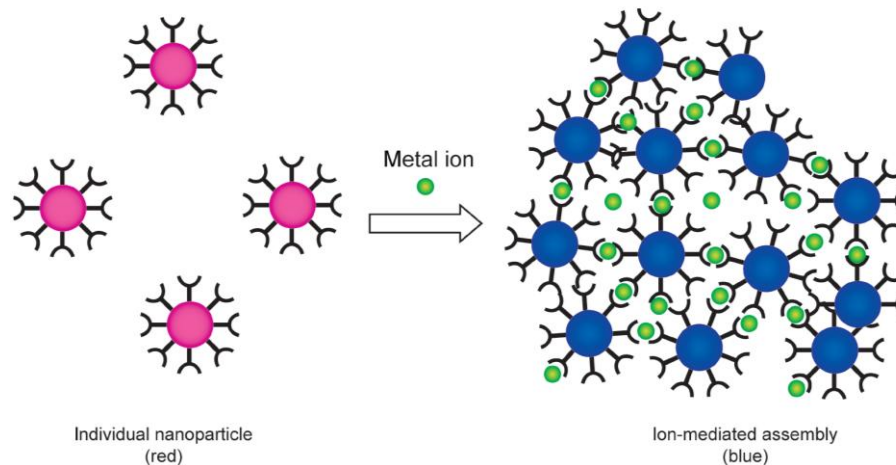
Un sensore che si basa su questa proprietà è riportato in figura 1.7, è stato proposto per rilevare la presenza di piccole quantità di ioni cianuro. Il recettore è composto da due parti: un azobenzene che agisce da cromoforo e un gruppo trifluoroacetile quale recettore; l'anione cianuro è un forte nucleofilo e il suo attacco al un gruppo carbonilico elettrone-povero determina una modifica dello spettro di assorbimento del sensore che consente il rilevamento del cianuro in acqua.<sup>22</sup>



**Figura 1.7:** a) Struttura del sensore **1** e possibile meccanismo di attacco dello ione cianuro, b) Vials che identificano il cambiamento di colore, c) Spettri di assorbimento di **1** [25  $\mu\text{M}$ ] con vari anioni in  $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  (95:5, v:v).

Concettualmente analogo, il fenomeno noto come SPR (Risonanza Plasmonica di Superficie, v. sopra) è assente sia nelle piccole nanoparticelle ( $d < 2\text{nm}$ ) che nei materiali *bulk*. Tale fenomeno è fortemente dipendente sia dalle dimensioni che dalla vicinanza ad altre nanoparticelle come, ad esempio, nel caso dell'aggregazione (*clustering*). Il *clustering* delle nanoparticelle provoca l'accoppiamento interparticellare dei plasmoni di superficie, che si traduce in un significativo spostamento verso il blu e

nell'allargamento della banda SPR (Fig. 1.8).<sup>23</sup> Si consideri che anche a concentrazioni nanomolari il viraggio può essere facilmente osservato ad occhio nudo. Questo evento fornisce un potente mezzo per il rilevamento di numerose sostanze che possono andare da semplici ioni metallici a piccole molecole di rilevanza biologica fino a polinucleotidi complessi e proteine.

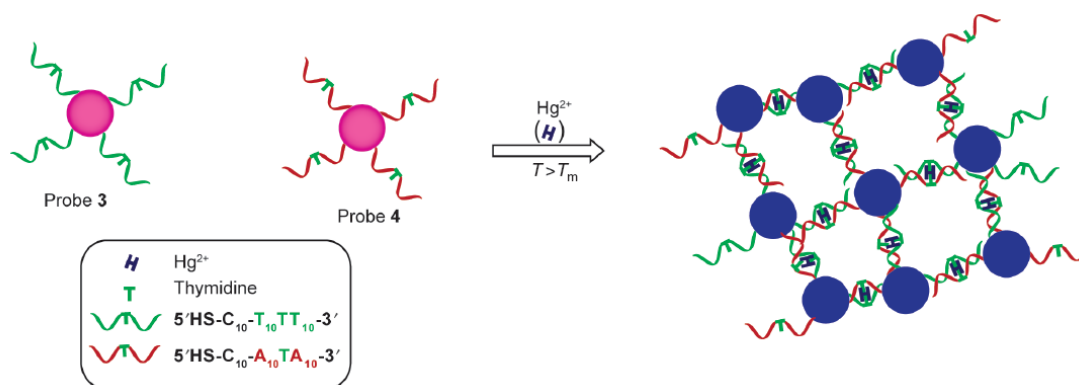


**Figura 1.8:** Rappresentazione schematica di un assemblaggio di nanoparticelle indotto da ioni metallici.

Metalli pesanti come  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  sono tossici e inerenti alle problematiche di salute pubblica in ragione della loro abbondanza nel terreno e nelle acque; perciò, il loro rilevamento risulta di fondamentale importanza nel contesto delle scienze ambientali. Hupp *et al.* hanno proposto un sistema di monitoraggio degli ioni metallici basato sull'aggregazione di nanoparticelle di 13 nm funzionalizzate con acido 11-mercaptoundecanoico (MUA).<sup>24</sup> I carbossilati sulla superficie agiscono da gruppi chelanti e l'aggregazione tra nanoparticelle è proprio guidata dalla chelazione degli ioni dei metalli pesanti, quali  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  ( $\geq 400 \mu M$ ), mentre lo ione  $Zn^{2+}$  a causa della bassa affinità non si dimostra in grado di mediare l'aggregazione. In un successivo lavoro, sono stati apportati significativi miglioramenti nella selettività e nella sensibilità del sistema cambiando la composizione del tampone.<sup>25</sup>

Recentemente, sono state utilizzate nanoparticelle funzionalizzate con DNA per il rilevamento selettivo del mercurio bivalente.<sup>26</sup> Questo sistema, sviluppato da Mirkin *et al.* è basato sulla specifica chimica di coordinazione tra  $Hg^{2+}$  e timidina e sulla temperatura di *melting* ( $T_m$ ) appositamente progettata per il sistema aggregato.

Innanzitutto, le nanoparticelle sono state funzionalizzate con due diverse sequenze di DNA tiolato per ottenere due diverse sonde (indicati come *probes* 3 e 4 nella figura 1.9). In ragione dei disaccoppiamenti tra timidine, le nanoparticelle formano aggregati con una  $T_m$  più bassa rispetto a quella che si otterrebbe in presenza di mercurio. Quest'ultimo, infatti, coordina selettivamente le timidine disaccoppiate innalzando la temperatura di *melting* dell'intero sistema. In questo modo è stato possibile rilevare una concentrazione di 100 nM di mercurio a causa dell'aggregazione e del conseguente viraggio da esso innescati.



**Figura 1.9:** Rilevamento di ioni Hg<sup>2+</sup> usando nanoparticelle funzionalizzate con DNA e basato sulla chimica di coordinazione timidina- Hg<sup>2+</sup> -timidina.

Recentemente, un sistema simile è stato utilizzato per discriminare l'amminoacido cisteina dagli altri amminoacidi.<sup>27</sup> Nel rilevamento degli ioni, l'obiettivo principale è la simultanea risoluzione dei problemi di selettività e sensibilità. Liu e Lu<sup>28,29</sup> hanno proposto un elegante esempio di biosensore colorimetrico per ioni piombo ad alta sensibilità e selettività implementando l'aggregazione di nanoparticelle guidata da DNAzimi (Fig. 1.10)

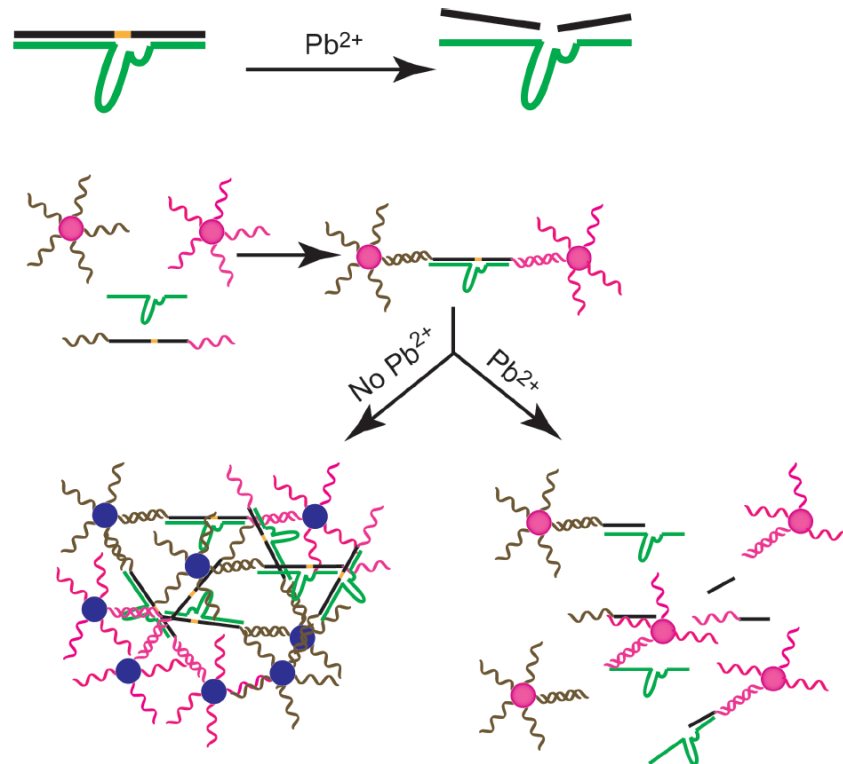


Figura 1.10: Rilevamento colorimetrico di ioni  $Pb^{2+}$  mediante DNAzime.

I "DNAzimi" sono altamente specifici per gli ioni  $Pb^{2+}$  e sono composti da un filamento catalitico e da uno con funzione di substrato. Il DNAzima, inizialmente, produce una colorazione blu del sistema composto da DNA-funzionalizzato e nanoparticelle d'oro. La presenza di ioni  $Pb^{2+}$  attiva il DNAzima che taglia il filamento substrato innescando la liberazione delle nanoparticelle e provocando un cambiamento di colore dal blu al rosso. La concentrazione di piombo rilevata è di 100 nM. In questo sistema, l'orientazione delle nanoparticelle gioca un ruolo fondamentale nel veloce e sensibile rilevamento del  $Pb^{2+}$ , l'ottimizzazione dell'orientazione stessa delle nanoparticelle permette a temperatura ambiente di rilevare il  $Pb^{2+}$  in meno di 10 min.<sup>30,31</sup>

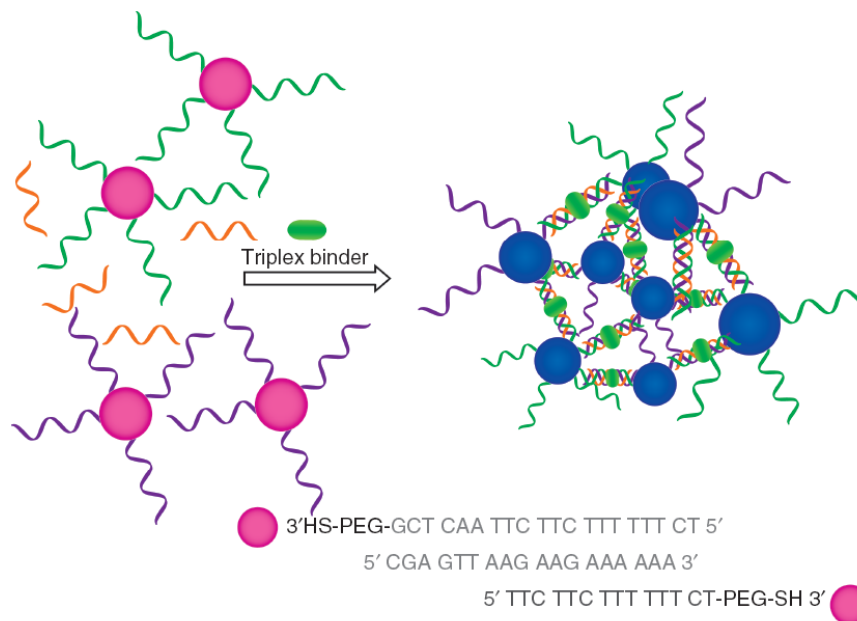
Gli aptameri sono oligonucleotidi a filamento singolo selezionati da librerie combinatoriali mediante processi SELEX (Evoluzione Sistemica dei Ligandi per Arricchimento Esponenziale). Le loro proprietà chimiche e strutturali permettono loro di legare una vasta gamma di ligandi con alta affinità e specificità.<sup>32</sup>

Il primo esempio dell'utilizzo di aptameri coniugati a nanoparticelle è stato riportato da Willner e collaboratori per il rilevamento di trombina.<sup>33</sup> Successivamente, un efficace sensore per la cocaina basato sull'assemblaggio di nanoparticelle mediato da cocaina-

aptameri è stato disegnato da Lu e collaboratori.<sup>34</sup> In questo lavoro le nanoparticelle sono state funzionalizzate con due tipi di DNA a filamento singolo (ssDNA). In presenza della molecola *linker* cocaina-aptamero, si assiste all'accoppiamento di questa con i filamenti singoli di DNA sulle nanoparticelle. Questo evento genera aggregati blu dove una parte della molecola *linker* prende parte nell'ibridizzazione del DNA. Quando la molecola bersaglio, cocaina, viene aggiunta al sistema, l'aptamero modifica la propria conformazione per legare l'alcaloide. Il cambio strutturale risulta nella disgregazione delle nanoparticelle con concomitante viraggio dal blu al rosso. Poiché il fenomeno descritto dipende dalla concentrazione di cocaina, è stato possibile definire un intervallo operativo compreso tra 50 e 500  $\mu\text{M}$ . Successivamente, il sistema è stato raffinato utilizzando miscele di aptameri diversi per ottenere un substrato intelligente in grado di rispondere a combinazioni di differenti analiti.<sup>35,36</sup>

Sin dalla scoperta dell'assemblaggio delle nanoparticelle mediato da DNA nel 1996,<sup>37</sup> l'aggregazione di nanoparticelle diretta da oligonucleotidi è stata estensivamente utilizzata sia nella rilevazione colorimetrica di nucleotidi<sup>38,39</sup> che nella realizzazione di assemblati strutturati.<sup>40</sup> In generale, per il rilevamento di oligonucleotidi, si utilizzano due filamenti di DNA a singolo filamento modificati. Le sequenze di base sfruttate nei ssDNA modificati sono complementari a entrambe le estremità degli oligonucleotidi bersaglio. Di conseguenza, la presenza di oligonucleotidi induce aggregazione che, a sua volta, porta ad un viraggio rosso-blu rilevabile. La forza e l'alta specificità degli accoppiamenti delle basi nelle molecole di DNA unite all'elevata assorbanza delle nanoparticelle permette il rilevamento di oligonucleotidi ad intervalli sub-picomolari senza l'utilizzo di PCR.<sup>41</sup>

Screening colorimetrici di ligandi per DNA a triplo filamento (DNA triplex) sono stati altresì sfruttati utilizzando l'aggregamento di nanoparticelle indotto da oligonucleotidi (Fig. 1.11).<sup>42</sup>

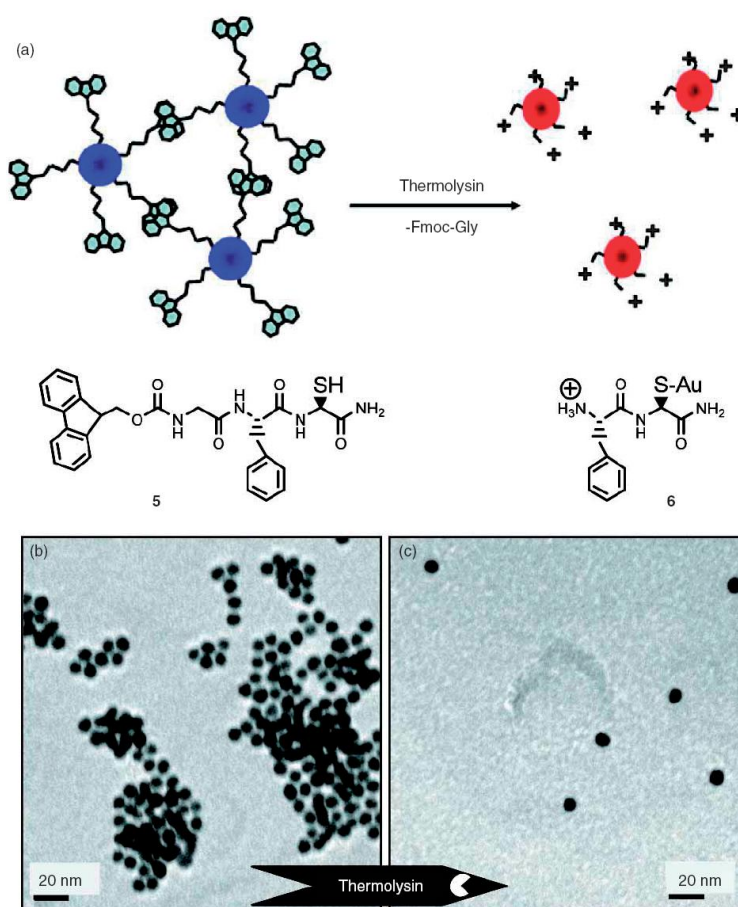


**Figura 1.11:** Aggregazione di nanoparticelle indotta da ligandi per DNA-triplex sfruttata per lo screening combinatoriale di potenziali binders per il DNA triplex.

Il saggio per i ligandi del DNA triplex si basa su due tipi di nanoparticelle funzionalizzate con ssDNA non complementari ed un filamento di DNA libero. Tale filamento è progettato in modo da formare DNA triplex con i ssDNA sulle nanoparticelle. Tuttavia, a temperatura ambiente, non si osserva alcun tipo di aggregazione a causa della bassa stabilità della struttura triplex. In presenza, però, di appropriati ligandi per il DNA triplex si assiste all'aggregazione del sistema con il consueto viraggio in ragione di una stabilizzazione della struttura triplex. La semplicità di questo metodo lo rende adatto allo screening combinatoriale di librerie di potenziali ligandi per il DNA triplex e lo rende altresì più vantaggioso rispetto ad altre tecniche quali la spettrometria di massa competitiva, la dialisi e l'elettroforesi.

Anche i ditioli possono agire come *cross-linkers* ed indurre l'aggregazione di nanoparticelle.<sup>43</sup> L'assemblaggio di nanoparticelle attraverso peptidi funzionalizzati con ditioli può fornire un'eccellente sistema per la rivelazione di attività proteasica.<sup>44</sup> In uno studio rappresentativo, Scrimin e collaboratori<sup>45</sup> hanno progettato substrati peptidici specifici per la trombina contenenti due derivati cisteinici rispettivamente C-terminale ed N-terminale. Ai fini del saggio, i peptidi sono stati prima trattati con proteasi e successivamente incubati con 12 nm di nanoparticelle stabilizzate con citrato. In assenza della proteasi bersaglio, i peptidi rimasti intatti inducono

aggregazione nelle nanoparticelle, mentre in presenza di trombina i frammenti residui non portano ad aggregazione e al conseguente viraggio. In un saggio alternativo, Stevens *et al.*<sup>46</sup> hanno ulteriormente semplificato questo approccio in due passaggi utilizzando nanoparticelle funzionalizzate con Fmoc-peptidi. Il peptide è un substrato per la termolisina e nasconde un residuo di cisteina. Come mostrato in figura 1.12 l'interazione di  $\pi$ -stacking tra i gruppi Fmoc induce uno stato aggregato del sistema. In presenza di termolisina i ligandi peptidici vengono digeriti e la conseguente dispersione delle nanoparticelle induce il viraggio opposto blu-rosso. Questo sistema ha raggiunto l'impressionante sensibilità di 90 zg/mL. Similmente, il principio dell'aggregazione/disgregazione di nanoparticelle innescato da enzimi è stato sfruttato per rilevare kinasi<sup>47</sup> e fosfatasi<sup>48</sup> unitamente alla determinazione delle loro attività. Di recente un saggio colorimetrico per cambiamenti conformazionali di proteine è stato realizzato sfruttando sempre nanoparticelle d'oro.<sup>49</sup>

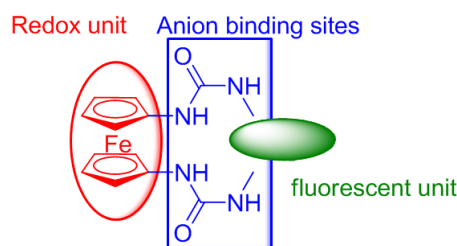


**Figura 1.12:** (a) Schematizzazione della disaggregazione di nanoparticelle innescata da enzimi per il rilevamento della termolisina. (b) Immagini TEM delle nanoparticelle funzionalizzate con il peptide 5. (c) Immagine TEM delle nanoparticelle disaggregate dopo aggiunta di termolisina e generazione di 6.

### 1.1.3 Sensori elettrici ed elettrochimici

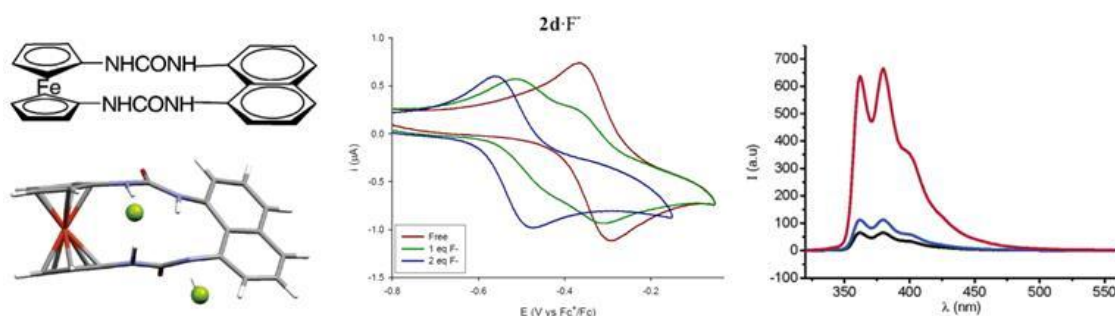
Per quanto riguarda i sensori elettrochimici, anch'essi essi hanno bassi limiti di rilevabilità, un ampio intervallo di risposta e una buona stabilità e riproducibilità.<sup>50</sup>

Un esempio di sensore per anioni può essere quello che combina molecole di urea e ferrocene. L'urea è un legante che presenta due forti siti donatori di legame a idrogeno che sono impiegati per il riconoscimento di anioni, mentre il ferrocene è l'unità dotata di attività red-ox (Fig. 1.13).



**Figura 1.13:** Schema per un sensore per anioni basato su urea e ferrocene; l'urea è la parte di molecola designata per il *binding* degli anioni, mentre il ferrocene è la parte dotata di attività red-ox.<sup>6</sup>

Tra la famiglia di sensori proposti, quello riportato in figura 1.14a, l'1,3,7,9-tetraaza[9]ferrocenofano è risultato essere estremamente selettivo per lo ione fluoruro non solo per l'elevato incremento del segnale di fluorescenza, ma anche per l'importante *shift* catodico nell'onda di ossidazione del ferrocene nella voltammetria ciclica.



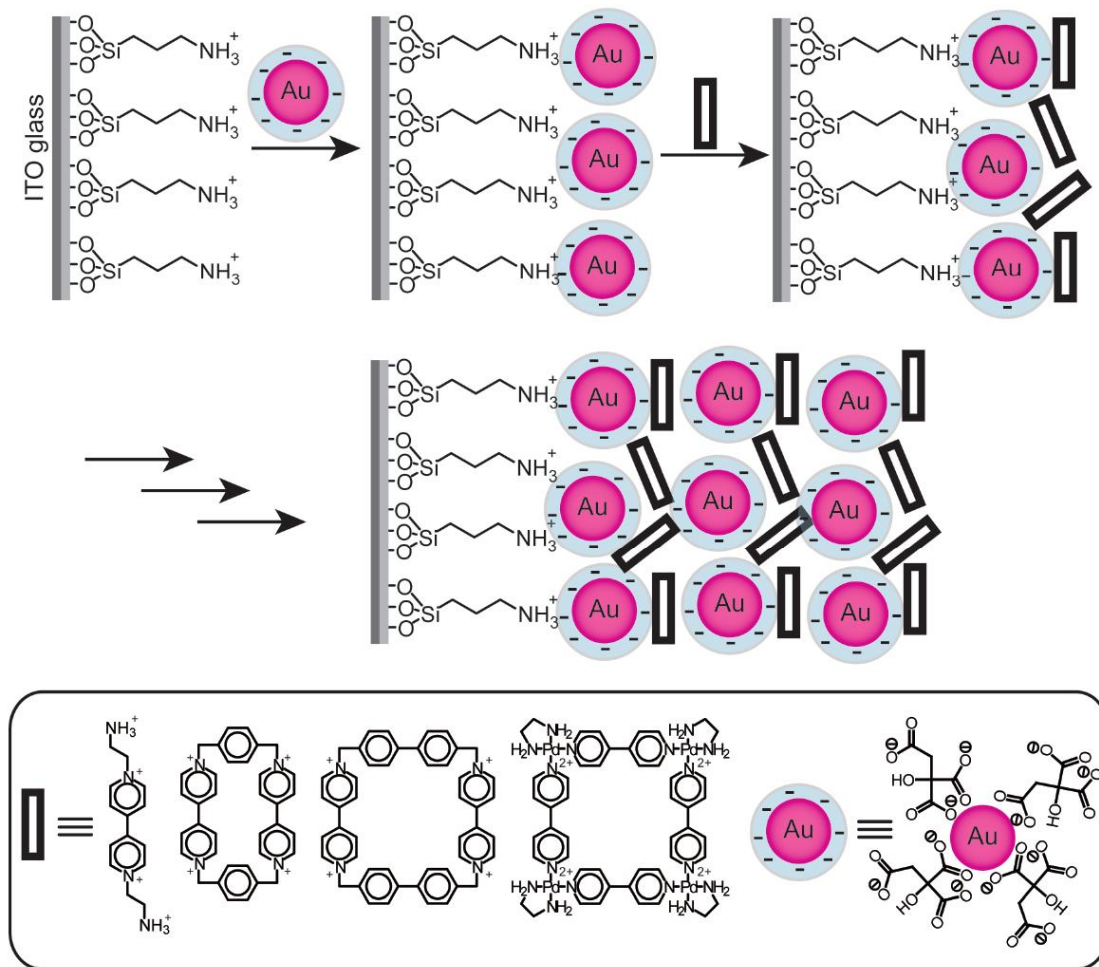
**Figura 1.14:** **a)** Struttura del sensore 1,3,7,9-tetraaza[9]-ferrocenofano; **b)** Struttura del sensore calcolata (B3LYP/6-31G\*) in presenza di due ioni fluoruro (palline verdi); **c)** Risposta elettrochimica del sensore ( $[10^{-3} \text{ M}]$  in DMSO dopo aggiunta dello ione  $\text{F}^-$  usando  $n\text{-Bu}_4\text{N}^+\text{ClO}_4^-$  [0.1 M] come elettrolita di supporto, velocità di scansione  $100\text{mV s}^{-1}$ ; **d)** Emissione di fluorescenza del sensore ( $[5 \times 10^{-5} \text{ M}]$  in DMSO) dopo aggiunta dello ione fluoruro (linea rossa) e dello ione diidrogenofosfato (linea blu),  $\lambda_{\text{exc}}=310\text{nm}$ .

Le nanoparticelle d'oro possono essere utilizzate come componenti funzionali per applicazioni elettroanalitiche grazie alla loro biocompatibilità, eccellente conducibilità, porosità dell'interfaccia conduttiva che permette di effettuare *sensing* e proprietà catalitiche.<sup>51</sup> L'assemblaggio di multistrati di nanoparticelle d'oro su un elettrodo aumenta significativamente l'area superficiale, consentendo un'elevata sensibilità nel rilevamento di analiti redox.<sup>52</sup> Inoltre, su un elettrodo poroso, gli analiti o le coppie redox hanno più libertà di orientazione per prevenire l'isolamento di carica. Questo facilita il trasferimento elettronico attraverso i canali conduttivi delle nanoparticelle e le proprietà di conducibilità alle dimensioni nanoscalari permettono il contatto elettrico dei centri redox delle proteine con la superficie dell'elettrodo.

Proprio queste caratteristiche uniche che appartengono alle nanoparticelle hanno aiutato i ricercatori nella costruzione di differenti sensori come i sensori elettrochimici basati su nanoparticelle funzionalizzate con molecole o polimeri con funzione di *sensing* all'interfaccia; oppure i sensori elettrochimici per vapori; differenti biosensori che includono anche elettrodi basati su enzimi, ecc.<sup>53</sup>

Gli effetti combinati di attività elettrica delle nanoparticelle e della capacità di complessazione di composti macrociclici hanno fatto sì che si sviluppasse un particolare interesse nell'individuazione di sensori basati sul riconoscimento molecolare.

Lo sfruttamento di queste caratteristiche ha condotto alla sintesi e allo studio di una serie di sensori elettrochimici da parte di Willner e collaboratori.<sup>54,55</sup> Nel loro sistema, nanoparticelle stabilizzate da citrato sono state *cross-linkate* elettrostaticamente con ciclofani oligocationici e depositati alternativamente su un vetro conduttivo composto da 3-amminopropiletossisilano depositato su un sottile strato di ossido di titanio dopato con indio (ITO) (Fig. 1.15).



**Figura 1.15:** Formazione del multistrato per auto-assemblaggio di AuNp stabilizzate da citrato e ciclofani oligocationici.

I ciclofani biperidinici servono da “colla molecolare” per l’associazione, nella loro cavità, di substrati  $\pi$ -donatori quali idrochinoni e la conducibilità 3D della matrice di nanoparticelle consente di rilevare elettrochimicamente substrati  $\pi$ -donatori che si associano all’unità ciclofano. Il riconoscimento molecolare aumenta la concentrazione locale di substrati sulla superficie dell’elettrodo, facilitando il rilevamento dei target anche a basse concentrazioni (ad esempio fino a 1  $\mu$ M di idrochinone) rispetto al nudo elettrodo che non dà risposta elettrica.<sup>56</sup> La risposta elettrochimica dell’unità ciclofano e dell’analita sono proporzionali al numero di strati di nanoparticelle associati all’elettrodo ITO<sup>57</sup>, che rivela la natura porosa della matrice. Quindi, controllando il numero di strati delle nanoparticelle può essere velocemente controllata la sensibilità del sensore. L’affinità del *binding* tra i macrocicli e gli analiti determina la preconcentrazione dei substrati e perciò la selettività dell’elettrodo. Per esempio,

l'elettrodo a multistrato ottenuto con nanoparticelle d'oro e ciclobis(paraquat-*p*-fenilene)ciclofano risponde all'idrochinone, mentre elettrodi costruiti con nanoparticelle e ciclofani più grandi, quali ciclobis(paraquat-*p*-bifenilene) rispondono solo al didrossimetil ferrocene.<sup>55</sup>

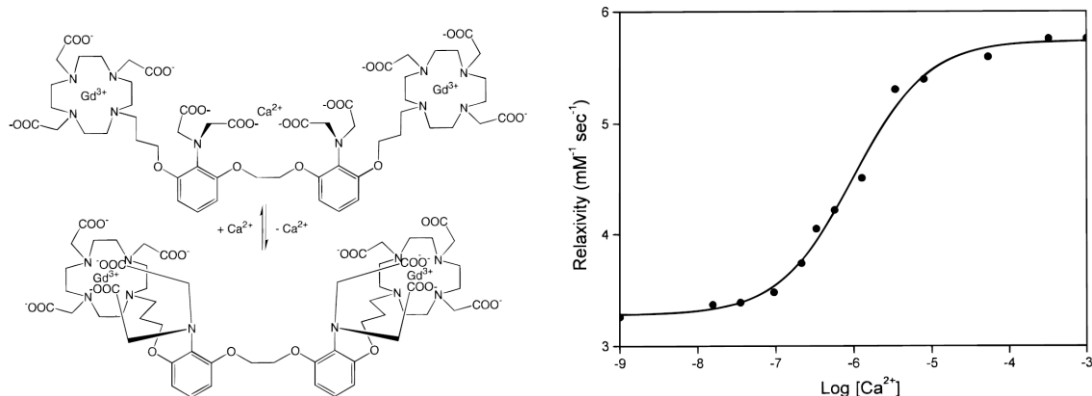
Anche se l'oro metallico in natura è chimicamente inerte, le nanoparticelle d'oro hanno ricevuto una considerevole attenzione per la loro straordinaria attività catalitica che deriva dall'elevata area superficiale rispetto al volume occupato e dalle loro proprietà all'interfaccia.<sup>58</sup> Metodi differenti, come l'interazione elettrostatica, il *linkage* covalente e la deposizione elettrochimica sono state applicate per depositare nanoparticelle d'oro sulla superficie di un elettrodo per applicazioni elettrocatalitiche. L'interfaccia delle nanoparticelle modificata elettrochimicamente è stata ampiamente usata da molti gruppi per identificare promettenti sensori elettrochimici. Ad esempio, le nanoparticelle possono essere considerate un materiale migliorato nell'investigazione elettrochimica delle cellule, occupandosi del rilevamento di piccole molecole quali glucosio, dopamina, acidi urici e ascorbico e epinefrina.<sup>59-63</sup> Wang e collaboratori<sup>64</sup> hanno trovato un sensore elettrocatalitico per l'epinefrina, utilizzando un nuovo elettrodo d'oro modificato con un sistema auto-assemblante di ditiotreitolo (DTT)-dodeciltiolo (DDT)-Au colloidale. La reazione all'elettrodo dell'epinefrina è significativamente migliorata sull'elettrodo nano-Au, perché provoca un elevato incremento nella corrente di picco della voltammetria portando il limite di rilevamento a 60 nm.

#### **1.1.4 Sensori basati sul rilassamento**

I sensori che misurano il tempo di rilassamento, ad esempio di molecole d'acqua, sono utilizzati in tecniche quali il MRI, *Imaging* a Risonanza Magnetica. Questa è una tecnica di generazione di immagini usata prevalentemente a scopi diagnostici per la visualizzazione in vivo di strutture e del loro funzionamento nel corpo umano o animale.

La tecnica si basa su segnali NMR provenienti prevalentemente dagli atomi di idrogeno delle molecole d'acqua presenti nei tessuti; l'intensità di tali segnali è dovuta alla velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua allineati per il forte campo magnetico.

La velocità di rilassamento dei protoni può essere aumentata usando un agente di contrasto, che tipicamente è costituito da uno ione paramagnetico quale il Gd(III). Con questa tecnica è possibile rilevare il *binding* di cationi metallici, perché generano un'alterazione nel tempo di rilassamento per interazione con lo ione gadolinio. Un esempio è l'agente di contrasto sviluppato per rispondere al calcio riportato in figura 1.16.<sup>7</sup>



**Figura 1.16:** a) Struttura del sensore DOPTA-Gd e cambio di conformazione proposto in presenza e assenza di Ca<sup>2+</sup>; b) Misure di rilassamento in funzione di [Ca<sup>2+</sup>] libero; costante di dissociazione = 0.96 μM.

In assenza di ioni Ca<sup>2+</sup> gli imminoacetati aromatici del DOPTA interagiscono con gli ioni Gd<sup>3+</sup> per attrazione elettrostatica; in presenza di calcio gli imminoacetati aromatici si riarrangiano per formare un legame con lo ione calcio stesso, permettendo alle molecole d'acqua di avere libero accesso agli ioni gadolinio. Gli studi effettuati hanno dimostrato un incremento del rilassamento corrispondente a circa l'80% per ogni ione Gd<sup>3+</sup>.<sup>65,66</sup>

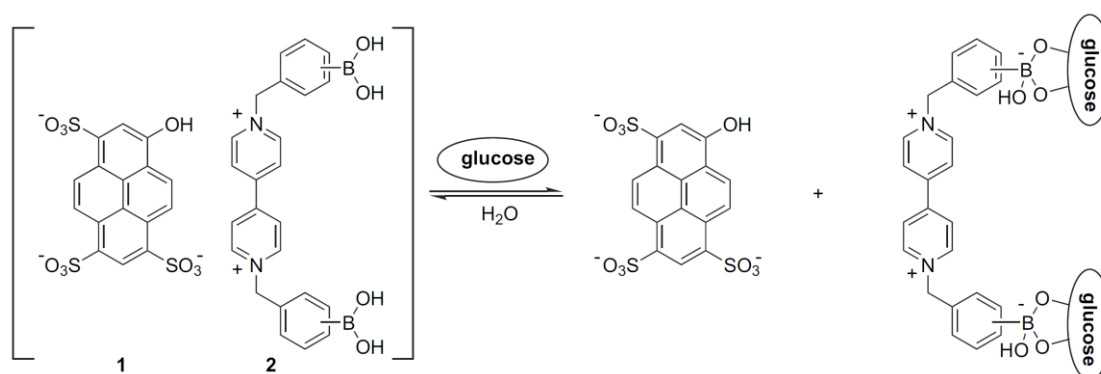
### 1.1.5 Sensori basati sull'NMR

Tutte queste tecniche presentano nel complesso un solo, ma piuttosto importante svantaggio, che è l'incapacità di identificare univocamente l'analita. Infatti, non si può affermare con totale certezza che la risposta visualizzata derivi dall'analita di interesse, poiché potrebbe anche provenire da un interferente in grado anch'esso di interagire con il chemosensore.

Il segnale prodotto, infatti, deriva da una proprietà intrinseca del chemosensore modificata da un'interazione, ma non fornisce nessuna informazione diretta che permetta di identificare in maniera univoca l'analita.

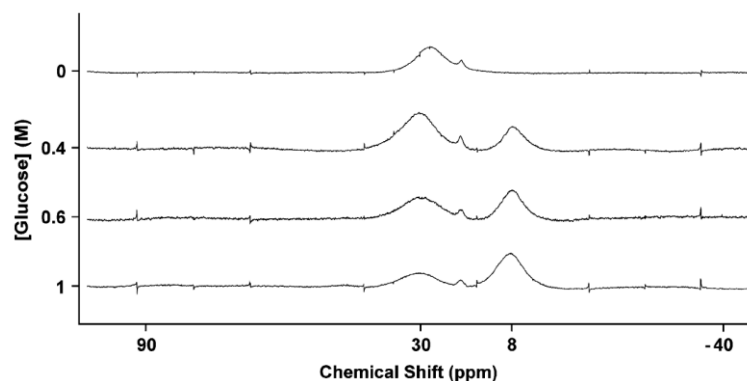
Questa osservazione ha portato recentemente allo sviluppo di chemosensori che utilizzano la spettroscopia NMR per rilevare gli analiti.

I primi esperimenti volti a determinare l'accoppiamento spin-spin tra due atomi di boro risalgono al 1971.<sup>67</sup> Da allora molto è stato il cammino effettuato e nel 2006 Wessling e Singaram hanno proposto un chemosensore basato su acido boronico in grado di rilevare il glucosio mediante spettroscopia  $^{11}\text{B}$  NMR. Il sensore è composto da due componenti entrambe in grado di effettuare *sensing*: una parte, composta da una piranina, che risponde generando un segnale di fluorescenza e una parte, composta da due molecole di acido boronico collegate attraverso una molecola di viologeno carico positivamente, che generano un segnale  $^{11}\text{B}$  NMR (Fig. 1.17).



**Figura 1.17:** Meccanismo proposto per il rilevamento del glucosio: il glucosio induce la dissociazione del complesso che porta ad un incremento della fluorescenza.

In seguito all'aggiunta di glucosio alla soluzione del sensore, si ha la formazione di un estere glucoboronicco; questo provoca un aumento dell'acidità di Lewis del boro, che facilita la formazione del complesso. Il cambiamento di ibridizzazione della molecola del boro da  $sp^2$  a  $sp^3$  è ciò che viene rilevato all'NMR (Fig. 1.18).

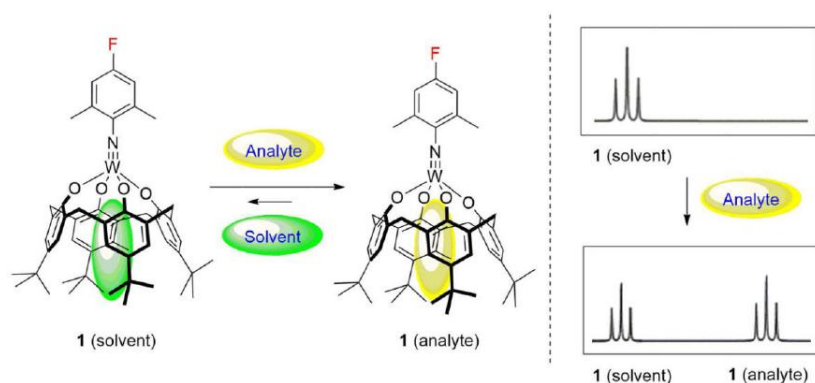


**Figura 1.18:** Cambiamento nello spettro  $^{11}\text{B}$  NMR del complesso con l'acido boronico in posizione meta (30 mM a pH 7,4 in tampone fosfato) all'aumentare della concentrazione di glucosio.

Il segnale rilevato a  $\sim 30$  ppm indica la presenza di boro trigonale mentre il nuovo segnale che si vede comparire a  $\sim 8$  ppm deriva dal tetraedrico estere gluco-boronato.<sup>68</sup>

Nel 2013, il gruppo di T. Swager ha utilizzato un derivato fluorurato di un recettore tungsteno-immido calix[4]arene, per la rilevazione di molecole organiche neutre mediante spettroscopia  $^{19}\text{F}$  NMR. Il riconoscimento di specifiche molecole organiche neutre al centro metallico di tungsteno induce uno *shift* a campi alti del segnale dell'atomo di fluoro legato al gruppo arilimmido. L'ipotesi è che la complessazione di una base organica di Lewis porti ad un incremento della densità elettronica sull'atomo di tungsteno, quindi, ad un cambiamento del *chemical shift* dell'atomo di fluoro che è collegato ad esso per coniugazione  $\pi$ . L'entità dello spostamento del segnale del fluoro è quindi collegata alla struttura chimica dell'analita. In questo modo, ogni analita provoca uno spostamento diverso che ne permette l'identificazione.

La scelta sull'utilizzo della spettroscopia  $^{19}\text{F}$  NMR è basilare per il successo di questo metodo perché, l'intervallo di *chemical shift* è estremamente ampio ( $> 300$  ppm) e questo permette, quindi, di poter ottenere un cambiamento osservabile anche con una piccola differenza di struttura elettronica. Inoltre, la combinazione di un complesso con azione riconoscitiva altamente specifico con il fatto che in natura non esistono composti organici fluorurati, impedisce la comparsa di segnali dovuti a degli interferenti (Fig. 1.19).<sup>69</sup>



**Figura 1.19:** Illustrazione generale del metodo per rilevare molecole organiche con l'utilizzo della spettroscopia  $^{19}\text{F}$  NMR.

La qualità del metodo è stata valutata selezionando una specifica classe di molecole di cui si è proceduto all'identificazione, quella dei nitrili, perché sono presenti in molti farmaci e pesticidi.

Negli sviluppi successivi è stata creata una libreria di recettori, fluorurati in posizioni differenti, che permettesse la successiva identificazione di nitrili con piccole differenze strutturali.<sup>70</sup>

Lo sviluppo di questa tecnica si è spinto fino al problema centrale, che resta sempre l'identificazione univoca dell'analita. Anche in questo caso però il segnale misurato proviene dal sensore ed è dovuto alla sua interazione con l'analita. Rimane sempre, quindi, la possibilità, seppur remota, negli sviluppi più sofisticati dell'osservazione di falsi positivi dovuta ad interferenti sconosciuti.

## 2. Risultati & Discussione

---

### ***2.1 NMR Chemosensing: NOE-PUMPING***

Come anticipato nell'introduzione, un problema ancora irrisolto nell'ambito dei sensori molecolari è quello di identificare in maniera univoca le molecole rilevate dal sensore in una miscela complessa.

La continua investigazione, condotta in questi anni, sulla struttura e proprietà del monostrato che ricopre le nanoparticelle mediante l'utilizzo della spettroscopia NMR, ci ha permesso di individuare un nuovo protocollo per l'identificazione e la quantificazione di miscele complesse. Infatti, studi precedenti condotti nel laboratorio dove è stato svolto questo progetto e riportati in letteratura hanno messo in evidenza come le nanoparticelle ricoperte da un monostrato di molecole organiche siano in grado di agire come recettori supramolecolari.

Diversi esperimenti NMR possono essere utilizzati per investigare le interazioni tra macromolecole, come le proteine, e piccole molecole. Nel gruppo di ricerca in cui è



stato svolto questo lavoro di tesi si è ipotizzato che tali esperimenti potessero essere utilizzati anche per rivelare la presenza di piccole molecole in miscele complesse analizzando la loro interazione con nanoparticelle opportunamente funzionalizzate.

Il primo esperimento utilizzato è stata la tecnica *NOE-pumping* (Fig. 2.1), che utilizza l'effetto nucleare *Overhauser* di diffusione assistita. Il concetto è quello di riuscire a identificare le piccole molecole interagenti da tutte le molecole che non si legano alla nanoparticella attraverso il trasferimento della magnetizzazione da questa agli analiti.<sup>71</sup>

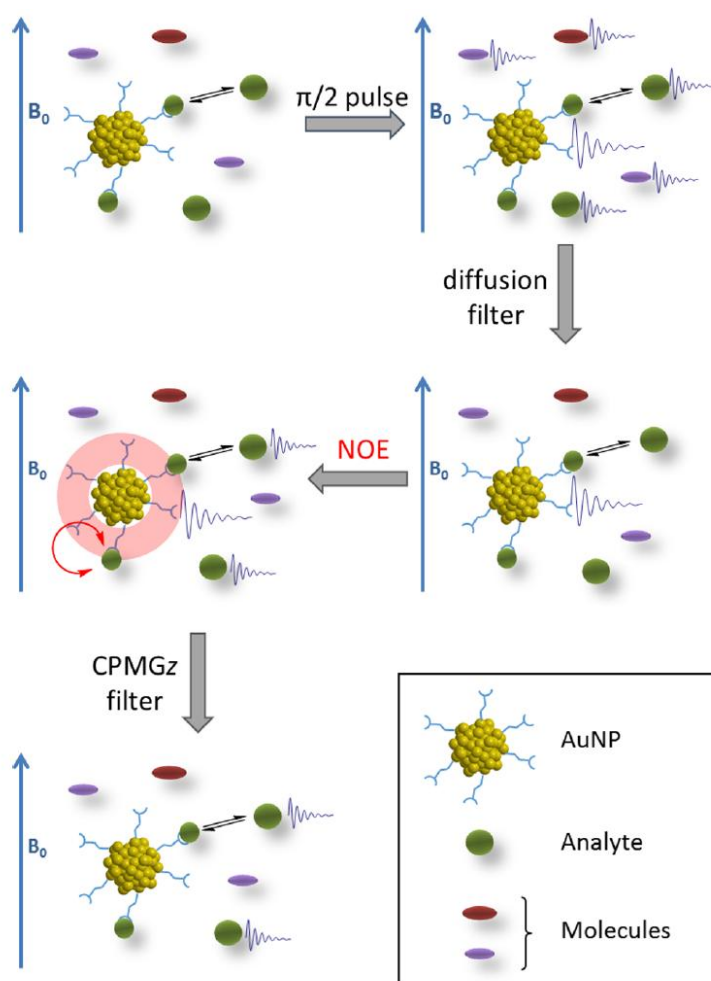
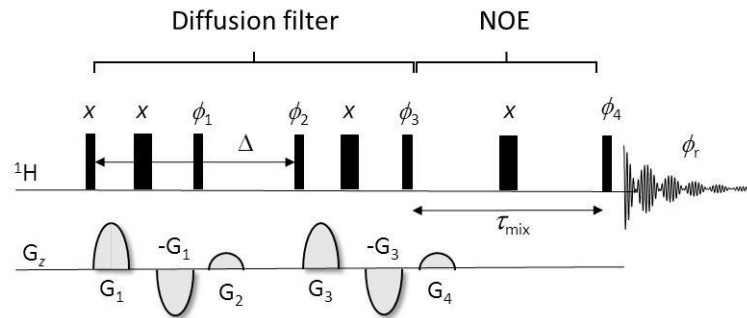


Figura 2.1: Schema riguardante l'esperimento di "NMR chemosensing".<sup>72</sup>

L'esperimento è suddiviso in due parti: la prima è composta da un filtro di diffusione in cui tutte le coerenze delle piccole molecole, ma non delle macromolecole, vengono eliminate causando, di fatto, una cancellazione dei segnali delle molecole per la loro veloce diffusione; la seconda parte è composta da un esperimento NOE (Fig. 2.2).



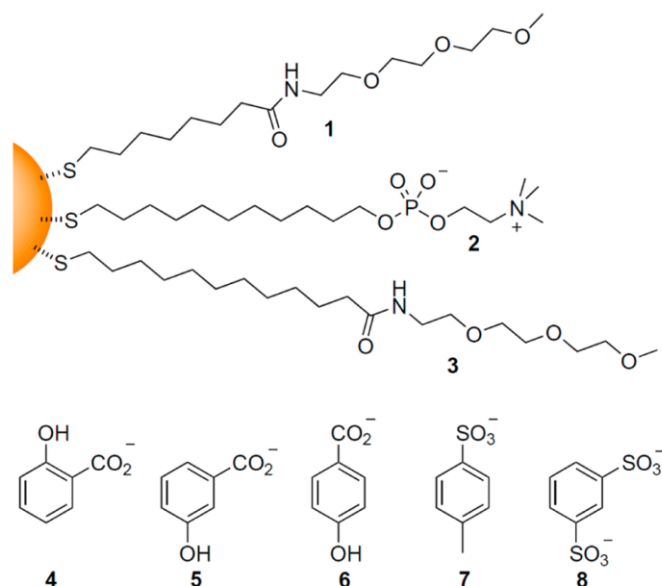
**Figura 2.2:** Sequenza di impulsi dell'esperimento NOE-pump.

Alla conclusione dell'esperimento NOE i segnali rilevati derivano dal trasferimento di polarizzazione dalle macromolecole, sopravvissuta al filtro di diffusione, alle specie che interagiscono con esse. Le macromolecole, nel caso specifico le nanoparticelle d'oro, servono, quindi, a immagazzinare la polarizzazione e a trasferirla selettivamente ai soli analiti "riconosciuti" dalle nanoparticelle stesse.

Va notato che in questo caso, i segnali prodotti non derivano dal chemosensore (la nanoparticella) bensì dallo stesso analita che, quindi, dimostra la sua univoca natura come in un normale spettro protonico NMR, permettendo non solo l'individuazione di un target, ma anche la sua identificazione.<sup>73</sup>

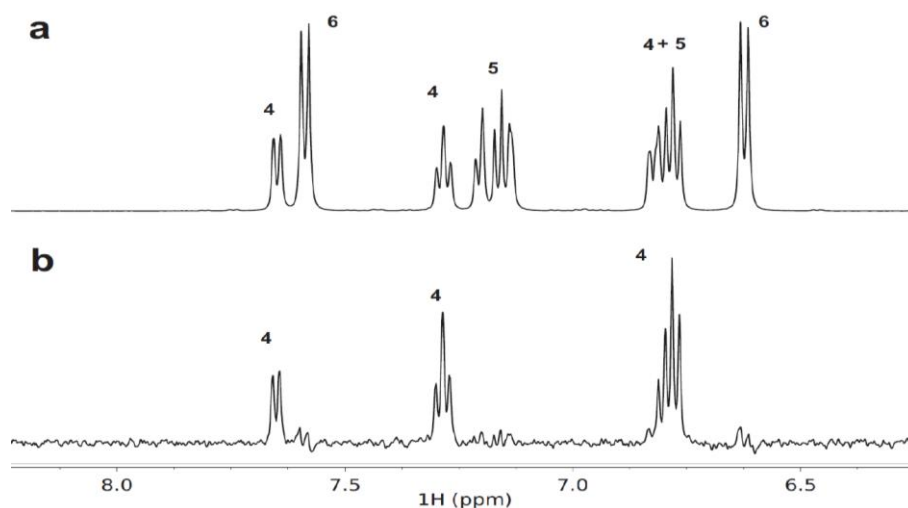
Le nanoparticelle possono, quindi, agire come recettori supramolecolari autorganizzati legando più o meno selettivamente determinati analiti.

### 2.1.1 NMR Sensing: AuNp 1 TEG-Amide



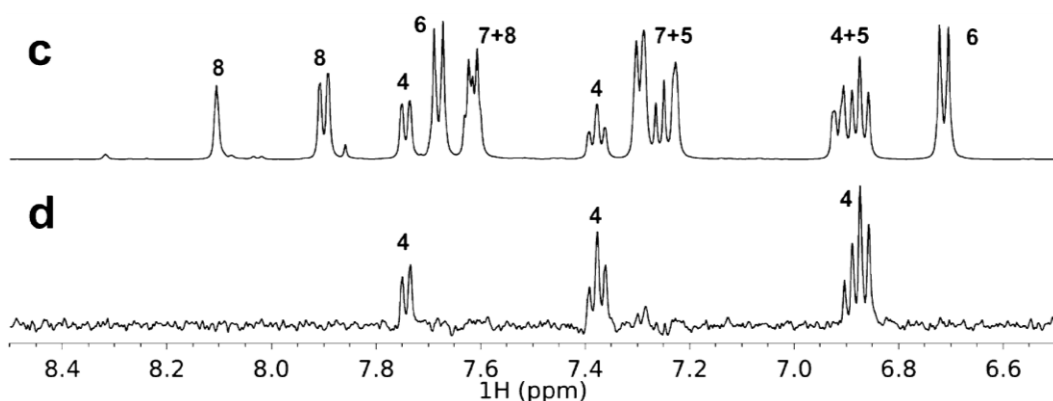
**Figura 2.3:** Rappresentazione dei tioli che passivano le nanoparticelle e degli analiti.

Per testare la tecnica è stata selezionata come primo campione una miscela composta dai tre isomeri salicilato (**4**), 3-idrossibenzoato (**5**), e 4-idrossibenzoato (**6**), che differiscono solo per la posizione relativa dei due gruppi funzionali. Un esperimento *NOE-pumping* è stato condotto su una soluzione acquosa contenente le tre molecole e nanoparticelle ricoperte dal tiolo TEG-Amide, **1** in figura 2.3. Come si può vedere in figura 2.4a, l'identificazione dei componenti dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$ , anche per una miscela così semplice, non è facile. Al contrario l'esperimento *NOE-pumping* (Fig. 2.4 b) rivela la presenza solamente dei segnali del salicilato (**4**) consentendone l'identificazione e indicando l'interazione preferenziale/esclusiva di questo con le nanoparticelle.



**Figura 2.4:** a) Spettro <sup>1</sup>H-NMR della miscela di molecole **4-6**, 7 mM in D<sub>2</sub>O, tampone carbonato 100 mM, pD 10. b) Spettro NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle d'oro passivate dal tiolo **1** TEG-Amide, 70 μM.

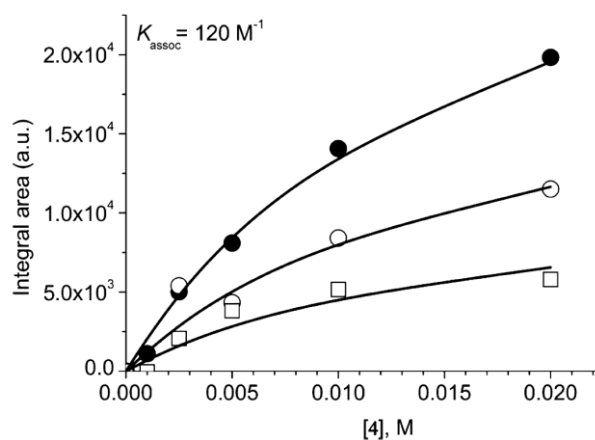
La selettività individuata utilizzando questo protocollo è piuttosto sorprendente e persiste anche quando vengono aggiunti altri composti al campione (**7-8**). Di nuovo, solo i segnali del salicilato (**4**) appaiono nell'esperimento NOE-*pump* (Fig. 2.5 d), con una sostanziale semplificazione dello spettro della miscela (Fig. 2.5 c) e una chiara rilevazione del salicilato (**4**) nel campione.



**Figura 2.5:** c) Spettro <sup>1</sup>H-NMR della miscela di molecole **4-8**, (7 mM in D<sub>2</sub>O, tampone carbonato 100 mM, pD 10.); d) Spettro NOE-*pump* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle d'oro passivate dal tiolo **1** TEG-Amide, 70 μM.

È importante notare che, accanto al rilevamento selettivo, il metodo riportato permette anche la determinazione quantitativa dell'analita. In una serie di esperimenti eseguiti a differenti concentrazioni di salicilato (Fig. 2.6), gli integrali dei segnali

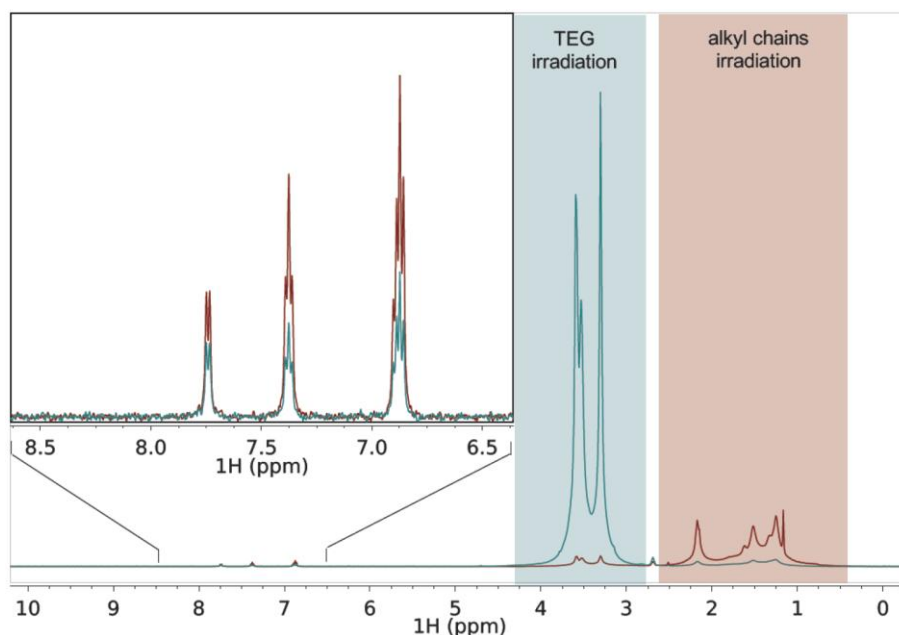
dell'analita decrescono in accordo con un profilo di saturazione, come atteso per un processo di *binding*.



**Figura 2.6:** Aree relative dei segnali NMR di **4** salicilato (● = 6.8 ppm; ○ = 7.4 ppm; □ = 7.75 ppm) nell'esperimento NOE-*pumping* in funzione della concentrazione dell'analita stesso. La linea rappresenta il miglior *fitting* ottenuto. Condizioni: [AuNp **1** TEG-Ammide] = 70 μM, in tampone carbonato 100 mM, pD 10).

Il *fitting* dei dati delle intensità relative con un modello di *binding* 1:1 ha condotto ad una costante di associazione apparente ( $K_{\text{assoc}}$ ) di  $120 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ , valore risultato compatibile con quello proposto da Pasquato e Lucarini<sup>74,75</sup> per l'associazione di un radicale organico a nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Ammide di diametro simile. Inoltre, la medesima interpolazione conferma che la quantificazione dell'analita, in seguito alla costruzione di una curva di calibrazione, è possibile con il metodo proposto. Infatti, ricalcolando la concentrazione di salicilato nell'esperimento indipendente di figura 2.5 d, utilizzando i parametri ottenuti dal *fitting*, si ottiene un valore di  $6.8 \pm 0.4 \text{ mM}$ , che è estremamente vicino al valore analitico di 7.0 mM. Alle condizioni sperimentali utilizzate (4 h di acquisizione e alla concentrazione di nanoparticelle di 70 μM) nell'esperimento riportato in figura 2.6, è possibile stabilire un limite di rilevabilità pari a 2.5 mM per il sodio salicilato (**4**).

L'effettiva interazione del salicilato con le nanoparticelle è stata confermata effettuando esperimenti di NOE selettivo (Fig. 2.7).

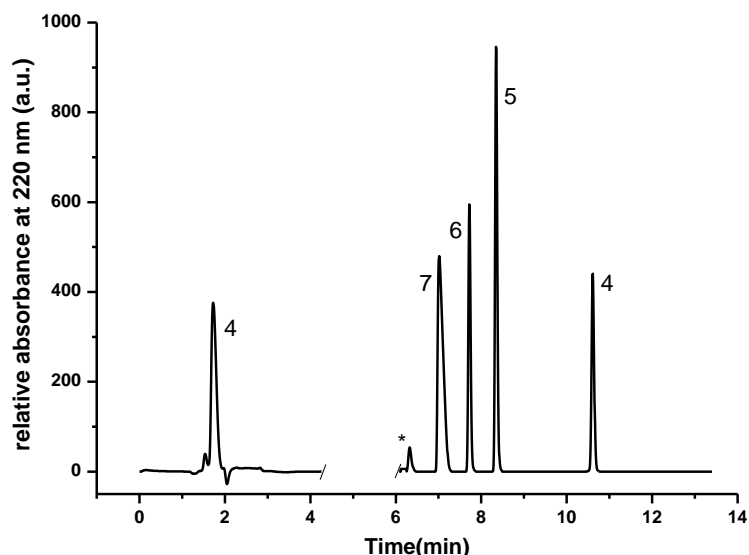


**Figura 2.7:** Esperimenti di NOE selettivo di una miscela di salicilato **4** (7 mM in D<sub>2</sub>O) e AuNp **1** TEG-Amide (70 μM). Le intensità dei segnali NOE sono maggiori quando l'irradiazione selettiva colpisce i segnali della nanoparticella nella regione alchilica (1-2.2 ppm, regione rossa) rispetto a quanto non avvenga se viene irradiata la regione della catena TEG, questo indica che il salicilato interagisce più fortemente con la parte alchilica del monostrato.

In seguito all'inversione selettiva della risonanza delle nanoparticelle, si osserva che i segnali derivanti dal salicilato subiscono chiaramente effetto NOE, confermando la diretta interazione tra nanoparticelle e analita. L'intensità dell'effetto NOE sembrerebbe essere maggiore quando sono i segnali della parte alchilica del tiolo TEG-Amide ad essere invertiti. Questa osservazione porta, quindi, a suggerire che il salicilato sia localizzato all'interno, nella parte idrofobica del monostrato.

La marcata selettività ottenuta con nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Amide potrebbe derivare dalla diversa idrofobicità dei cinque componenti analizzati. Infatti, il monostrato che ricopre le nanoparticelle forma una pseudofase idrofobica, nella regione delle catene alchiliche, simile per molti versi al nucleo idrofobico di una micella. I diversi composti potrebbero, quindi, ripartirsi in questa pseudofase proporzionalmente alla loro preferenza per un ambiente polare o non-polare.

Infatti, analizzando la miscela all'HPLC utilizzando una colonna a fase inversa composta da C<sub>18</sub>, si trova che l'ordine dei tempi di eluizione è: **8**<<**7**<**6**<**5**<<**4** (Fig. 2.8).

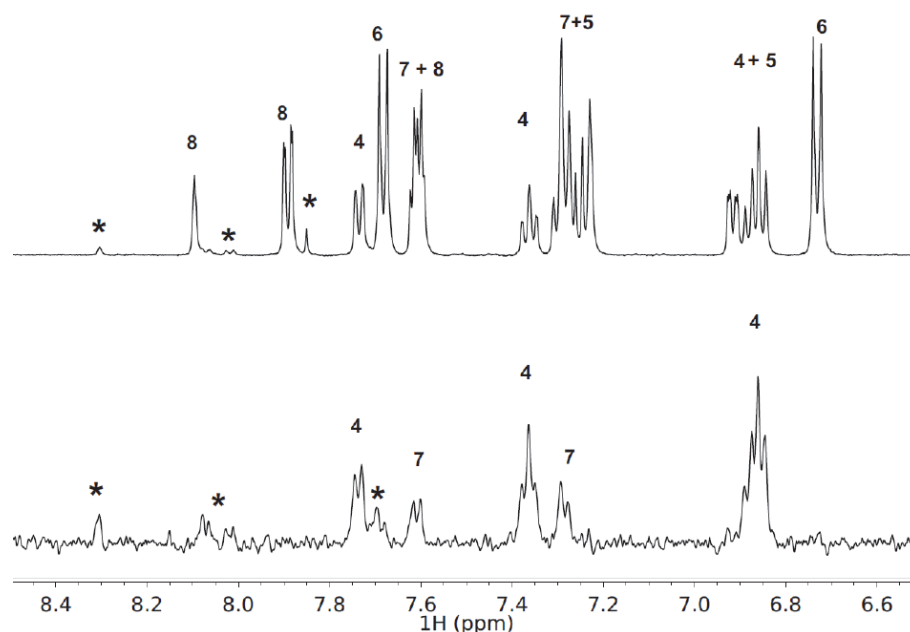


**Figura 2.8:** Esperimento HPLC con colonna a fase inversa,  $C_{18}$ , della miscela di composti **4-8** (eluente: H<sub>2</sub>O/ACN, 2% ACN per 4 minuti, poi gradiente fino ad arrivare al 62% ACN in 10 minuti, flusso 0.2 mL/min). L'asterisco indica un picco corrispondente ad un'impurità presente nel composto **8**.

Questi dati indicano che il monostrato composto dal tiolo **1** TEG-Amide agisce da recettore selettivo per molecole idrofobiche che all'RP-HPLC hanno una soglia di tempi di ritenzione di 9-10 minuti alle condizioni sperimentali adottate.

### 2.1.2 NMR Sensing: AuNp 2 Fosforilcolina

Ad ogni modo, anche altri parametri potrebbero influenzare il processo di riconoscimento. Uno dei principali vantaggi dell'uso delle nanoparticelle come recettori, è la facilità con cui possono essere modificate. E' stato possibile, quindi, ripetere gli esperimenti di *sensing* utilizzando nanoparticelle ricoperte con diverse molecole per valutare la loro selettività. In effetti, nanoparticelle ricoperte con il tiolo **2** Fosforilcolina (Fig. 2.3) hanno condotto a risultati diversi. Infatti, l'analisi della miscela composta da **4**, **7** e **8** mediante esperimento NOE-*pumping* ha mostrato che in questo caso tutte e tre le molecole vengono rilevate con notevole sensibilità, e che addirittura un'impurezza presente nell'analita **8** viene rilevata (Fig. 2.9 b).



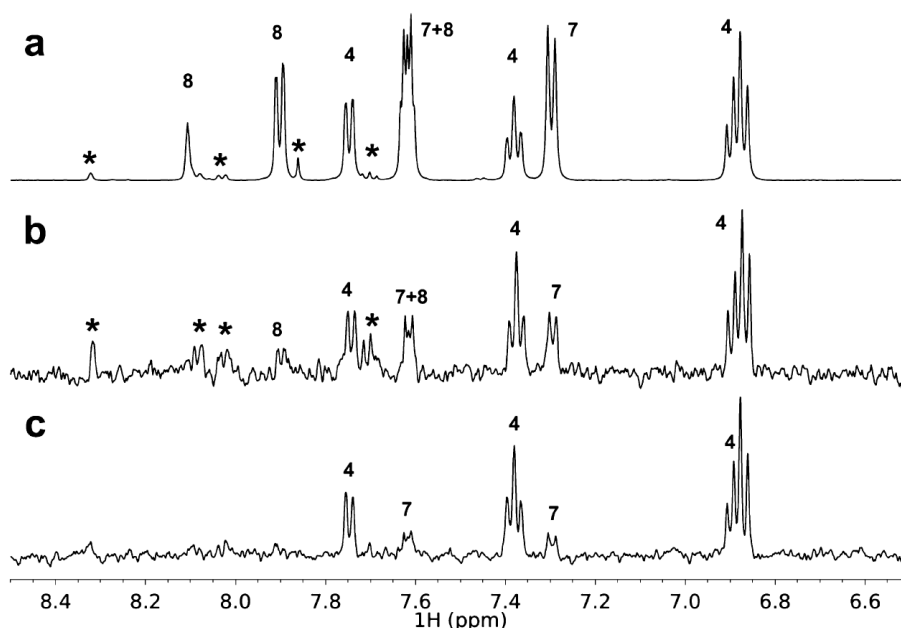
**Figura 2.9:** a) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della miscela di molecole **4-8** (7 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ , tampone carbonato 100 mM, pD 10); b) Esperimento *NOE-pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **2** Fosforilcolina (70  $\mu\text{M}$ ), a differenza del tiolo **1** TEG-Amide, il tiolo **2** Fosforilcolina, rileva anche gli analiti **4** e **7** e l'impurità contenente nell'analita **8**, ma non riesce a rilevare i composti **5** e **6**.

Il cambiamento nelle caratteristiche del monostrato, in questo caso, ha portato ad un ampliamento dell'affinità nei confronti di molecole differenti. Tale comportamento potrebbe essere dovuto a due fattori: le maggiori dimensioni della porzione idrofobica (il tiolo **2** dispone di una catena alchilica di 11 atomi di carbonio contro i 7 del tiolo **1**), le diverse caratteristiche chimiche della parte polare (fosforilcolina contro oligoetilenglicole-amide).

### 2.1.3 NMR Sensing: AuNp **3** TEG-AmideLong

Al fine di riuscire ad identificare quali caratteristiche del tiolo **2** Fosforilcolina che ricopre le nanoparticelle d'oro, sono responsabili del cambiamento di affinità, si è sintetizzato un nuovo tiolo composto da una catena di 11 atomi di carbonio, come il tiolo **2** Fosforilcolina, e con una porzione polare composta da una catena oligoetilenglicole-amide, come il tiolo **1** TEG-Amide. L'esperimento *NOE-pumping* effettuato con questo nuovo substrato **3** TEG-AmideLong (Fig. 2.10 c), ha mostrato un'affinità intermedia rispetto ai due monostrati precedentemente studiati, indicando che sia la lunghezza della regione idrofobica del monostrato che compone le

nanoparticelle, sia la funzionalità del gruppo di testa, possono provocare una modificazione nell'affinità del *binding*.



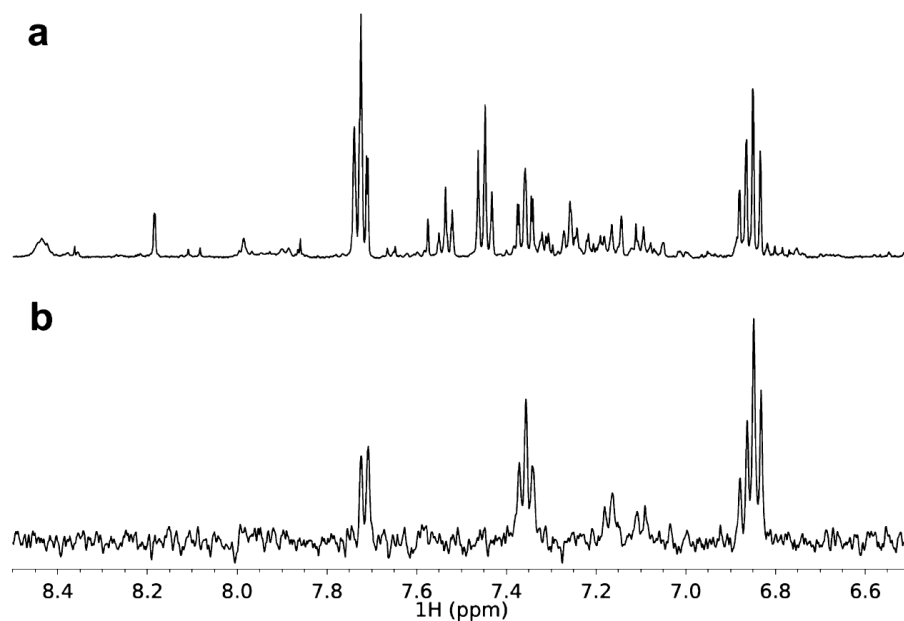
**Figura 2.10:** a) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della miscela di molecole **4**, **7** e **8** (7 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ ); b) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **2** Fosforilcolina (70  $\mu\text{M}$ ); c) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **3** TEG-AmideLong (70  $\mu\text{M}$ ), l'asterisco indica i segnali imputabili all'impurezza presente nel composto **8**.

L'idrofobicità non sembra, quindi, essere la sola fonte del riconoscimento. Infatti, sebbene gli idrossibenzoati **5** e **6** siano più idrofobici del *p*-toluensolfonato (**7**), non si associano con le nanoparticelle e, quindi, non vengono rilevati i loro segnali nello spettro NOE-*pump* relativo (Fig. 2.9 c). Questa osservazione suggerisce che per ottenere l'inclusione degli analiti nel monostrato, sia preferibile una struttura anfifilica con due regioni distinte, una idrofobica e una idrofilica. Tale struttura è posseduta da **7**, seppur più idrofilico, ma non da **5** e **6**.

#### 2.1.4 NMR Sensing: Test su campioni di urina

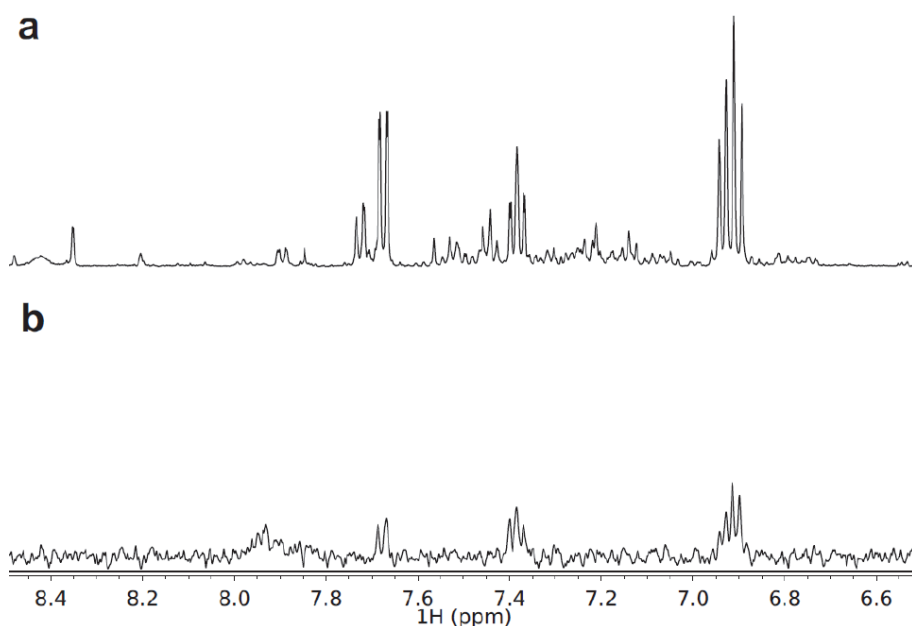
Identificate in questo modo le caratteristiche dell'esperimento NOE-*pumping* assistito da nanoparticelle, si è passati a verificare la possibilità di utilizzo in campioni reali. Ad esempio, è stato utilizzato su un campione di urina al fine di identificare dei metaboliti farmacologici. La metabolomica basata su studi NMR è un'area di grande interesse che

può sostanzialmente utilizzare qualsiasi protocollo che possa espandere la quantità di informazioni raggiungibile.<sup>76</sup> In questo esperimento, alle nanoparticelle **1** TEG-Amide è stato aggiunto un campione di urina contenente sodio salicilato 5 mM, una concentrazione simile a quella trovata nelle urine dopo la somministrazione di una dose media di acido acetilsalicilico.<sup>77</sup> Riuscire a rilevare il sodio salicilato nello spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione di urina (Fig. 2.11 a) non è affatto semplice, in quanto i suoi segnali sono mescolati con molti altri che hanno anche simile intensità e *chemical shift* nella zona aromatica.



**Figura 2.11:** a) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione di urina umana contenente 5 mM di sodio salicilato; b) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Amide (70  $\mu\text{M}$ ).

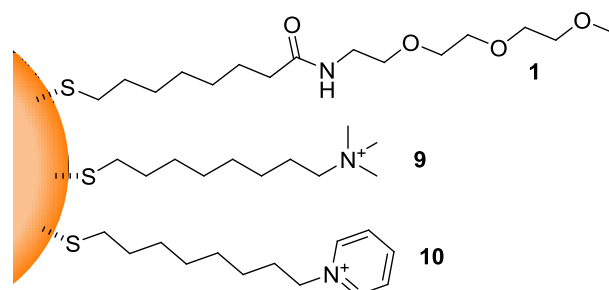
Una volta effettuato l'esperimento NOE-*pumping*, si ha cancellazione dell'intera matrice di segnali, eccetto quelli corrispondenti al salicilato (Fig. 2.11 b) permettendo un chiaro e per nulla ambiguo rilevamento della molecola *target*. Un simile esperimento, riportato in figura 2.12, permette di identificare un altro metabolita dell'acido acetilsalicilico: l'acido salicilurico, che è escreto nelle urine in diverse condizioni fisiologiche.



**Figura 2.12:** a) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del campione di urina umana raccolto 12 h dopo la somministrazione orale di 1 g di Aspirina commerciale; b) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Amide (70  $\mu\text{M}$ ).

## 2.2 NMR Sensing: Incremento dell’Affinità

L'estrema facilità con cui si possono sintetizzare e modificare i monostrati delle nanoparticelle, consente un largo utilizzo della tecnica NMR nel campo del *sensing*. Spesso, pur possedendo i tioli una struttura molecolare piuttosto semplice (Fig. 2.13), l'effetto di cooperazione tra i gruppi funzionali può generare dei *pattern* di riconoscimento per molecole specifiche.<sup>78-80</sup> È, quindi, possibile disegnare, preparare e utilizzare nanoparticelle d'oro capaci di riconoscere e legare differenti substrati



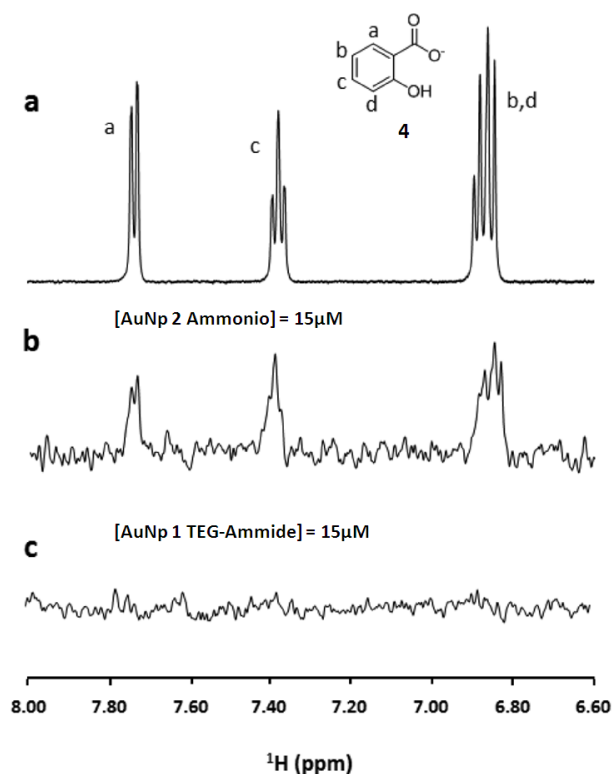
**Figura 2.13:** Rappresentazione dei tioli che passivano le nanoparticelle.

Gli esperimenti NMR nell'ambito del *sensing* sono caratterizzati da alta selettività, ma soffrono di una relativa bassa sensibilità. Infatti, come visto dagli esperimenti riportati finora, il limite di rilevamento (LOD) per il sodio salicilato (**4**) è risultato essere di 2.5 mM, utilizzando nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Ammide ad una concentrazione di 70  $\mu\text{M}$ . Questa bassa sensibilità deriva dalla moderata affinità dell'analita per il monostrato e, infatti, la costante apparente di associazione,  $K_{\text{assoc}}$ , misurata era di  $120 \text{ M}^{-1}$ , in ragione di un *binding* basato solo su interazioni idrofobiche. Quindi, quanto più forte sarà l'interazione tra gli analiti e il monostrato, tanto più alti saranno i segnali emergenti nello spettro NOE-*pump*; tutto questo si traduce con un aumento dell'affinità e con la riduzione del limite di rilevabilità.

Partendo da queste considerazioni, si è deciso di provare a incrementare l'affinità tra nanoparticelle e substrato aggiungendo un secondo grado di interazione a quella idrofobica. Infatti, osservando la molecola salicilato, si vede come questa sia composta anche da una parte polare con carica negativa. Si è, quindi, pensato di introdurre nel monostrato un elemento che permettesse il riconoscimento elettrostatico. Come si vede dalla figura 2.13, i tioli indicati come **9** Ammonio e **10** Piridinio, portano una carica positiva sul gruppo di testa. Utilizzando questi tioli sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro di circa 1.7 nm di diametro e sono stati eseguiti esperimenti di NOE-*pumping* per indagare il rilevamento di vari anioni.

### **2.2.1 NMR Sensing: AuNp 9 Ammonio**

I primi esperimenti effettuati con le nanoparticelle ricoperte dal tiolo **9** Ammonio, hanno, effettivamente, dimostrato un incremento nella rilevazione del salicilato (**4**) con relativo aumento nella sensibilità rispetto al tiolo **1** TEG-Ammide (Fig. 2.14).

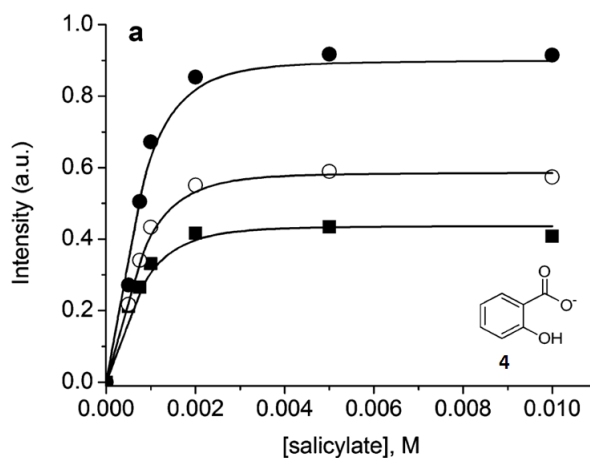


**Figura 2.14:** a) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di 1 mM di sodio salicilato **4** in  $\text{D}_2\text{O}$ ; b) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio (15  $\mu\text{M}$ , tampone carbonato 100 mM, pD 10, 28°C); c) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Amide (15  $\mu\text{M}$ , tampone carbonato 100 mM, pD 10, 28°C).

In questo caso, va sottolineato, che gli esperimenti NOE-*pumping* riportati in figura 2.14, sono stati eseguiti ad una concentrazione di nanoparticelle di 15  $\mu\text{M}$  rispetto alla concentrazione precedentemente utilizzata di 70  $\mu\text{M}$  per il tiolo **1** TEG-Amide, motivo per cui a queste concentrazioni i segnali del salicilato non sono più visibili nello spettro NOE-*pump* (Fig. 2.14 c). Nel caso delle particelle passivate con il tiolo **9** il segnale del salicilato (**4**) è invece chiaramente distinguibile. Il limite di rilevabilità (LOD) per il salicilato in presenza delle nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio, che per definizione è stabilito essere la concentrazione di analita che produce un'intensità di segnale maggiore di tre volte rispetto alla deviazione standard del rumore, è pari a 0.5 mM.

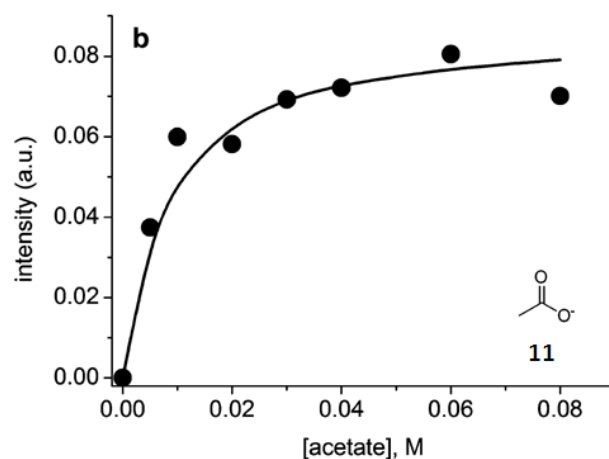
L'elevata affinità di queste nanoparticelle nei confronti del salicilato (**4**) è stata confermata da una titolazione: una serie di esperimenti NOE-*pumping* sono stati acquisiti mantenendo costante la concentrazione di nanoparticelle **9** Ammonio e variando quella del salicilato (**4**). I segnali relativi al salicilato sono, quindi, stati

integrati e posti in un grafico rappresentante l'intensità al variare della concentrazione del salicilato (**4**) stesso (Fig. 2.15).



**Figura 2.15:** Aree relative dei segnali NMR di **4** salicilato (● = 6.8 ppm; ○ = 7.4 ppm; ■ = 7.75 ppm) nell'esperimento NOE-pumping in funzione della concentrazione dell'analita stesso. La linea rappresenta il miglior fitting ottenuto. Condizioni: [AuNp **9** Ammonio] = 15  $\mu$ M, in tampone carbonato 20 mM, pD 10, T = 28°C).

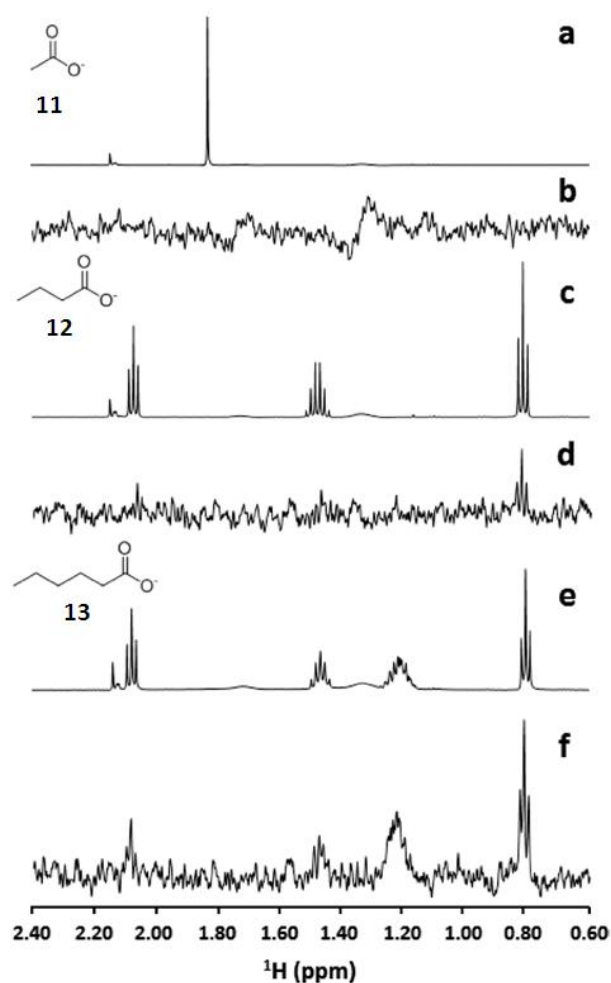
Dalla figura 2.15, si nota come a circa 2 mM di salicilato si raggiunga il *plateau*. Il *fitting* dei dati con un modello di *binding* 1:1 genera una costante di *binding* apparente ( $K_{\text{assoc}}$ ) di circa  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , valore che si colloca al di sopra del limite che può essere rilevato in maniera precisa con la tecnica NMR. Se questo valore di  $K_{\text{assoc}}$  di  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , per nanoparticelle **9** Ammonio, viene confrontato con quello ottenuto precedentemente di  $120 \text{ M}^{-1}$ , per nanoparticelle **1** TEG-Amide, dove l'interazione era prevalentemente idrofobica, si trova che l'aggiunta di un contributo in grado di formare delle coppie ioniche all'interazione contribuisce in circa ugual maniera ( $10^2_{\text{idrofobico}} \times 10^2_{\text{idrofilico}}$ ). Questa ipotesi è stata confermata effettuando un'altra titolazione, utilizzando acetato (**11**) come substrato (Fig. 2.16).



**Figura 2.16:** Aree relative dei segnali NMR di **11** acetato (● = 1.98 ppm) nell'esperimento NOE-*pumping* in funzione della concentrazione dell'analita stesso. La linea rappresenta il miglior *fitting* ottenuto. Condizioni: [AuNp **9** Ammonio] = 15  $\mu$ M, in tampone carbonato 20 mM, pD 10, T = 28°C).

In questo caso, il contributo idrofobico al *binding* può essere considerato trascurabile e il solo contributo che gioca un ruolo fondamentale risulta essere quello di accoppiamento degli ioni. In questo caso la costante di *binding* è di  $140 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ , confermando che i due tipi di interazione contribuiscono in pari misura.

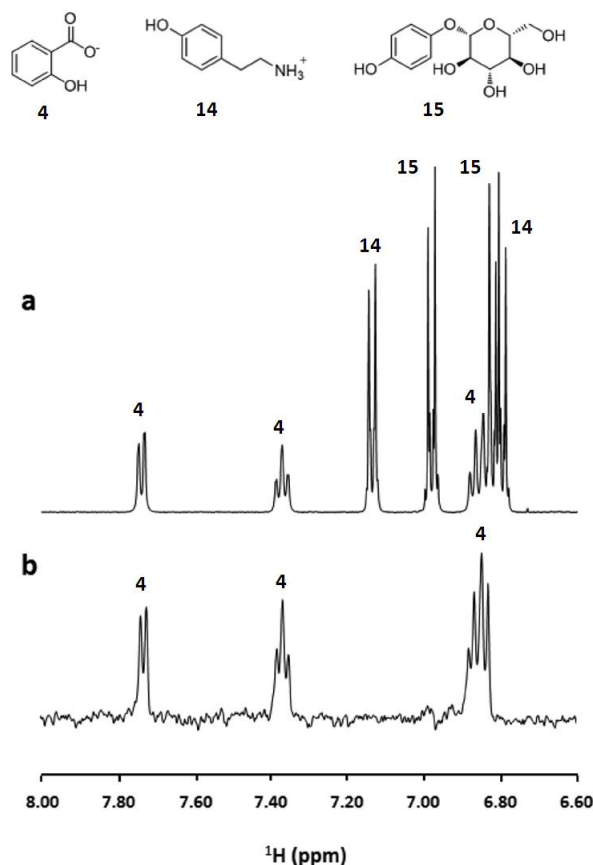
Al fine di comprendere quanto i due tipi di interazione, idrofobica e di coppia ionica, si combinino per garantire un aumento dell'affinità e, conseguentemente, un abbassamento del limite di rilevabilità, sono stati eseguiti esperimenti di *sensing* NMR ad una serie di acidi carbossilici che differiscono tra loro per la lunghezza della catena alchilica (Fig. 2.17). In questo caso, i segnali residui provenienti dalle nanoparticelle, solitamente presenti nello spettro NOE-*pump*, sono stati rimossi per sottrazione di uno spettro NOE-*pump* delle sole nanoparticelle. Come atteso, utilizzando una concentrazione di 15  $\mu$ M di nanoparticelle ricoperte dal tiolo **9** Ammonio e una concentrazione di 2 mM per i carbossilati, non è stato possibile individuare segnali nello spettro NOE-*pump* quando l'acetato (**11**) era l'analita (Fig. 2.17 a, b). Solo il segnale del tripletto del gruppo metile terminale (0.8 ppm) appare nello spettro riguardante il butirrato (**12**) (Fig. 2.17 c, d). Mentre, tutti i segnali relativi all'esanoato (**13**) sono chiaramente visibili (Fig. 2.17 e, f). Questo indica che, quando la concentrazione da rilevare è piuttosto bassa, il substrato deve possedere non solo la carica, ma anche una catena alchilica di almeno cinque atomi di carbonio al fine di garantire la rilevabilità.



**Figura 2.17:** a) Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del sodio acetato **11**; b) Esperimento NOE-*pumping* di sodio acetato **11** in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio; c) Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del sodio butanoato **12**; d) Esperimento NOE-*pumping* di sodio butanoato **12** in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio; e) Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del sodio esanoato **13**; f) Esperimento NOE-*pumping* di sodio esanoato **13** in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio;

Condizioni: [Carbossilati] = 2 mM; [AuNp **9** Ammonio] = 15  $\mu\text{M}$ , in tampone carbonato 20 mM, pD 10. I segnali delle nanoparticelle sono stati rimossi per sottrazione di uno spettro NOE-*pump* registrato in assenza di analiti.

Sulla base delle informazioni appena riscontrate, la selettività del sistema in esame è stata testata con una miscela composta da salicilato (**4**), tirammina (**14**) e arbutina (**15**). Tutte queste molecole possiedono una struttura anfifilica che include sia una parte polare che è una carica negativa per il salicilato (**4**), positiva per la tirammina (**14**) e neutra per l'arbutina (**15**), che una parte nonpolare aromatica (fenolo). La scelta di queste molecole assicura che l'interazione idrofobica sia possibile con la parte aromatica di tutti e tre i substrati, mentre l'interazione elettrostatica sia possibile solo per il salicilato (**4**) (Fig. 2.18).

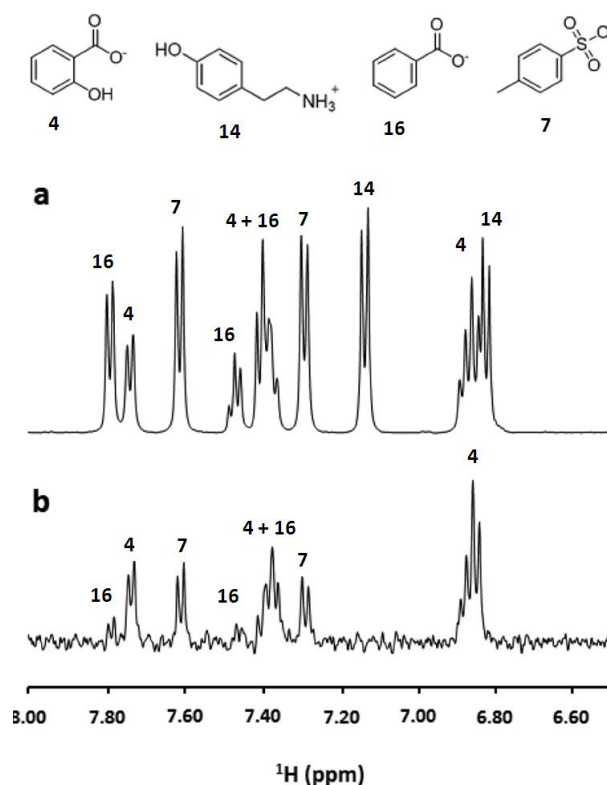


**Figura 2.18:** **a**) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del sodio salicilato **4**, tirammina **14** e arbutina **15** (2mM in  $\text{D}_2\text{O}$ ); **b**) Esperimento NOE-pumping dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio. Condizioni: [AuNp **9** Ammonio] = 15  $\mu\text{M}$ , in tampone HEPES 10 mM, pD 7.0.

Solo i segnali relativi al salicilato (**4**) sono identificabili in maniera univoca dallo spettro (Fig. 2.18 b), confermando che la coesistenza di entrambe le interazioni, idrofobica ed elettrostatica, è necessaria al riconoscimento. Inoltre, proprio dallo spettro relativo a questo esperimento, emergono i vantaggi e le potenzialità relative a questa tecnica. Ponendo lo sguardo nella zona 6.9-6.8 ppm, di figura 2.18 a, si vede chiaramente come sia difficile estrarre il segnale del salicilato (**4**), da uno spettro  $^1\text{H-NMR}$  standard, a causa della sovrapposizione con i segnali relativi alle altre molecole. In seguito alla registrazione dello spettro NOE-pump, invece, l'identificazione del salicilato diventa assolutamente non ambigua.

Un approfondimento ulteriore sul comportamento del sistema in esame è stato ottenuto testando il rilevamento di altri potenziali analiti aventi gruppi carichi negativamente. Come riportato in figura 2.19, quando una miscela di salicilato (**4**), benzoato (**16**), tosilato (**7**) e tirammina (**14** come controllo negativo) è analizzata

mediante *NOE-pumping*, tutti i segnali delle tre molecole negative sono presenti nello spettro (Fig. 2.19 b).



**Figura 2.19: a)** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del sodio salicilato **4**, sodio benzoato **16**, potassio tosilato **7** e tirammina **14** (2 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ );

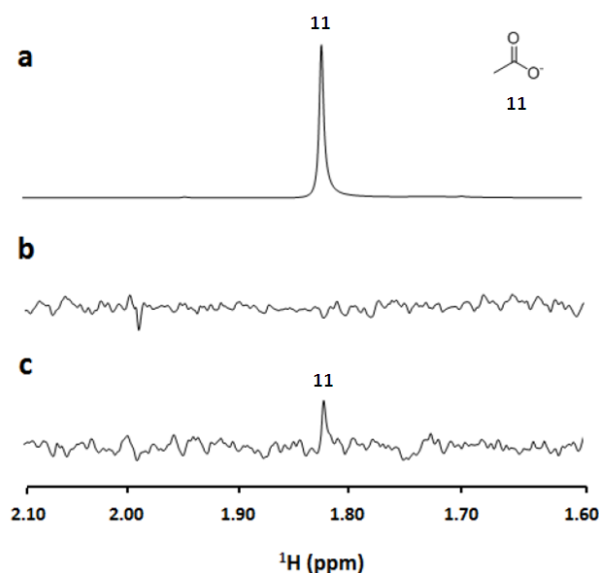
**b)** Esperimento *NOE-pumping* dello stesso campione in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio. Condizioni:  $[\text{AuNp } \mathbf{9} \text{ Ammonio}] = 15 \mu\text{M}$ , in tampone HEPES 10 mM, pD 7.0.

In linea con le nostre aspettative, le nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio sono capaci di rilevare, oltre al salicilato, altri anioni aromatici più idrofilici che non erano stati rilevati dalle nanoparticelle passivate dal tiolo **1** TEG-Amide. Le intensità dei segnali nello spettro (Fig. 2.19 b) sono, tuttavia, diversi per ciascuna analita seguendo approssimativamente l'ordine **4**>**7**>**16**. Questo *trend* suggerisce, perciò, una simile affinità di legame con il salicilato che si dimostra interagire più fortemente del tosilato (**7**) e del benzoato (**16**). All'interno di questa serie l'interazione per accoppiamento di carica può essere considerata simile per ciascun analita anionico e la modulazione in affinità è verosimilmente dovuta alla differente forza delle interazioni idrofobiche.

### 2.2.2 NMR Sensing: AuNp 10 Piridinio

La possibilità di modificare facilmente e ottimizzare le proprietà di *binding* del monostrato rappresenta un vantaggio fondamentale dell'utilizzo delle nanoparticelle che si comportano come strutture per auto-organizzare siti di legame molecolari. Perciò, abbiamo deciso di invertire l'approccio precedente e ricercare nanoparticelle in grado di rilevare carbossilati idrofili a basse concentrazioni come l'acetato. A questo fine, sono state testate le nanoparticelle funzionalizzate con il tiolo **10** Piridinio unitamente a quelle funzionalizzate con il tiolo **9** Ammonio, per la loro capacità di rilevare 10 mM di acetato di sodio in acqua.

L'esperimento di NOE-*pumping* effettuato con le nuove particelle **10** Piridinio, non rivela la presenza di acetato (Fig. 2.20 b).



**Figura 2.20:** a) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del sodio acetato **11** in  $\text{D}_2\text{O}$ ; b) Esperimento NOE-*pumping* di sodio acetato **11** in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **10** Piridinio; c) Esperimento NOE-*pumping* di sodio acetato **11** in presenza di nanoparticelle passivate dal tiolo **9** Ammonio; Condizioni: [Sodio Acetato **11**] = 10 mM; [AuNp] = 15  $\mu\text{M}$ .

Nel caso delle nanoparticelle funzionalizzate con il tiolo **9** Ammonio (Fig. 2.20 c) (già considerato in precedenza) emerge solo un debole segnale nello spettro, giusto sopra il limite di rilevabilità. Questo comportamento può derivare dalla delocalizzazione di carica positiva che avviene nel contesto dell'anello aromatico del piridinio che, quindi, non è in grado di instaurare un'interazione efficace.

Le particolari proprietà di riconoscimento emerse per le nanoparticelle monoprotette hanno prontamente suggerito il loro utilizzo in combinazione con altre tecniche analitiche basate sull'NMR.

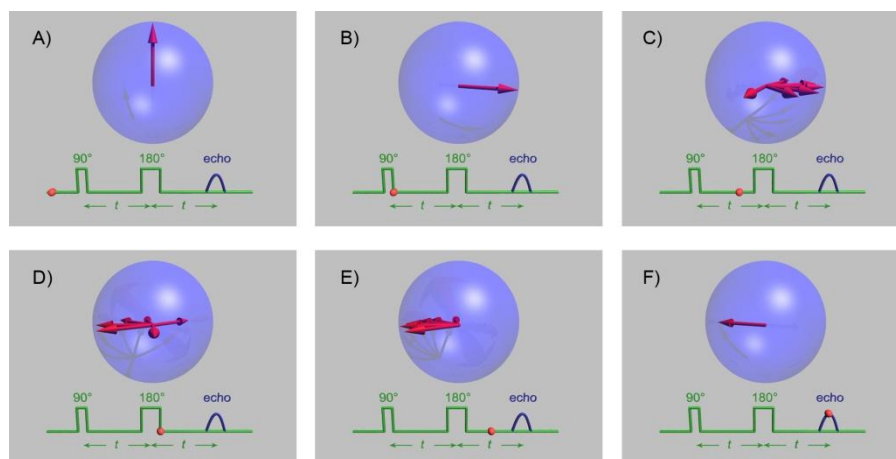
## 2.3 NMR Chemosensing: DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

Un altro protocollo NMR utilizzato per l'analisi di miscele è quello proposto originariamente da Caldarelli, l' "NMR cromatografico"; le interazioni con una fase stazionaria, gel di silice nei primi esempi, vengono utilizzate per perturbare i coefficienti di diffusione dei componenti del campione, che vengono poi misurati attraverso esperimenti DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*).<sup>81</sup>

L'esperimento DOSY permette di separare i segnali di diversi composti in soluzione sulla base dei loro diversi coefficienti di diffusione senza ricorrere alla separazione fisica.<sup>82</sup>

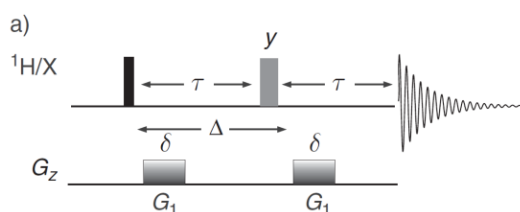
Per comprendere nello specifico l'esperimento DOSY e la sequenza che ne permette la misurazione è bene prendere le mosse dalla sequenza di *spin echo*. Questa sequenza è stata proposta per la prima volta da Hahn nel 1950 ed è mostrata nel dettaglio in figura 2.21. Inizialmente si applica un impulso a  $90^\circ$  che porta la magnetizzazione dall'asse  $z$  (Fig. 2.21 A) al piano  $xy$  (Fig. 2.21 B), a questo punto inizia la precessione dei segnali che varia per ogni spin poiché dipende dalle piccole variazioni di campo magnetico a cui ciascun spin è sottoposto (Fig. 2.21 C). La sequenza *spin echo* consente di annullare gli effetti della disomogeneità del campo percepito dai vari spin. Al tempo  $\tau$ , infatti, viene applicato un impulso a  $180^\circ$ , che mantiene la magnetizzazione sul piano  $xy$  ma ne inverte le posizioni relative (Fig. 2.21 D), poiché gli spin continuano a precedere con la loro direzione e frequenza (Fig. 2.21 E), dopo un tempo  $2\tau$  dall'inizio della sequenza tutti gli spin risultano perfettamente rifocalizzati (Fig. 2.21 F).<sup>83</sup>





**Figura 2.21:** Schema rappresentativo della sequenza di spin *echo*; seguendo il puntino rosso si può seguire cosa accade agli spin durante i vari impulsi.

La sequenza su cui si basa l'esperimento DOSY è nota con il nome di *PFG spin echo*, dove PFG sta per *Pulsed Field Gradient*. Durante la misura della velocità di diffusione, infatti, sono applicati due gradienti di campo magnetico uguali separati da un intervallo di tempo  $\Delta$ , detto tempo di diffusione (Fig. 2.22). L'utilizzo dei gradienti permetterà la rifocalizzazione completa del segnale solo quando lo spin si troverà nella stessa posizione fisica prima e dopo l'applicazione dei gradienti. Se una molecola presente nel campione diffonde durante il tempo  $\Delta$ , modificando la sua posizione, i suoi spin saranno solo parzialmente rifocalizzati, e i segnali relativi risulteranno attenuati in modo proporzionale alla velocità di diffusione.



**Figura 2.22:** Schema della sequenza di impulsi della *PFG spin echo*.

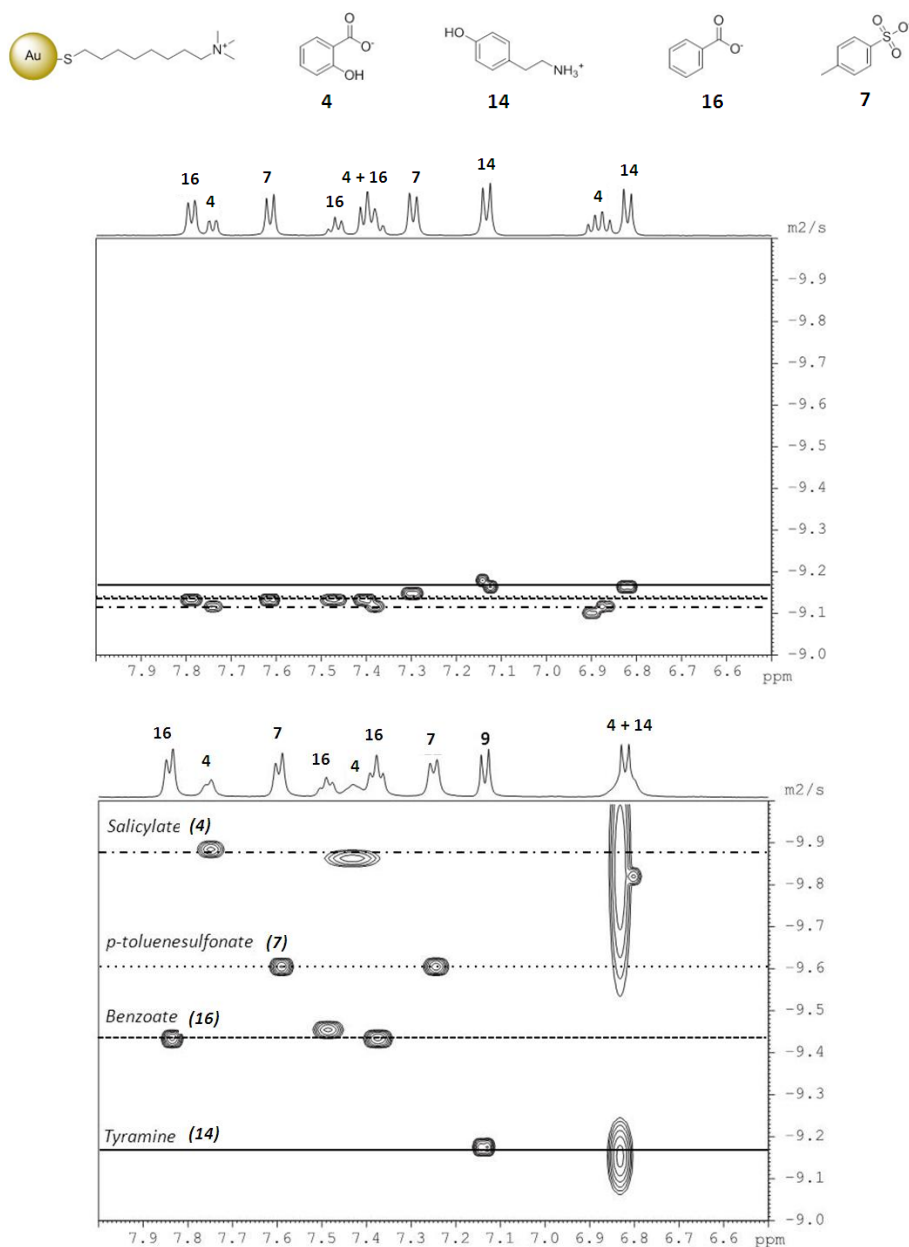
In teoria, questo esperimento potrebbe consentire di identificare i segnali di tutte le molecole presenti in una miscela, associandoli a differenti velocità di diffusione. E' però evidente che molecole di dimensioni paragonabili e con caratteristiche idrodinamiche simili difficilmente possono presentare coefficienti di diffusione molto diversi. Però, se nel campione è presente una fase stazionaria, o un recettore di grandi

dimensioni in grado di interagire in modo differenziato con le molecole presenti, le velocità di diffusione delle stesse saranno diminuite in modo proporzionale alla forza dell'interazione stessa. L'esperimento di "cromatografia NMR" è, quindi, un esperimento DOSY condotto in presenza di una fase stazionaria o di recettori macromolecolari, basato su un esperimento monodimensionale di diffusione.

Gli studi effettuati nel nostro gruppo hanno rivelato che le nanoparticelle sono una fase stazionaria molto efficace. Le loro piccole dimensioni, infatti, consentono di evitare le pesanti perturbazioni dell'omogeneità del campo magnetico prodotte da fasi stazionarie tradizionali, quali gel di silice o allumina; la stabilità consente l'applicazione in un ampio range di concentrazioni e solventi, a differenza di fasi stazionarie di caratteristiche simili, ma stabilità inferiore quali emulsioni, micelle e liposomi; infine, la natura auto-organizzata permette di esplorare una grande varietà di gruppi funzionali consentendo di ottenere la fase stazionaria adatta ad ogni campione con facilità.

Sulla base di queste premesse abbiamo deciso di testare questa tecnica sulle nanoparticelle funzionalizzate con il tiolo **9** Ammonio, in presenza della miscela di salicilato (**4**), benzoato (**16**), tosilato (**7**) e tirammina (**14**) precedentemente analizzata via NMR *chemosensing* (Fig. 2.19). In questo caso, i singoli componenti della miscela non possono essere isolati con spettri protonici standard né tantomeno con NOE-*pumping* e neppure direttamente con il DOSY (Fig. 2.23 a). Tuttavia, se l'esperimento DOSY viene ripetuto in presenza delle nanoparticelle **9** sopracitate (Fig. 2.23 b), ogni componente è facilmente identificato in base alla variazione del coefficiente di diffusione che è direttamente correlato all'affinità per il monostrato della nanoparticella.





**Figura 2.23:** Esperimento DOSY di una miscela di salicilato di sodio **4**, benzoato di sodio **16**, tosilato di potassio **7** e tiramina **14**, (1mM in D<sub>2</sub>O in assenza (a) e in presenza (b) di nanoparticelle **9** Ammonio. Condizioni [AuNp] = 90 μM, tampone HEPES 10 mM, pD 7.0.<sup>72</sup>

Appare chiaro dalla figura 2.23, che il coefficiente di diffusione del salicilato (**4**) è il maggiormente ridotto, indicando un'interazione così forte con le nanoparticelle da determinare persino una variazione del *chemical shift*. Tuttavia, questo fenomeno si traduce in una sovrapposizione dei segnali di salicilato (**4**) e tiramina (**14**) a 6.84 ppm; nonostante ciò la differenza indotta dalle nanoparticelle nei coefficienti di diffusione delle molecole, permette di risolvere la sovrapposizione nella dimensione della diffusione riassumendo il vantaggio maggiore della "cromatografia NMR".

Si osserva, anche, una diminuzione apparente dei coefficienti di diffusione di tosilato (**7**) e benzoato (**16**) in ragione di una loro interazione con le nanoparticelle anche se più modesta. Come atteso, la mappa DOSY non mostra alcun cambiamento per il coefficiente di diffusione della tiramina (**14**) sia in presenza che in assenza di nanoparticelle.

Gli esperimenti DOSY rinforzano ulteriormente quanto osservato per gli esperimenti NOE-*pump* (Fig. 2.19 b): monostrati composti da molecole organiche su nanoparticelle possono effettivamente interagire con piccole molecole tramite interazioni non covalenti. Perciò, le due tecniche descritte risultano complementari in quanto per interazioni troppo forti il NOE-*pumping* si dimostra inadeguato in termini di selettività, mentre il DOSY si dimostra inadeguato per le interazioni deboli.

## 2.4 Studio su altri analiti: Naprossene

Avendo a disposizione vari tipi di nanoparticelle e sapendo che quelle cationiche hanno manifestato una buona capacità di agire da sensori nei confronti di anioni, sono stati svolti esperimenti volti a verificare il ruolo delle diverse possibili interazioni nel riconoscimento dell'analita con la nanoparticella.

Sono, quindi, state selezionate nanoparticelle composte dai tioli **9** Ammonio, **10** Piridinio e **17** Ammonio-TEG, e come substrati gli anioni organici salicilato (**4**) e naprossene (**18**) (Fig. 2.24).

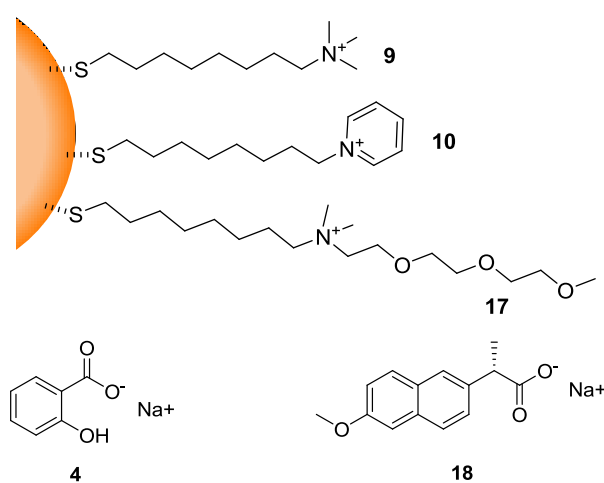


Figura 2.24: Rappresentazione dei tioli che passivano le nanoparticelle e degli analiti.

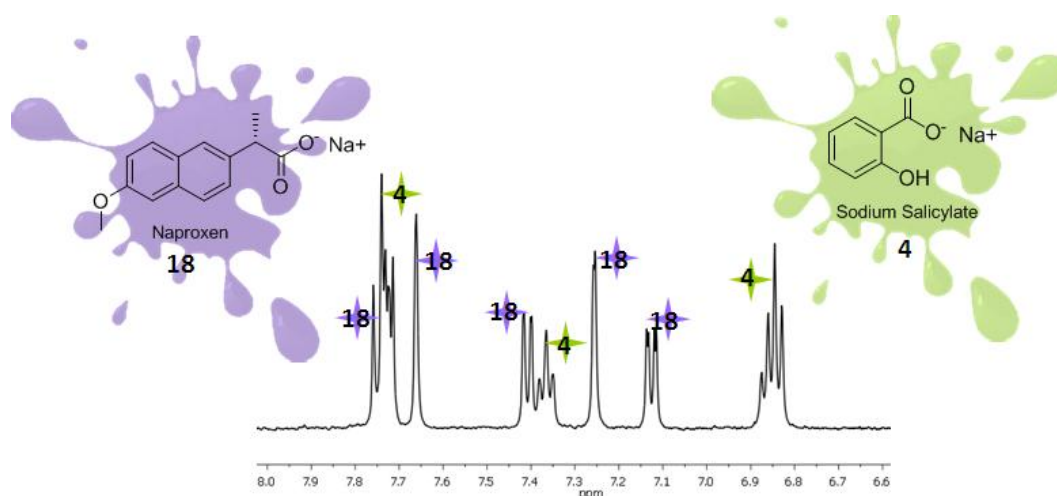
Il naprossene (**18**) è un farmaco antiinfiammatorio non steroideo (NSAID) della classe degli acidi propionici con proprietà antinfiammatorie, analgesiche e antipiretiche. Agisce inibendo in maniera competitiva e non selettiva gli enzimi cicloossigenasi-1 e cicloossigenasi-2 che catalizzano la formazione delle prostaglandine, responsabili del processo infiammatorio, della comparsa della febbre e del dolore.<sup>84</sup>

Allo stesso modo, anche il salicilato (**4**) appartiene alla classe dei farmaci antinfiammatori non steroidei (anche se meno utilizzato in terapia), presenta le stesse proprietà e agisce inibendo i medesimi enzimi elencati sopra per il naprossene.

Questi farmaci sono, quindi, molto usati e per questo motivo sono indispensabili sempre nuovi metodi per rilevarli in varie matrici ed in presenza di vari interferenti.

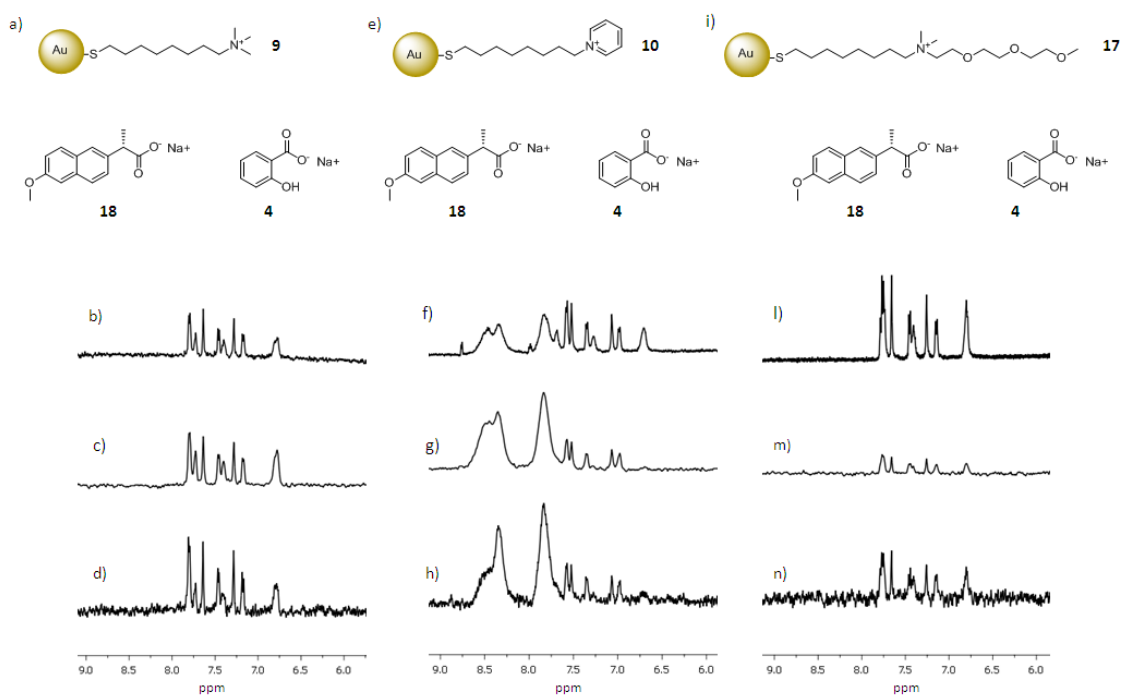
Molti metodi messi a punto per il rilevamento del naprossene prevedono l'utilizzo di specifici elettrodi<sup>85</sup> oppure l'utilizzo della termogravimetria<sup>86</sup> o, ancora, l'utilizzo della spettroscopia UV-Vis.

In figura 2.25 è riportato il subspectro 1H-NMR relativo alla regione aromatica delle due molecole in acqua a pH 7 e l'assegnazione dei segnali.



**Figura 2.25:** Assegnazione dei picchi NMR dei due ligandi, in viola è rappresentato il naprossene (**18**) mentre in verde il salicilato (**4**), entrambi presenti in concentrazione 0.5 mM in tampone HEPES 10 mM, pH 7.

In figura 2.26 sono stati riportati i risultati ottenuti aggiungendo alla miscela le nanoparticelle passivate con il tiolo **9** Ammonio (Fig. 2.26 a), il tiolo **10** Piridinio (Fig. 2.26 e) e il tiolo **17** Ammonio-TEG (Fig. 2.26 i), ed effettuando un semplice spettro 1H (Fig. 2.26 b, f, l), un esperimento di filtro di diffusione (Fig. 2.26 c, g, m), e un esperimento NOE-pump (Fig. 2.26 d, h, n).



**Figura 2.26:** a) Rappresentazione schematica del tiolo **9** Ammonio e dei relativi analiti: naprossene **18** e salicilato **4**; b) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **18** e **4** con AuNp **9**; c) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione; d) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione; e) Rappresentazione schematica del tiolo **10** Piridinio e dei relativi analiti: naprossene **18** e salicilato **4**; f) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **18** e **4** con AuNp **10**; g) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione; h) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione; i) Rappresentazione schematica del tiolo **17** Ammonio-TEG e dei relativi analiti: naprossene **18** e salicilato **4**; l) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **18** e **4** con AuNp **17**; m) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione; n) Esperimento NOE-*pumping* dello stesso campione;

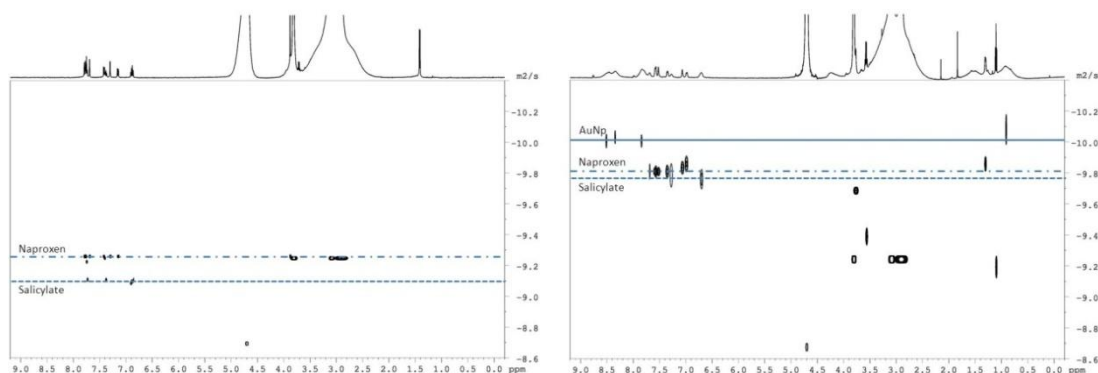
Condizioni:  $[\text{AuNp}] = 30 \mu\text{M}$ ,  $[\mathbf{4} \text{ e } \mathbf{18}] = 0.5 \text{ mM}$ , tampone HEPES 10 mM, pD 7.

Gli esperimenti effettuati sulle nanoparticelle passivate dal tiolo **9** ammonio (Fig. 2.26 a sinistra) evidenziano come i segnali degli analiti **4** e **18** siano presenti sia nello spettro NOE-*pump* che nel filtro di diffusione. Questo implica che gli analiti sembrano risiedere stabilmente, almeno in parte, nella nanoparticella. Infatti, in questo caso, gli analiti assumono lo stesso coefficiente di diffusione della nanoparticella stessa e i loro segnali non vengono più rimossi dallo spettro dal filtro di diffusione.

Le stesse identiche considerazioni possono essere fatte per la particella **17** Ammonio-TEG (Fig. 2.26 a destra) dove, infatti, entrambi gli analiti si ritrovano nel filtro di diffusione.

Un'informazione più interessante deriva, invece, dall'analisi dell'interazione tra il monostrato con il **10** Piridinio e gli stessi analiti (Fig. 2.26 al centro): l'unica molecola visibile sia nel filtro di diffusione che nel NOE-*pump* è il naprossene (**18**). Questi risultati ci hanno fatto pensare che, nel caso di queste particelle, la possibilità di un'interazione di tipo  $\pi$ - $\pi$  tra il sistema elettron-ricco del naprossene e quello elettron-

povero del piridinio potesse consentire una maggior selettività. Per validare questa ipotesi, è stato eseguito un esperimento DOSY.



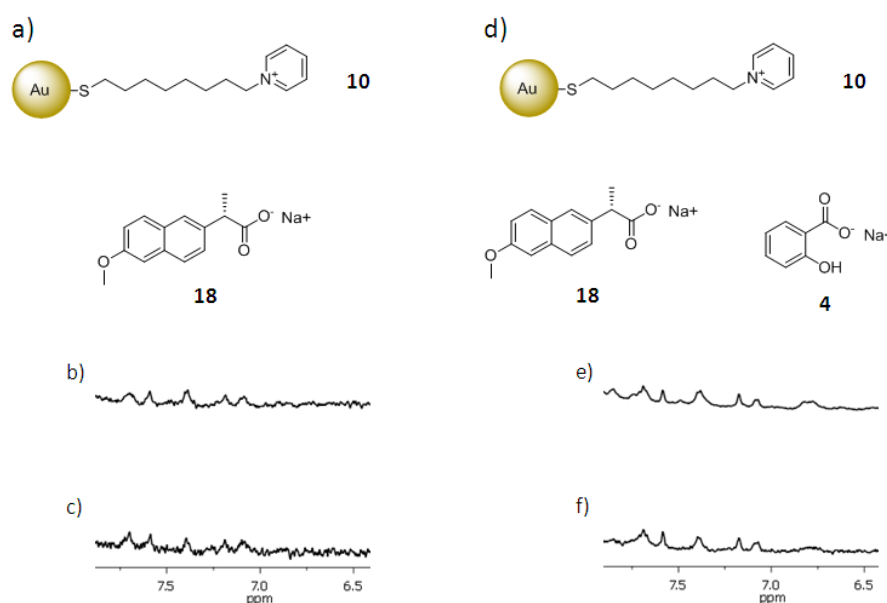
**Figura 2.27:** Esperimento DOSY di un miscela di naprossene **18** e salicilato di sodio **4** (0.5 mM) in assenza (sinistra) e in presenza (destra) di nanoparticelle **10** Piridinio. Condizioni [AuNp] = 30  $\mu$ M, tampone HEPES 10 mM, pD 7.0.

Dall'analisi degli esperimenti riportati in figura 2.27, è possibile desumere che entrambe le molecole abbiano una forte affinità per il monostrato **10** Piridinio, infatti, tutte e due mostrano un coefficiente di diffusione molto più basso rispetto a quello misurato in assenza di particelle e molto simile a quello delle nanoparticelle stesse. È estremamente difficile affermare se vi sia una significativa differenza di interazione tra naprossene (**18**) e salicilato (**4**), poiché la differenza nel coefficiente di diffusione è minima.

Anche se non chiariscono l'origine della selettività delle particelle ricoperte con tiolo **10** nel rivelare il naprossene rispetto al salicilato, questi esperimenti suggeriscono che anche il filtro di diffusione possa essere utilizzato come tecnica di rivelazione nel caso di interazioni forti. Anche questa tecnica, come il NOE-*pumping*, ha già trovato applicazione nel campo del *drug discovery* con il nome di *Affinity NMR*. In particolare, tale tecnica permette di distinguere analiti, potenziali substrati, che mostrano affinità di legame con un particolare recettore in presenza di altri analiti non interagenti. Essendo basato sull'utilizzo di una sequenza di filtro di diffusione, ovviamente questo non può non ricordare la "cromatografia NMR", con l'unica differenza di essere monodimensionale ed estremamente più veloce.<sup>87</sup>

## 2.5 Affinity NMR: AuNp 10 Piridinio

È stato, quindi, deciso di effettuare una serie di esperimenti di “Affinity NMR” per verificare la possibilità di rilevare molecole farmacologicamente rilevanti a basse concentrazioni. Il vantaggio dell’Affinity NMR rispetto al NOE-pumping ed al DOSY è la maggior sensibilità che consente di rilevare concentrazioni di analiti poco sopra 10  $\mu\text{M}$ . Infatti, la sequenza permette di rilevare direttamente la magnetizzazione della molecola e non quella ri-trasferita, in quantità sicuramente inferiore, dall’effetto NOE. Inoltre, l’esperimento ha durata molto più breve (il filtro di diffusione è solo una parte del NOE-pumping) e questo consente di effettuare un maggior numero di acquisizioni nello stesso tempo. Gli esperimenti sono stati effettuati tutti utilizzando come recettore le nanoparticelle **10** Piridinio, che sono state quelle che hanno dimostrato un’interazione più selettiva nei confronti del naprossene (**18**).

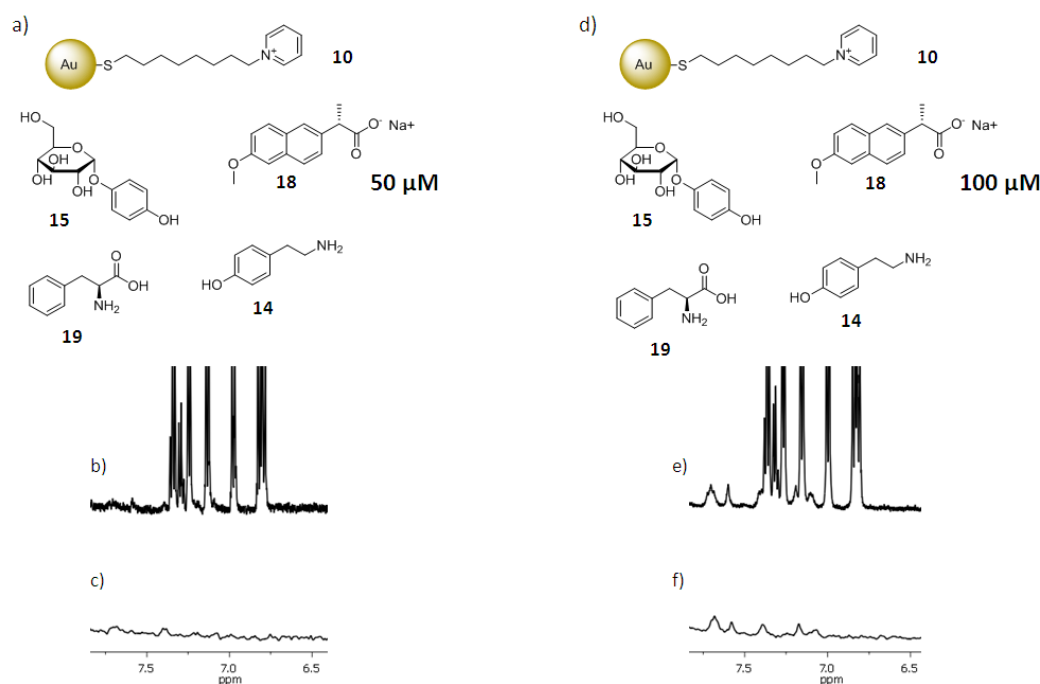


**Figura 2.28:** a) Rappresentazione schematica del tiolo **10** Piridinio e del relativo analita naprossene **18**; b) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **18** e **4** con AuNp **10**; c) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione; d) Rappresentazione schematica del tiolo **10** Piridinio e dei relativi analiti: naprossene **18** e salicilato **4**; e) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **18** e **4** con AuNp **10**; f) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione. Condizioni:  $[\text{AuNp}] = 30 \mu\text{M}$ ,  $[\mathbf{4} \text{ e } \mathbf{18}] = 50 \mu\text{M}$ , tampone HEPES 10 mM, pH 7.

In figura 2.28 sono riportati gli spettri ottenuti utilizzando le particelle **10** Piridinio in presenza di solo naprossene (**18**) (Fig. 2.28 a, b, c) o naprossene (**18**) e salicilato (**4**) (Fig. 2.28 d, e, f) alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ . In entrambi i casi negli spettri registrati con il filtro di diffusione (Fig. 2.28 c, f) si riescono a distinguere dal rumore di fondo i

segnali relativi al naprossene (**18**) mentre non si distinguono quelli relativi al salicilato (**4**).

Due esperimenti analoghi sono stati svolti per verificare la possibilità di identificare il naprossene (**18**) da una miscela complessa a basse concentrazioni (Fig. 2.29).



**Figura 2.29:** a) Rappresentazione schematica del tiolo **10** Piridinico e dei relativi analiti: tirammina **14**, arbutina **15**, fenilalanina **19** e naprossene **18**; b) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **14**, **15**, **19** e **18** con AuNp **10**; c) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione;

Condizioni:  $[\text{AuNp}] = 30 \mu\text{M}$ ,  $[\text{14, 15 e 19}] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{18}] = 50 \mu\text{M}$ , tampone HEPES 10 mM, pD 7.

d) Rappresentazione schematica del tiolo **10** Piridinico e dei relativi analiti: tirammina **14**, arbutina **15**, fenilalanina **19** e naprossene **18**; e) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli analiti **14**, **15**, **19** e **18** con AuNp **10**; f) Esperimento di filtro di diffusione dello stesso campione.

Condizioni:  $[\text{AuNp}] = 30 \mu\text{M}$ ,  $[\text{14, 15 e 19}] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{18}] = 100 \mu\text{M}$ , tampone HEPES 10 mM, pD 7.

I risultati sono riportati in figura 2.29. In entrambi i casi sono presenti tirammina (**14**), arbutina (**15**) e fenilalanina (**19**) 0.5 mM. E' inoltre presente il naprossene (**18**) alle concentrazioni rispettivamente di 50  $\mu\text{M}$  (b, c) e 100  $\mu\text{M}$  (e, f). L'analita è quindi da 5 a 10 volte meno concentrato delle altre specie, e negli spettri  $^1\text{H}$  standard la sua presenza è difficile da confermare a causa della sovrapposizioni con i segnali molto più intensi delle altre specie.

Analizzando i due spettri di filtro di diffusione si nota che, in entrambi i casi, il solo analita ad essere rilevato è il naprossene (**18**), anche se i suoi segnali sono appena visibili nello spettro registrato a 50  $\mu\text{M}$ . Le altre specie presenti in maggior quantità,

non interagiscono con le nanoparticelle e vedono i loro segnali completamente rimossi.

Il protocollo “*Affinity*”, coniugato con la possibilità di modificare con facilità le capacità di interazione molecolare delle particelle, rende quindi possibile l’analisi di miscele via NMR con sensibilità vicine al micromolare.

## 2.6 Molecular Switches

### 2.6.1 Azobenzene

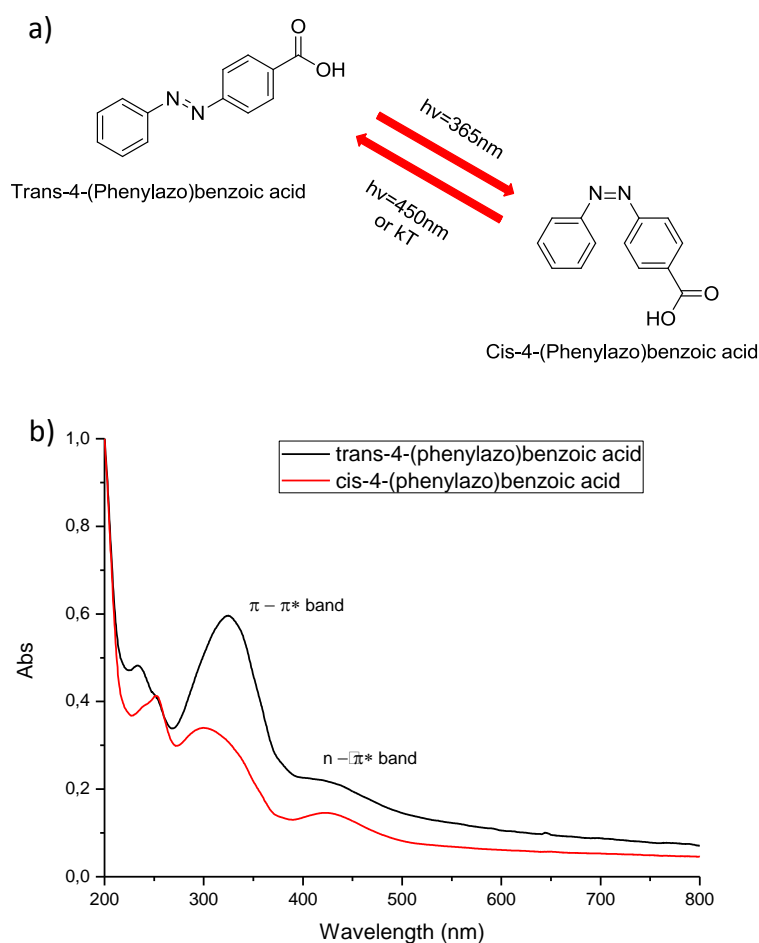
Un’altra serie di esperimenti è stata effettuata utilizzando derivati dell’azobenzene. Questi composti possono subire isomerizzazione *trans-cis* in presenza di luce Uv-Visibile, oppure per stress meccanico o stimolazione elettrica. La retro isomerizzazione *cis-trans* è spontanea e avviene al buio, perché l’isomero *trans* è quello termodinamicamente più stabile. Sono composti altamente utilizzati per varie applicazioni quali la creazione di polimeri in cui l’isomerizzazione luce-controllata determina un movimento, la realizzazione di materiali la cui superficie possenga proprietà capaci di modificarsi in seguito all’irradiazione luminosa, generare sonde proteiche, macchine molecolari e chelanti per ioni.<sup>88</sup> Essendo anche dei cromofori, possono essere utilizzati come indicatori per metalli, nell’industria dei coloranti e in dispositivi optoelettronici per controllare proprietà di ottica non lineare.<sup>89</sup>

L’isomerizzazione comporta anche una notevole modificazione della polarità della molecola, con la forma *cis* molto più polare della *trans*. È, quindi, possibile che le due forme interagiscano in modo diverso con il monostrato di ricoprimento delle particelle, consentendo di stabilire un sistema in cui la posizione del substrato (dentro il monostrato oppure libero in soluzione) possa essere controllata da un impulso luminoso.

Per verificare questa ipotesi, è stato scelto l’acido 4-fenilazobenzoico. Questa molecola è, infatti, solubile in acqua nella forma basica e mantiene la struttura anfifilica che, come discusso nei paragrafi precedenti, potrebbe ottimizzare l’interazione con il monostrato. Come descritto in figura 2.30 a, il passaggio dall’isomero *trans* al *cis*

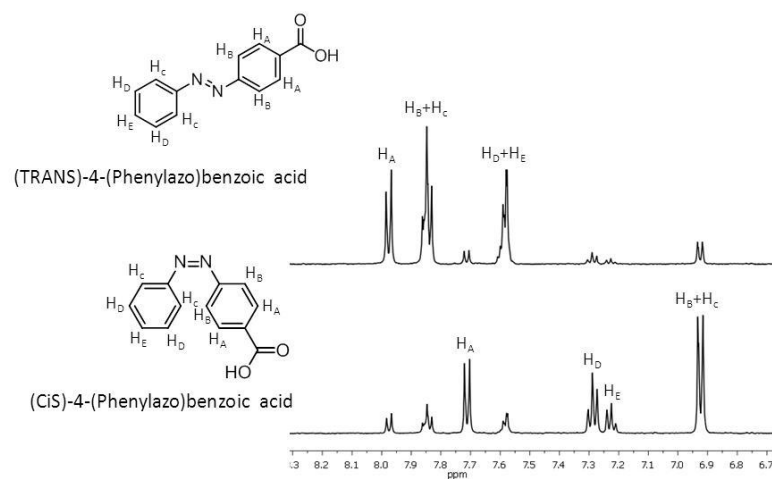


avviene irraggiando a 365 nm, mentre la retroisomerizzazione avviene spontaneamente in tempi piuttosto lunghi o velocemente irraggiando a 450 nm.



**Figura 2.30: a)** Schema dell'isomerizzazione del 4-(Phenylazo)benzoic acid.  
**b)** Spettro UV-Vis in tampone carbonato dei due isomeri.

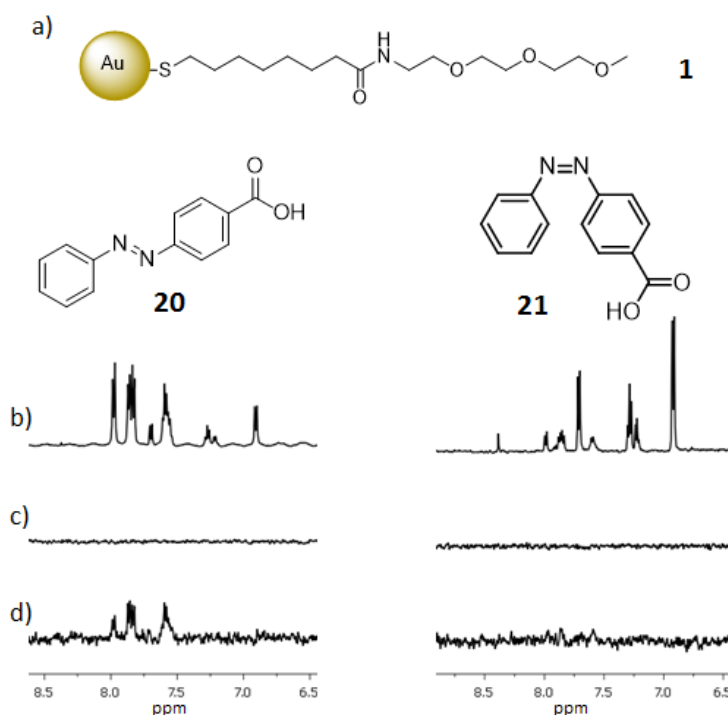
Inizialmente, si è proceduto ad un'analisi NMR delle molecole di interesse. Sia dallo spettro NMR dello stato all'equilibrio termico (prevalenza di forma *trans*), che da quello allo stato fotostazionario (prevalenza di forma *cis*), si nota come la conversione di una specie nell'altra non sia completa nelle condizioni utilizzate (Fig. 2.31) e come i segnali della forma *cis* appaiano generalmente a valori inferiori di *chemical shifts*. L'effettiva isomerizzazione è confermata dagli spettri UV-Vis ripostati in figura 2.30 b. In particolare si nota che la forma *trans* è caratterizzata da una forte assorbimento a ca. 320 nm.



**Figura 2.31:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  dell'acido (trans e cis) 4-fenilazobenzoico 0.4 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ /tampone carbonato pD=10, 500MHz.

### ✓ NMR Chemosensing: Studi di Interazione

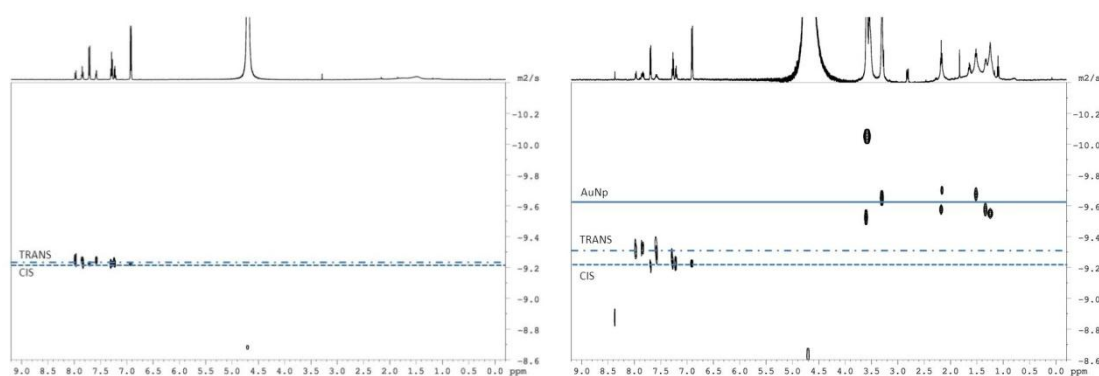
Gli studi di interazione sono effettuati con nanoparticelle passivate da vari tioli al fine di trovare la migliore interazione possibile. Inizialmente, le nanoparticelle studiate sono state quelle ricoperte con il tiolo TEG-ammido (Fig. 2.32 a).



**Figura 2.32:** a) Rappresentazione dei tioli che ricoprono la nanoparticella; b) Parte di  $^1\text{H-NMR}$  dell'acido 4-fenilazobenzoico (trans a sinistra e cis a destra) 0.4 mM in presenza di nanoparticelle TEG-ammido 15  $\mu\text{M}$  in tampone carbonato, 10 mM, pD=10; c) Filtro di diffusione; d) Esperimento NOE-pump dello stesso campione.

L'esperimento NOE-*pump* (Fig. 2.32 d sinistra) mette in evidenza come l'interazione con il monostrato sia specifica per l'isomero *trans*. Esso infatti è chiaramente visibile quando è la forma prevalente nel campione e rimane l'unico ad essere rilevato, seppur con segnali molto bassi, anche in seguito a irraggiamento con lampada UV a 365nm, quando la forma prevalente è divenuta la *cis* (Fig. 2.32 d destra). La ragione di tale comportamento sta nella diversa idrofobicità dei due isomeri. La forma *trans*, meno polare, si ripartisce più favorevolmente nella pseudofase idrofobica rappresentata dal monostrato di ricoprimento della particella. La forma *cis*, più polare, rimane nella fase acquosa.

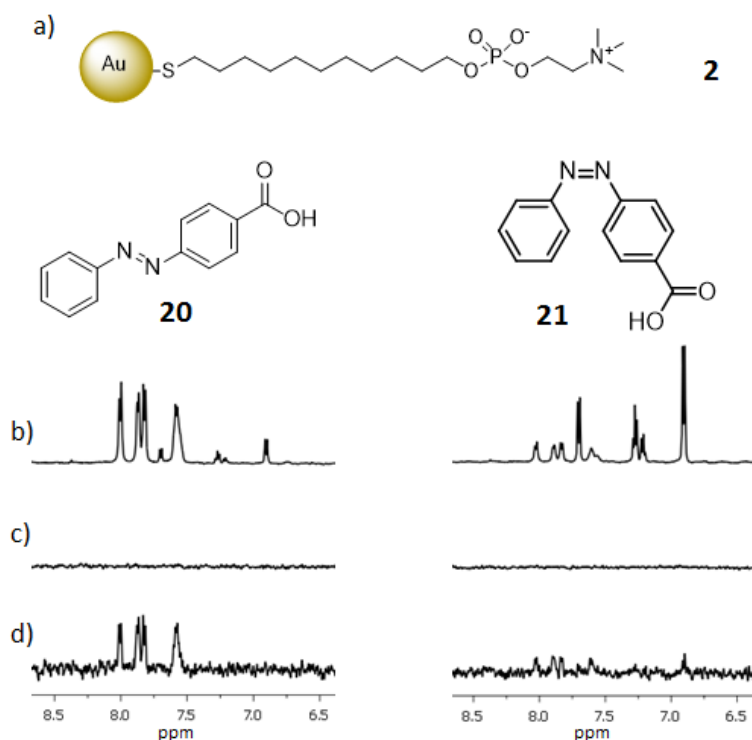
Non si rilevano segnali negli spettri registrati con il filtro di diffusione, suggerendo che l'interazione sia comunque piuttosto debole con conseguente bassa permanenza media delle molecole nel substrato della nanoparticella.



**Figura 2.33:** Esperimento DOSY dell'acido 4-fenilazobenzoico 0.4 mM in assenza (sinistra) e in presenza (destra) di nanoparticelle **1** TEG-Amide 15 µM in tampone carbonato 10 mM, pH=10.

Questa evidenza la si ritrova anche negli esperimenti DOSY (Fig. 2.33). Il coefficiente di diffusione dell'isomero *cis*, infatti, non subisce variazione in assenza ed in presenza di nanoparticelle, cosa che, invece, avviene per l'isomero *trans*. La differenza di coefficiente di diffusione registrata nell'esperimento non è però molto marcata e conferma, di fatto, un'interazione debole.

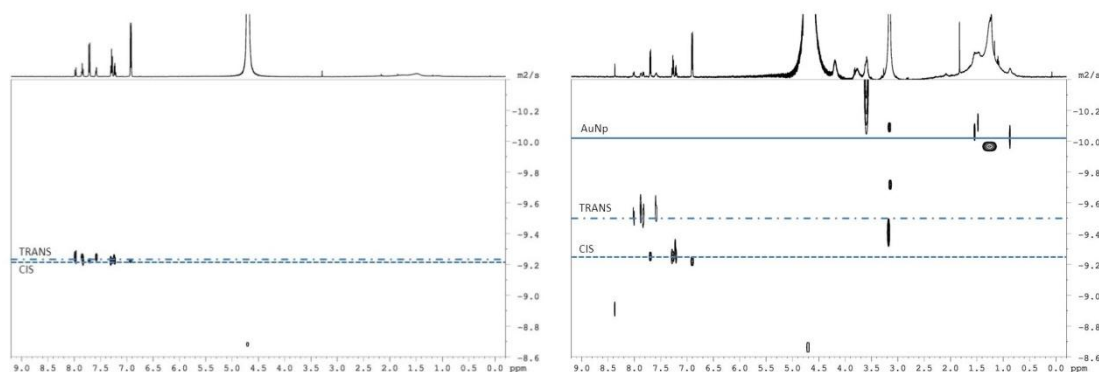
Queste evidenze hanno portato alla ricerca di monostrati più interagenti. E' stato, quindi, analizzato quello composto da **2** Fosforilcolina (Fig. 2.34) che in precedenza aveva mostrato una maggior capacità di catturare specie meno idrofobiche.



**Figura 2.34:** a) Rappresentazione dei tioli che ricoprono la nanoparticella; b) Parte di  $^1\text{H-NMR}$  dell'acido 4-fenilazobenzoico (*trans* a sinistra e *cis* a destra) 0.4 mM in presenza di nanoparticelle **2** Fosforilcolina 15  $\mu\text{M}$  in tampone carbonato, 10 mM, pD=10; c) Filtro di diffusione; d) Esperimento NOE-*pump* dello stesso campione.

L'esperimento NOE-*pump* (Fig. 2.34 d sinistra) evidenzia come vi sia un'interazione rilevabile tra l'isomero *trans* dell'acido 4-fenilazobenzoico con il monostrato; ciò è evidente anche dopo l'isomerizzazione a *cis* (Fig. 2.34 d destra); infatti, pur essendo estremamente poco intensi vengono rilevati quasi esclusivamente i segnali relativi alla forma *trans*.

L'esperimento DOSY (Fig. 2.35) evidenzia, infatti, in maniera evidente la differenza nei coefficienti di diffusione delle due specie. In particolare, mentre di nuovo la forma *cis* non mostra alcuna interazione con il monostrato, la forma *trans* è rallentata, in modo più evidente rispetto a quanto osservato con le nanoparticelle **1** TEG-Amide, indicando che l'interazione è più forte con le nanoparticelle **2** Fosforilcolina.

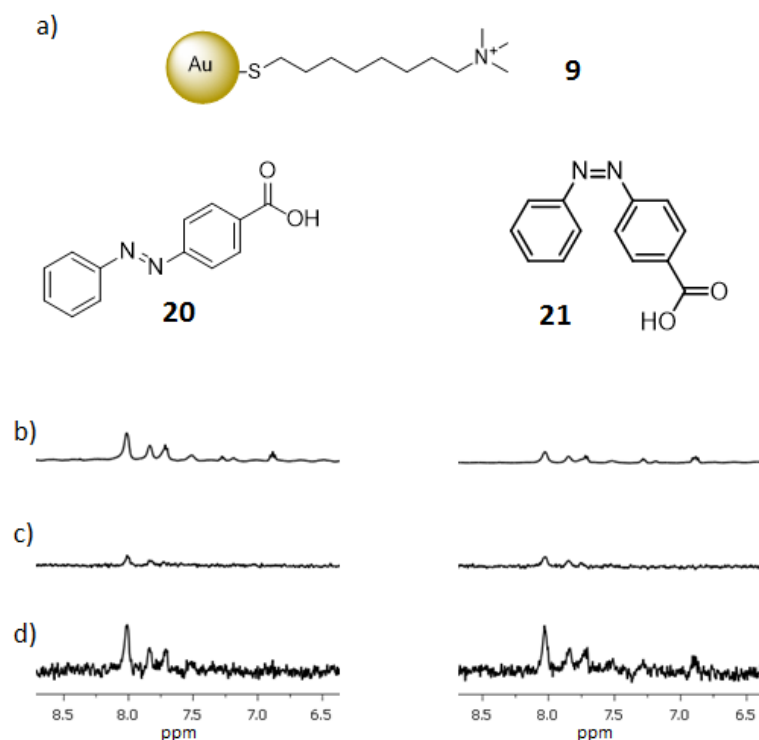


**Figura 2.35:** Esperimento DOSY dell'acido 4-fenilazobenzoico 0.4 mM in assenza (sinistra) e in presenza (destra) di nanoparticelle **2** Fosforilcolina 15  $\mu$ M in tampone carbonato 10 mM, pD=10.

Successivamente, è stato esaminato il comportamento del 4-fenilazobenzoato in presenza di nanoparticelle ricoperte con il tiolo **9** Ammonio. Come abbiamo visto in precedenza, queste nanoparticelle (Fig. 2.36 a), possono interagire fortemente con i substrati dotati di carica negativa sia elettrostaticamente che per interazione idrofobica. In effetti, tale abilità è stata confermata nel caso del derivato diazobenzenico. Come si vede già dallo spettro protonico (Fig. 2.36 b sinistra), i segnali relativi all'azobenzene risultano non più definiti ma allargati. Questo allargamento dei segnali è dovuto ad un'interazione forte con l'analita caratterizzata da lunghi tempi di permanenza: non siamo più in regime di scambio veloce, ma l'acido 4-fenilazobenzoico sembra risiedere stabilmente (rispetto alla scala dei tempi NMR) all'interno del monostrato di tioli della nanoparticella.

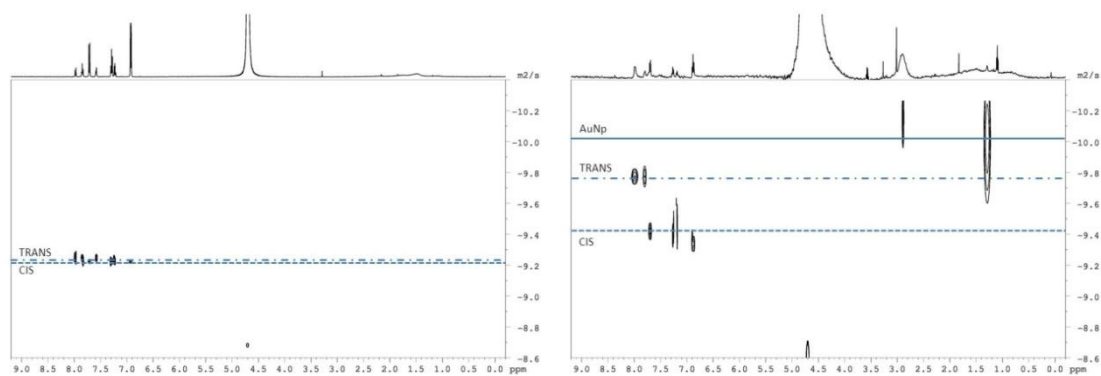
Inoltre, analizzando lo spettro protonico della miscela dopo l'irraggiamento (Fig. 2.36 b destra), si nota come, in questo caso, l'isomerizzazione sia poco efficiente, con una conversione limitata al 20%, indice del fatto che probabilmente la ripartizione dell'analita all'interno del monostrato ne ostacola l'isomerizzazione.

Queste considerazioni sono supportate anche dal fatto che analizzando gli spettri ottenuti con il filtro di diffusione (Fig. 2.36 c) si vedono i segnali residui dell'analita, indice del fatto che esso, trovandosi all'interno del monostrato per tempi molto lunghi, assume un coefficiente di diffusione simile a quello delle nanoparticelle.



**Figura 2.36:** **a)** Rappresentazione dei tioli che ricoprono la nanoparticella; **b)** Parte di  $^1\text{H-NMR}$  dell'acido 4-fenilazobenzoico (*trans* a sinistra e *cis* a destra) 0.4 mM in presenza di nanoparticelle **9** Ammonio 15  $\mu\text{M}$  in tampone carbonato, 10 mM,  $\text{pD}=10$ ; **c)** Filtro di diffusione; **d)** Esperimento NOE-pump dello stesso campione.

La diminuzione del coefficiente di diffusione viene valutata dall'esperimento DOSY (Fig. 2.37), da cui è immediatamente visibile come la nanoparticelle ricoperte di tiolo **9** Ammonio producano il più ampio rallentamento della specie *trans* rispetto ai monostrati finora analizzati. Inoltre, in questo caso, anche la specie *cis* subisce un piccolo rallentamento, indice di una debole interazione già evidenziata dalla presenza dei segnali relativi nello spettro NOE-pumping (Fig. 2.36 d).

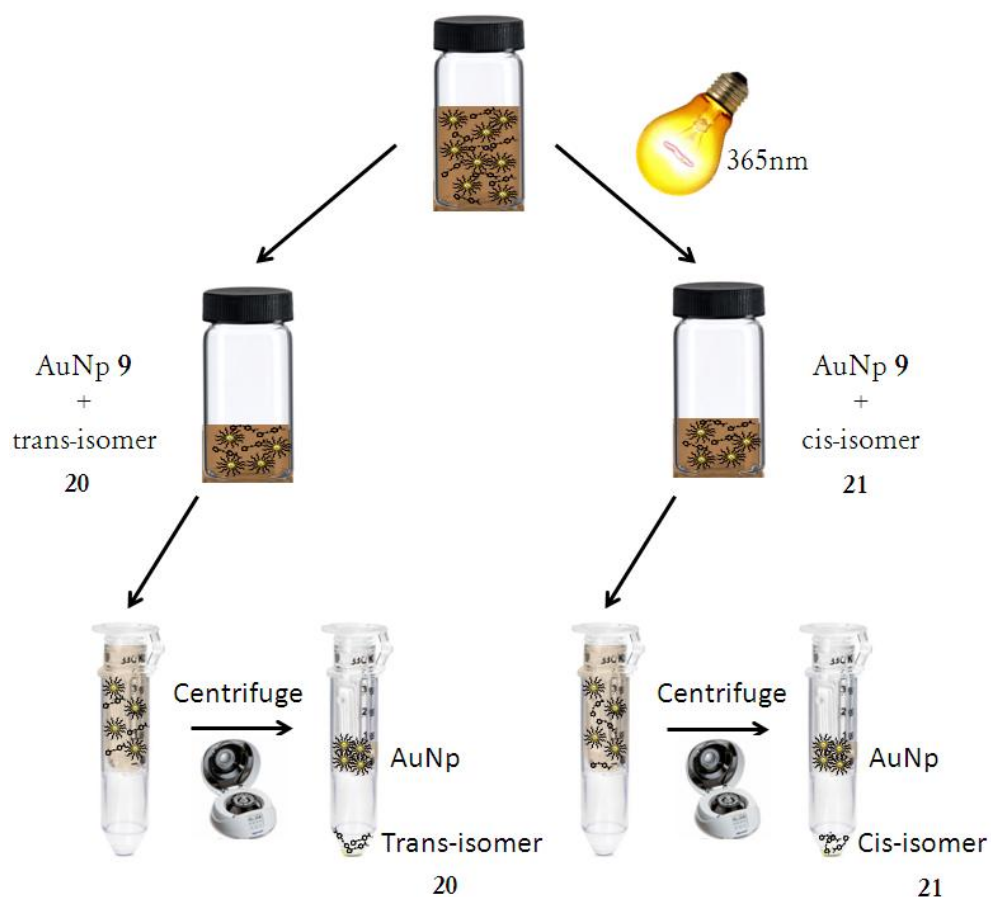


**Figura 2.37:** Esperimento DOSY dell'acido 4-fenilazobenzoico 0.4 mM in assenza (sinistra) e in presenza (destra) di nanoparticelle **9** Ammonio 15  $\mu\text{M}$  in tampone carbonato 10mM,  $\text{pD}=10$ .

I risultati di questo esperimento suggeriscono la possibilità di ottenere un rilascio di azobenzene dalle nanoparticelle per semplice fotoisomerizzazione. Infatti, la forma *trans* è fortemente legata alle particelle e ne assume il coefficiente di diffusione, mentre la forma *cis* non si lega se non marginalmente. Questo processo potrebbe costituire un interessante meccanismo di rilascio fotocontrollato di molecole organiche da nanoparticelle.

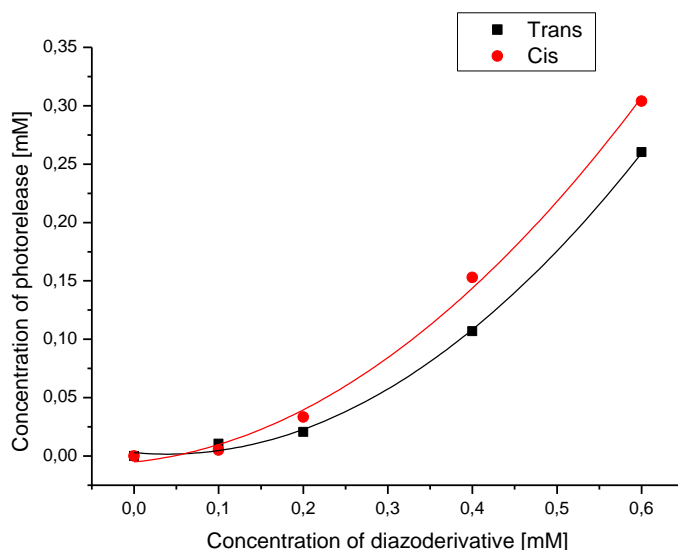
✓ **Esperimenti di Fotorilascio**

Sono, quindi, stati svolti alcuni esperimenti per verificare l'ipotesi sopra riportata. In questi esperimenti, una soluzione di nanoparticelle 15  $\mu\text{M}$  e 4-fenilazobenzoato è stata sottoposta a dialisi con filtri a cut-off di 3000 Da (in grado di trattenere le particelle) prima e dopo la fotoisomerizzazione (Fig. 2.38). Le soluzioni filtrate vengono analizzate via assorbimento UV-Vis dopo equilibratura. L'intensità di assorbimento a 325 nm, corrispondente alla forma *trans*, permette di determinare la quantità di diazoderivato presente nella soluzione.



**Figura 2.38:** Schema dell'esperimento di fotoisomerizzazione: la soluzione preparata composta di AuNp 9 Ammonio 15  $\mu\text{M}$  e concentrazioni variabili di azobenzene **20** viene separata in due, una parte viene semplicemente centrifugata con filtri da 3 kDa mentre l'altra prima viene fotoisomerizzata **21** con lampada UV a 365 nm, il centrifugato viene quindi analizzato mediante spettroscopia UV-Vis.

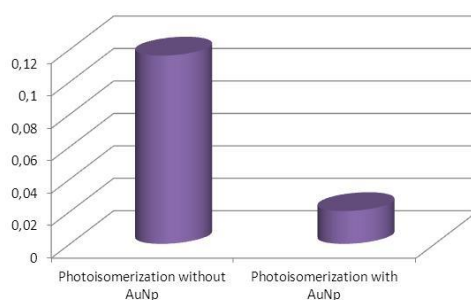
L'esperimento è stato condotto a diverse concentrazioni di analita ed i risultati, in termini di assorbanza del picco a 325 nm delle soluzioni di eluato, sono riportati in Figura 2.39. L'analisi del grafico dimostra come, in ogni caso, una certa quantità di diazobenzene venga trattenuta dalle nanoparticelle. In condizioni di saturazione, raggiunta per concentrazioni di azobenzene superiori a 0.3 mM, tale quantità sembra corrispondere a circa 20 molecole di azobenzene per particella.



**Figura 2.39:** Grafico dei dati di fotoisomerizzazione: concentrazione di diazoderivato vs. concentrazione di diazoderivato fotorilasciato a 325 nm, ■ rappresenta l'assorbanza del centrifugato prima della fotoisomerizzazione (*trans* **20**) a diverse concentrazioni in presenza di AuNp **9** Ammonio 15  $\mu$ M, mentre ● rappresenta l'assorbanza del centrifugato dello stesso campione dopo fotoisomerizzazione (*cis* **21**) in presenza di AuNp **9** Ammonio 15  $\mu$ M.

Alla concentrazione di azobenzene di 0.1 mM, l'analita è quasi completamente legato alle nanoparticelle. Queste sarebbero le condizioni adatte a realizzare un sistema di rilascio controllato, in cui il substrato è completamente legato alla nanoparticella e se ne distacca in seguito a irradiazione luminosa. Sfortunatamente, l'esame dei dati in figura 2.39 indica che il rilascio, se presente, è molto contenuto. Anche dopo irraggiamento luminoso il 4-fenilazobenzoato sembra rimanere completamente legato alla nanoparticella. Solo a concentrazioni più elevate si riproduce quanto visto negli esperimenti NMR, con la forma *cis* meno legata alle particelle della forma *trans*.

La spiegazione di questo effetto sta probabilmente nel fatto che la fotoisomerizzazione non avviene quando il diazobenzene è fortemente legato alla nanoparticella.

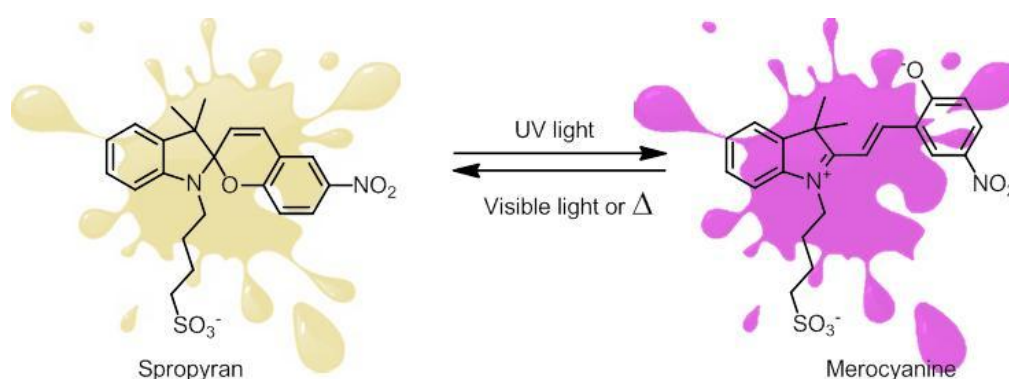


**Figura 2.40:** Grafico che rappresenta l'assorbanza di 0.1 mM di acido (*trans*)-4-fenilazobenzoico dopo isomerizzazione effettuata prima di aggiungere le nanoparticelle e in presenza di nanoparticelle ammonio 15  $\mu$ M.

Infatti, come si vede nel grafico (Fig. 2.40), il valore dell'assorbanza a 295 nm del picco dell'isomero *cis* in assenza di nanoparticelle (sinistra) è nettamente più alto del valore registrato in presenza di nanoparticelle, indice del fatto che l'interazione forte con le particelle impedisce l'isomerizzazione. Questo effetto può avere diverse cause di origine sterica e termodinamica. Da un lato, l'inclusione del monostato potrebbe ostacolare i movimenti molecolari necessari per l'isomerizzazione, dall'altro la stabilizzazione della forma *trans* implicata nell'elevata affinità, sposta la posizione dell'equilibrio verso questa.

### 2.6.2 Spiropirano

In seguito a questi risultati si è pensato di effettuare i medesimi esperimenti di fotoisomerizzazione utilizzando un analita che segua un diverso meccanismo di fotoisomerizzazione. La scelta è ricaduta questa volta sulla famiglia degli spiropirani.<sup>90</sup> La classe degli spiropirani possiede un importante ruolo nell'area tecnologica per le sue proprietà fotocromiche, termocromiche, solvatocromiche e elettrocromiche. In particolare, molte applicazioni si basano sulle proprietà fotocromiche, la radiazione genera una trasformazione reversibile tra due o più differenti forme della molecola con conseguente cambio dello spettro di assorbimento e delle proprietà. La luce UV e quella visibile sono utilizzate per passare dalla forma merocianina alla forma spiropirano.<sup>91</sup> È stato, quindi, sintetizzato il composto in figura 2.41.<sup>92</sup>



**Figura 2.41:** Rappresentazione schematica della reazione fotocromica di conversione e retroconversione tra spiropirano e merocianina

La molecola è composta da due parti, un pirano e una parte eterociclica. Come visibile dal disegno (Fig. 2.41 sinistra) la forma spiropirano non presenta coniugazione degli elettroni  $\pi$  delle due parti; la soluzione sarà, quindi, debolmente colorata e lo spettro di assorbimento sarà la somma distinta delle due parti. La forma merocianina (Fig. 2.41 destra), al contrario, presenta coniugazione di elettroni  $\pi$ , manifestando un color porpora molto acceso. In questo caso, però, non è stato possibile effettuare nessun esperimento di fotoisomerizzazione perché la molecola ha presentato una straordinaria affinità nei confronti della cellulosa rigenerata con cui era composto il filtro da 3000 Da. In commercio non sono disponibili filtri con *cut-off* simili composti da altri materiali, quindi, non è stato possibile continuare lo studio.

## 3. Conclusioni

---

L'utilizzo dell'NMR come tecnica di rilevazione del segnale di un sensore molecolare è già stato proposto nella letteratura scientifica da alcuni anni ed è particolarmente interessante per le sue potenziali applicazioni nel campo dell'*imaging*. Tutti gli esempi riportati finora, però, seguivano l'approccio classico, nel quale il riconoscimento provocava la modificazione di una proprietà del chemosensore, quale ad esempio, la sua capacità di modificare il tempo di rilassamento del solvente circostante oppure il *chemical shift* di un segnale del recettore.<sup>93</sup> In questo modo molte delle informazioni associate ai dati NMR vengono perse.

L'approccio utilizzato permette invece di mantenere tutte le informazioni strutturali che possono derivare da semplici esperimenti di NMR protonico monodimensionale, ma vi aggiunge la capacità di riuscire a discernere singoli componenti da miscele estremamente complesse di analiti. I risultati discussi nei paragrafi precedenti dimostrano come la combinazione di nanoparticelle d'oro e della tecnica NMR possa essere un nuovo e valido protocollo nel campo del *sensing*. Le interazioni non covalenti tra il monostrato che ricopre le nanoparticelle e gli analiti possono essere sfruttate per

rilevare molecole interagenti sia per trasferimento di magnetizzazione, con l'esperimento *NOE-pumping*, sia per perturbazione dei coefficienti di diffusione, con l'esperimento DOSY.

Le proprietà delle nanoparticelle, quali la capacità di auto-organizzarsi e la loro propensione a subire diversi tipi di funzionalizzazione, permettono la facile ideazione di nuovi recettori, dove anche l'affinità per il substrato può essere modulata aggiungendo o levando differenti interazioni. Quando l'interazione è selettiva e l'analita è in regime di scambio veloce con la nanoparticella nella scala dei tempi della diffusione, la nanoparticella può essere usata come fonte di magnetizzazione che può essere trasferita selettivamente alla molecola interagente sfruttando il NOE. In questo modo, solo i segnali delle specie interagenti saranno visualizzati nello spettro NMR finale, quindi, l'esperimento *NOE-pumping* permette di discriminare gli analiti per la loro affinità con le nanoparticelle stesse.

Quando l'interazione risulta forte, si osserva una variazione nel coefficiente di diffusione dell'analita, questo può essere sfruttato utilizzando la tecnica DOSY, che procede alla separazione della complessa miscela analizzata sfruttando il cambiamento nel coefficiente di diffusione che le nanoparticelle generano per interazione.

Gli esperimenti effettuati sul naprossene (**18**) sono stati abbastanza confortanti. In miscele complesse con esperimenti di *affinity NMR* è stato possibile rilevare una concentrazione di naprossene (**18**) fino al 50  $\mu\text{M}$ , in presenza di analiti non interagenti in concentrazioni dieci volte maggiori.

Gli esperimenti di interazione volti ad identificare se fosse presente interazione  $\pi$ - $\pi$ , oltre a quella elettrostatica, hanno dimostrato che seppur non presente in maniera preponderante, l'interazione sembra migliorare in presenza di nanoparticelle **10** Piridinio nei confronti del naprossene (**18**), rispetto al salicilato (**4**), utilizzato come interferente.

Gli esperimenti condotti sull'interazione delle nanoparticelle con il diazobenzene hanno anche dimostrato come l'uso della spettroscopia NMR consente di investigare anche sistemi complessi con comportamenti responsivi. Infatti, si è potuto verificare che la forma *trans* del 4-fenilazobenzoato abbia un'interazione con determinati monostrati, a differenza della forma *cis*.

Si è, inoltre, potuto valutare la capacità di interazione di diversi monostrati verificando che la forza dell'interazione può essere modificata introducendo nuove interazioni. Infatti, in ogni caso, il monostrato che presenta il gruppo ammonio carico positivamente in coda al tiolo (**9**) è quello che sembra interagire maggiormente, questo è confermato sia dagli esperimenti NMR che dal fatto che la fotoisomerizzazione del *trans*-azobenzene a *cis* è parzialmente impedita a causa della forte interazione con le nanoparticelle e si è rivelata essere inferiore al 20%. Questa forte interazione, e la sua sensibilità all'irradiazione luminosa, sono stati utilizzati per progettare nuovi meccanismi di rilascio. Gli esperimenti effettuati, però, hanno indicato che per fotoisomerizzazione a basse concentrazioni non si riesce ad ottenere un rilascio di azobenzene dal monostrato, questo, probabilmente, causato da un cambio importante nella geometria che avviene in seguito a isomerizzazione.





## 4. Materiali & Metodi

---

### 4.1 Strumentazione

#### ✓ Analisi NMR

Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker AVIII 500 con probe 5 mm BBI z gradient che opera a 500,13 MHz per  $^1\text{H}$ . Gli spettri sono stati registrati a 25°C; i *chemical shift* ( $\delta$ ) sono riportati in ppm usando, come riferimento interno, il picco residuo del solvente [ $\text{CDCl}_3$ : 7.26 ppm;  $\text{D}_2\text{O}$ : 4.79 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ : 3.31 ppm, DMSO: 2.50]. Le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz, la molteplicità dei segnali è stata indicata in accordo a quanto segue: **s**: singoletto; **d**: doppietto; **t**: tripletto; **q**: quartetto; **m**: multipletto; **dd**: doppietto di doppietti; **br**: banda allargata; **sa**: singoletto allargato. Gli spettri sono stati analizzati utilizzando il software Topspin, Mestre Nova e per gli esperimenti DOSY, Topspin 3.3 e Dynamic Center 2.2.5.

✓ **Analisi Massa**

Gli spettri ESI-MS sono stati registrati utilizzando un LC/MSD Trap SL Agilent serie 1100 operante in condizione di infusione in flusso del campione, con ionizzazione di tipo *elettrospray* (ESI) ed analizzatore di massa a trappola ionica (IT).

✓ **Spettroscopia UV-Vis**

Per la registrazione degli spettri UV/Vis sono stati utilizzati gli spettrofotometri Varian Cary 50 e Varian Cary 100, equipaggiato con porta-celle termostato a circolazione d'acqua. Per le misure si sono usate celle di quarzo HELMA con cammino ottico di 10 mm. Gli spettri si intendono registrati a 25°C. Tutti i dati sono stati analizzati con il programma OriginPro8.

✓ **Analisi TEM**

Le immagini TEM sono state registrate con un microscopio elettrico Jeol 300 PX. Una goccia del campione viene depositata su un vetrino e il solvente viene lasciato evaporare. Le immagini TEM vengono elaborate utilizzando il software ImageJ.

✓ **Analisi TGA**

Analisi di termogravimetria sono state effettuate con lo strumento TA modello Q5000 IR. Sono utilizzati 1-2 mg di campione con una sequenza da 30 a 1000°C sotto flusso continuo di aria.

✓ **Misurazioni di pH**

Il pH delle soluzioni e i tamponi sono stati determinati a temperatura ambiente utilizzando un pH-metro Metrohm-632 con elettrodo Ag/AgCl/KCl.

## 4.2 Materiali

Tutti i reagenti e solventi commerciali sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Analisi TLC sono state effettuate utilizzando lastre di vetro alluminio o plastica pre-caricate con gel di silice Merck 60 F<sub>254</sub>. Per le colonne cromatografiche è stato utilizzato gel di silice 60 Macherey-Nagel (70-230 mesh).

### ✓ Molecole per studi NMR e di fotorilascio

Sodio salicilato (**4**), acido 3-idrossibenzoico (**5**), acido 4-idrossibenzoico (**6**), *p*-toluensolfonato di sodio (**7**), benzene-1,3-disolfonato di disodio (**8**), acetato di sodio (**11**), butanoato di sodio (**12**), esanoato di sodio (**13**), tiramina (**14**), arbutina (**15**), benzoato di sodio (**16**), naprossene (**18**), fenilalanina (**19**) e acido 4-fenilazobenzoico (**20-21**) sono tutti prodotti Aldrich utilizzati senza purificazioni.

I tioli **1** TEG-Amide, **2** Fosforilcolina sono stati preparati come riportato, mentre i tioli **3** TEG-AmideLong, **9** Ammonio, **10** Piridinio e **17** Ammonio-TEG erano già disponibili nel laboratorio.

Lo spiropirano (**22-23**) è stato sintetizzato secondo la procedura riportata.

### ✓ Preparazione dei campioni NMR

La concentrazione di nanoparticelle nel tubo NMR per la titolazione con ioni gadolinio è stata determinata per peso considerando che con il nostro protocollo si ottengono nanoparticelle di formula media Au<sub>180</sub>RS<sub>70</sub> e nel caso di nanoparticelle miste la quantità dei due tioli è stata stimata per decomposizione delle stesse con iodio e successiva integrazione dei segnali isolati.

Le soluzioni *stock* degli analiti sono state preparate in D<sub>2</sub>O oppure in tampone carbonato (100 mM, pD 10) oppure in tampone HEPES (100 mM, pD 7).

I tubi NMR sono stati preparati mescolando gli analiti richiesti e aggiustando il volume a 600 µL con D<sub>2</sub>O oppure con i giusti tamponi.

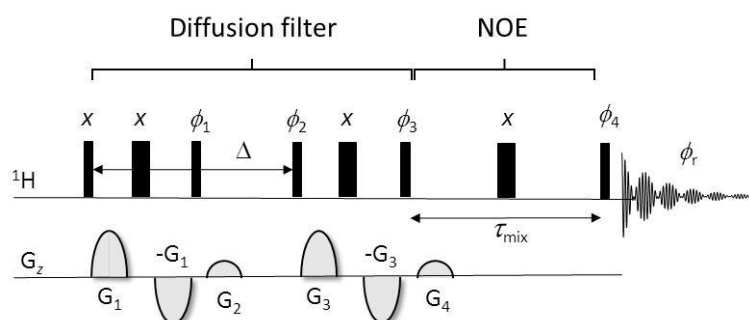
Il campione di urina umana è stato raccolto la mattina presto dal volontario. L'aspirina somministrata è Aspirina commerciale 1 g e assunta 12 ore prima di raccogliere il campione. La preparazione di questo campione per gli esperimenti NMR è stata la seguente: 1 mL di urina è stata centrifugata a 14000 rpm per 5 minuti, in seguito sono



stati aggiunti 70  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato (0.4 M, pD 7) contenente 10 mM di  $\text{NaN}_3$  e, quando necessario, 12  $\mu\text{L}$  di una soluzione 300 mM di sodio salicilato (**4**) in  $\text{D}_2\text{O}$ . infine, sono stati aggiunti 2.9 mg di AuNp **1** TEG-Amide e la soluzione di 600  $\mu\text{L}$  è stata trasferita in un tubo NMR da 5 mm.

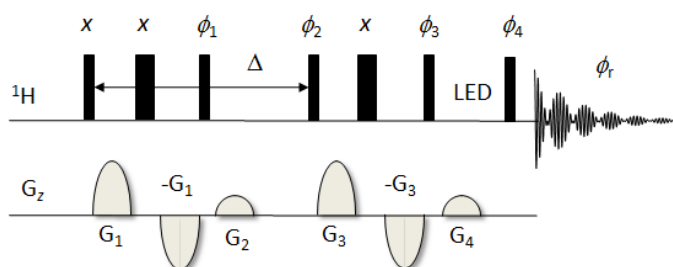
### ✓ Esperimenti NMR

Gli spettri NMR di NOE-*pumping* sono stati acquisiti utilizzando la sequenza di impulsi riportata in figura 2, e sono stati registrati utilizzando i seguenti parametri sperimentali: larghezza spettrale = 5 KHz, punti acquisiti = 16 k, numero di acquisizioni = 3072, recycle delay = 2 s, mixing time = 400-1200 ms, diffusion delay  $\Delta = 50$  ms,  $g = 50$  G/cm,  $\delta = 5$  ms. Zero-filling a 64 k e un line-broadening di 2 Hz sono stati applicati prima della trasformata di Fourier.



Esperimenti di NOE selettivo sono stati condotti utilizzando la sequenza DPFGE NOE.

Esperimenti DOSY 2D sono stati registrati utilizzando la sequenza LED-BPP (ledbpgp2s).

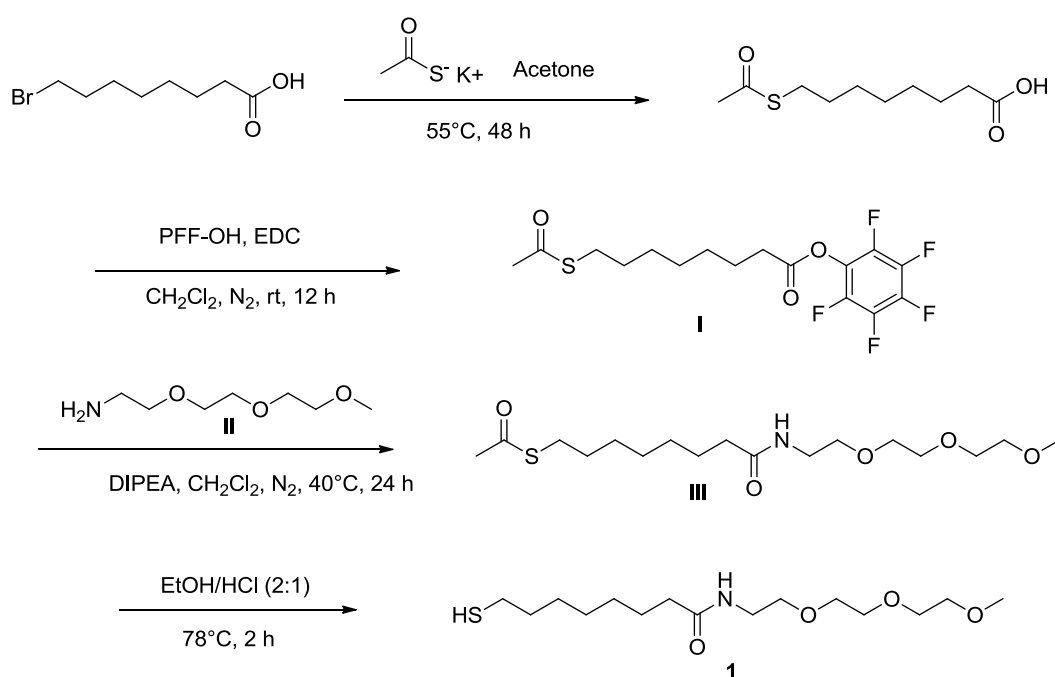


Parametri rilevanti: larghezza spettrale = 6 KHz, punti acquisiti = 16 k, numero di acquisizioni = 128, dummy scans = 16, recycle delay = 2 s, diffusion delay  $\Delta = 100$  ms,

$\delta/2 = 1$  ms. La parte LED è stata settata a 5 ms. I gradienti di spoil G2 e G4 hanno una durata di 600  $\mu$ s e hanno il compito di distruggere la residua magnetizzazione trasversale. Ogni spettro è stato processato con Topspin 3.1 e Dynamic Center 2.2.5 (Bruker BioSpin GmbH, 2014). I coefficienti di diffusione sono estratti dal *fitting* delle intensità dei picchi vs l'intensità dei gradienti.

### ✓ Sintesi e caratterizzazione del tiolo 1 TEG-Amide

La sintesi del tiolo 1 TEG-Amide è stata eseguita seguendo lo schema riportato:



#### **8-tioacetil pentafluorofenilottanoato (I).**

L'acido 8-Bromoottanoico (1.5 g, 6.7 mmol) è sciolto in acetone e messo a riflusso per 48 ore con aggiunta di tioacetato di potassio (1.03 g, 8.7 mmol). La soluzione viene evaporata e il solido residuo viene ripreso in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20mL). La soluzione organica viene estratta con acqua (5 x 20 mL) e anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Dopo l'evaporazione del solvente si ottengono 1.01 g (70%) di acido 8-(tioacetil)-ottanoico.

[ $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$ : 2.82 (t, 2H, 7 Hz), 2.30 (t, 2H, 7 Hz), 2.28 (s, 3H), 1.56 (m, 4H), 1.30 (m, 6H)].

L'acido 8-(tioacetil)-ottanoico (1.01 g, 4.6 mmol) è stato sciolto con il pentafluorofenolo (1.1 g, 6.0 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL). In seguito all'aggiunta di idrocloruro N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etil-carbodiimmide (EDC, 1.15 g, 6.0 mmol) la miscela viene lasciata ad agitare sotto ghiaccio inizialmente e poi a temperatura ambiente, in atmosfera controllata di  $\text{N}_2$  per 12 ore. La soluzione organica viene estratta con acqua (3 x 20 mL) e anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Dopo evaporazione del solvente il crudo di reazione viene purificato attraverso cromatografia flash (gel di silice, eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Etere di petrolio 5:5).

Si ottengono 1.1 mg (60%) di **I** sotto forma di olio giallo.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$ : 2.82 (t, 2H, 7 Hz), 2.62 (t, 2H, 7 Hz), 2.27 (s, 3H), 1.72 (qn, 2H, 7 Hz), 1.54 (qn, 2H, 7 Hz), 1.34 (m, 6H).

#### **7-{{2-[2-(2-metossietossi)etossi]etil}carbamil}eptil etantolato (III).**

8-tioacetil pentafluorofenilottanoato (**I**) (0.56 mg, 1.46 mmol) è stato sciolto con 2-(2-(2-metossietossi)etossi)etanamina<sup>94</sup> (0.29 mg, 1.75 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), è, quindi stata aggiunta della N,N-diisopropiletilammina (DIPEA, 0.23 g, 1.75 mmol) e posto a riflusso per 24 ore sotto  $\text{N}_2$ . Dopo l'evaporazione del solvente, il crudo di reazione è stato purificato attraverso cromatografia flash (gel di silice, eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Etile acetato 90:5).

Si ottengono 0.40 mg (75%) di **III**.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.02 (br, 1 H); 3.67–3.50 (m, 10 H); 3.44 (m, 2 H); 3.39 (s, 3 H); 2.86 (t, 2 H,  $J \sim 7.25$ ); 2.32 (s, 3 H); 2.17 (t, 2 H,  $J \sim 8.0$ ); 1.72–1.45 (m, 4 H); 1.45–1.2 (m, 6 H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $^1\text{H}$ ) (62.90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 195.94, 173.07, 71.83, 70.40, 70.36, 70.06, 69.85, 58.93, 39.01, 36.50, 30.55, 29.35, 29.03, 28.98, 28.73, 28.51, 25.52.

ESI-MS (1 mg  $\text{ml}^{-1}$ , MeOH)  $m/z$ : 385 (100, M + Na).

#### **N-1-{2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}-8-sulfanilottanammide (1) TEG-Ammide.**

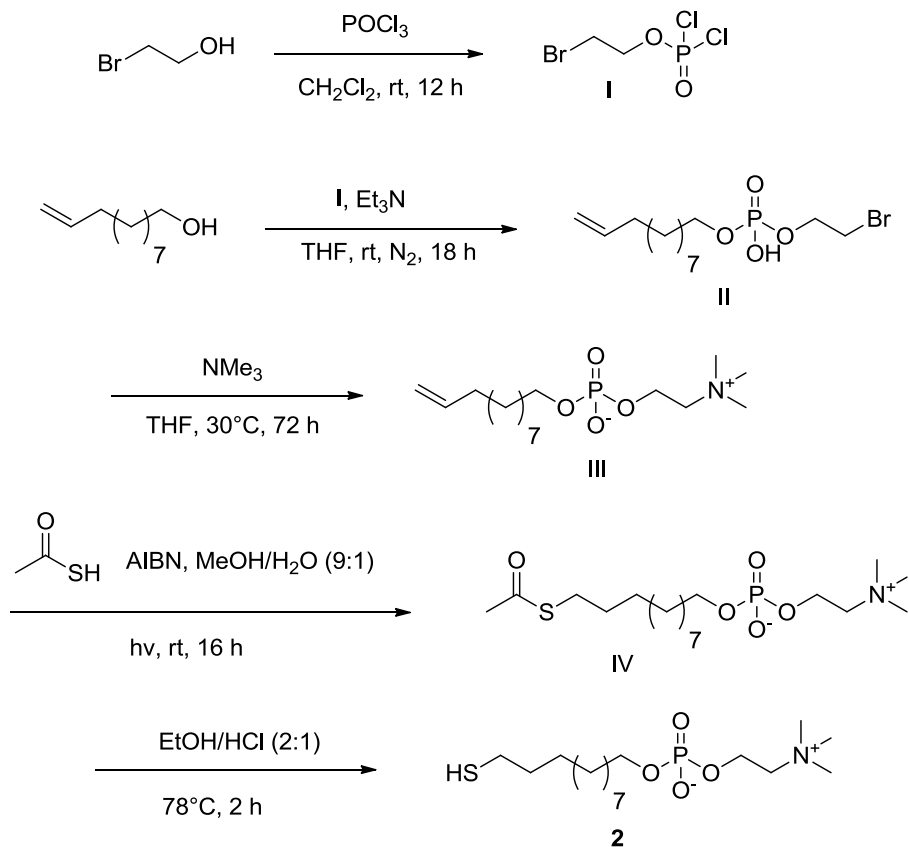
0.043 g (0.118 mmol) di **III** viene sciolto in etanolo (2.0 mL), viene aggiunto HCl 6 M (2.0 mL) e la soluzione viene lasciata agitare a 78°C per circa 2 ore. Il solvente viene, quindi, evaporato.

Si ottengono 0.036 g (95%) di **1** sotto forma di un olio leggermente giallo.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6,02 (br, 1 H); 3.67–3.50 (m, 10 H); 3.44 (m, 2 H); 3.39 (s, 3 H); 2,51 (m, 2 H); 2.17 (t, 2 H,  $J \sim 8.0$ ); 1.72–1.45 (m, 4 H); 1.45–1.20 (m, 6 H).

✓ **Sintesi e caratterizzazione del tiolo 2 Fosforilcolina (ZW)**

La sintesi del tiolo **2** Fosforilcolina è stata eseguita seguendo lo schema riportato:



**2-bromoetil fosforodidclorato (I).**

Bromoetano (10.0 g, 80 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia, per un periodo di 5 minuti a temperatura ambiente, ad una soluzione di  $\text{POCl}_3$  (22.0 g, 144 mmol) in diclorometano (6 mL). La miscela di reazione viene lasciata agitare per 12 h e poi viene aggiunto toluene (10 mL). Si ottiene un olio incolore dopo l'evaporazione dell'eccesso di  $\text{POCl}_3$  e solvente. Il prodotto viene utilizzato per lo step successivo senza procedere ad ulteriori purificazioni.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$ : 4.61-4.52 (m, 2H), 3.60 (t, 2H).

**2-bromoetil 10-undecen-1-il idrogeno fosfato (II).**

Una soluzione di 10-undecen-1-olo (5.1 g, 30 mmol) e trietilammina (4.54 g, 45 mmol) è stata sciolta in THF (120 mL) e aggiunta lentamente a una soluzione di I (10.9 g, 45 mmol) in THF (80 mL) a temperatura ambiente. Dopo aver lasciato ad agitare per 24 h, è stato aggiunto toluene (300 mL) per far precipitare il sale trietilammonio cloruro. La soluzione è stata filtrata e il solvente è stato evaporato. L'olio residuo è stato nuovamente sciolto in THF (600 mL) e 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> (600 mL) e posto ad agitare per 24 h. La soluzione è quindi stata acidificata (pH ~3) con una soluzione di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrato, si è ottenuto un solido bianco che è stato estratto con etere etilico (5 × 300 mL). La fase organica è quindi stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata ed evaporata. Si è ottenuto un olio (10.8 g), che è risultato sufficientemente puro da non subire ulteriori purificazioni.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) δ: 5.81-5.68 (m, 1H), 4.97-4.86 (m, 2H), 4.27-4.19 (q, 2H), 4.05-3.96 (q, 2H), 3.48 (t, 2H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.31-1.29 (s, 14 H).

**2-(trimetilammonio)etil undec-10-en-1-il fosfato (III).**

Una soluzione di trimetilammina (75 mL; 33% in etanolo) è stata aggiunta ad una soluzione del composto III in THF anidro (250 mL) e lasciata ad agitare in un pallone chiuso a 30°C per 72 h. La trimetilammina è, quindi, stata rimossa dalla miscela di reazione per evaporazione sotto flusso di N<sub>2</sub>. Il crudo di reazione si presenta come un solido bianco che è stato purificato attraverso cromatografia flash (gel di silice, eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:4).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) δ: 5.85-5.75 (m, 1H), 5.02-4.90 (m, 2H), 4.28 (br.s., 2H), 3.85-3.77 (m, 4H), 3.42 (s, 9H), 2.06-1.98 (m, 2H), 1.60-1.55 (m, 2H), 1.38-1.25 (s, 14 H).

ESI-MS *m/z*: 336.3 (M+H)<sup>+</sup>, 358.1 (M+Na)<sup>+</sup>.

**11-(tioacetil)undecil (2-(trimetilammonio)etil)fosfato (IV).**

Una soluzione di III (1.4 g, 4.18 mmol), acido tioacetico (5.0 mL), AIBN (0.14 g, 0.82 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1; 7 mL) è stata posta ad agitare sotto flusso di N<sub>2</sub> e lasciata ad irradiare con fotoreattore UV (500 w) per 5 h e poi per una notte a temperatura ambiente. Un solido bianco cristallino è stato rimosso per filtrazione e la soluzione è

stata diluita con etere etilico (400 mL). Un solido bianco ha iniziato a precipitare. Al termine della precipitazione si è ottenuto un solido bianco cristallino (1.5 g, 87%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$ : 4.26 (br.s., 4H), 4.16-4.13 (m, 4H), 3.38 (s, 9H), 2.83 (t, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.55-1.50 (m, 4H), 1.22 (s, 14 H)

ESI-MS  $m/z$ : 412.3 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### **11-mercaptoundecil (2-(trimetilammonio)etil)fosfato (2) Fosforilcolina ZW.**

0.025 g (0.060 mmol) di **IV** viene sciolto in etanolo (2.0 mL), viene aggiunto HCl 6 M (2.0 mL) e la soluzione viene lasciata agitare a 78°C per circa 2 ore. Il solvente viene, quindi, evaporato.

Si ottengono 0.021 g (95%) di **1** sotto forma di un solido bianco.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$ : 4.55-4.48 (m, 2H), 3.96-3.91 (m, 4H), 3.37 (s, 9H), 2.43 (t, 2H), 1.58-1.46 (m, 4H), 1.28-1.25 (s, 14H).

ESI-MS  $m/z$ : 370.0 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 392.0 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

#### **✓ Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro (AuNp).**

La sintesi delle nanoparticelle d'oro è preparata in accordo con la procedura a due fasi precedentemente indicata.<sup>95</sup> Tutta la vetreria da laboratorio è precedentemente e accuratamente lavata con acqua regia per eliminare eventuali siti di nucleazione per l'oro.  $\text{HAuCl}_4$  è un sale altamente igroscopico, per questo si è deciso di procedere effettuando delle soluzioni stock in acqua MilliQ che vengono conservate in freezer. Una soluzione di  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0.050 g, 0.127 mmol) in acqua viene estratta con una soluzione di tetraottilammonio bromuro (0.278 g, 0.508 mmol) in toluene (125 mL divise in 3 porzioni) precedentemente lasciata a degasare per 15 minuti. Alla soluzione arancione ottenuta si aggiunge la diottilammina (0.767 mL, 2.539 mmol), calcolata in modo da ottenere nanoparticelle d'oro di 2 nm di diametro.

La miscela di reazione viene lasciata sotto  $\text{N}_2$  in vigorosa agitazione per 30 minuti. Durante questo periodo di tempo la soluzione diventa incolore. Si aggiunge, quindi, rapidamente una soluzione di  $\text{NaBH}_4$  (0.048 g, 1.27 mmol) in acqua (1 mL). Il colore della soluzione vira rapidamente al marrone molto scuro indicando la formazione delle nanoparticelle. Dopo due ore viene rimossa l'acqua e si aggiunge alle nanoparticelle il tiolo desiderato sciolto in 2 mL di isopropanolo.

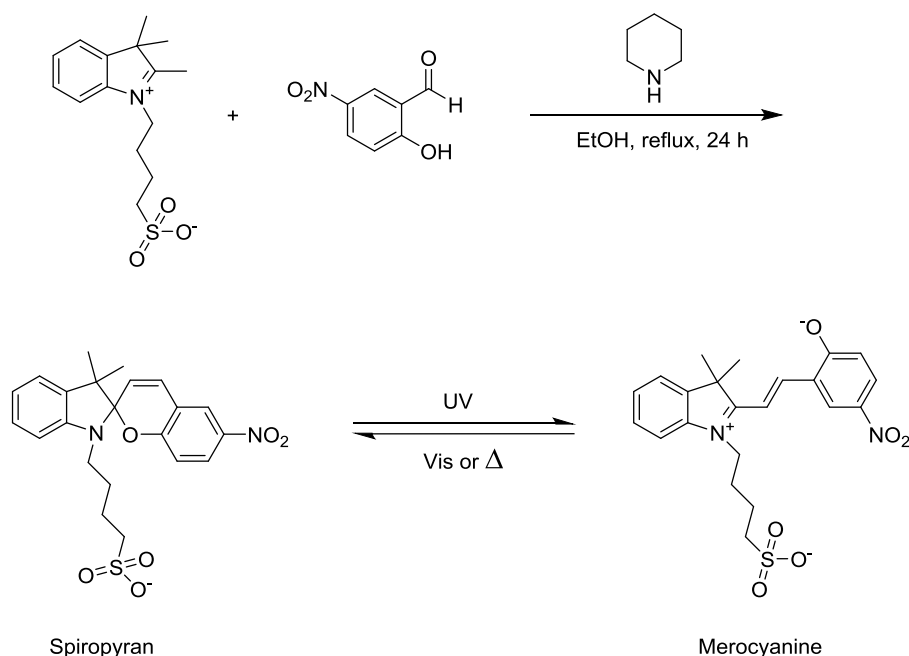


Si ottengono nanoparticelle di  $1.8 \pm 0.4$  nm con una formula media di  $\text{Au}_{180}\text{SR}_{70}$ .

Le nanoparticelle solubili in acqua: AuNp **1** TEG-Amide, **2** Fosforilcolina, **9** Ammonio, **10** Piridinio vengono purificate mediante centrifugazione con etile acetato e Sephadex G25, mentre quelle solubili in solventi clorurati: AuNp **3** TEG-AmideLong, vengono purificate per triturazione con etanolo e etere etilico ed eventualmente con resina Biorad Bio-Beads S-X1.

### ✓ Sintesi e caratterizzazione dello Spiropirano/Merocianina 22/23

La sintesi dello spiropirano **22** è stata eseguita seguendo lo schema riportato:



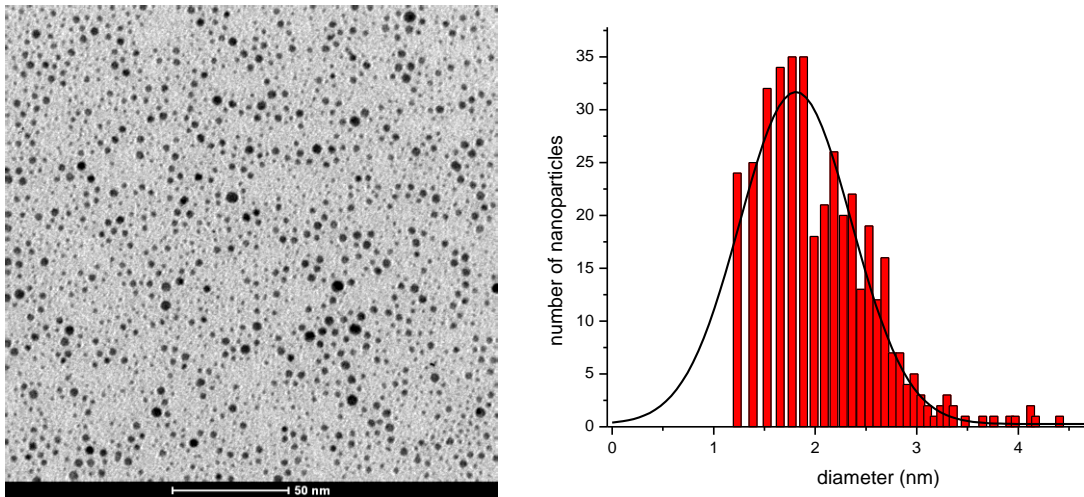
0.050 g (0.169 mmol) di indolina è stato sciolto in etanolo (20 mL) con 0.028 g (0.169 mmol) di aldeide nitrosalicilica e 1.84  $\mu\text{L}$  (0.019 mmol) di piperidina, la miscela è stata lasciata a riflusso inizialmente per 5 ore, quindi, è stata addizionata altra aldeide nitrosalicilica 0.014 g (0.085 mmol) e altra piperidina 1.84  $\mu\text{L}$  (0.019 mmol) e lasciata a riflusso tutta la notte.

Il crudo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash (gel di silice, eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1).

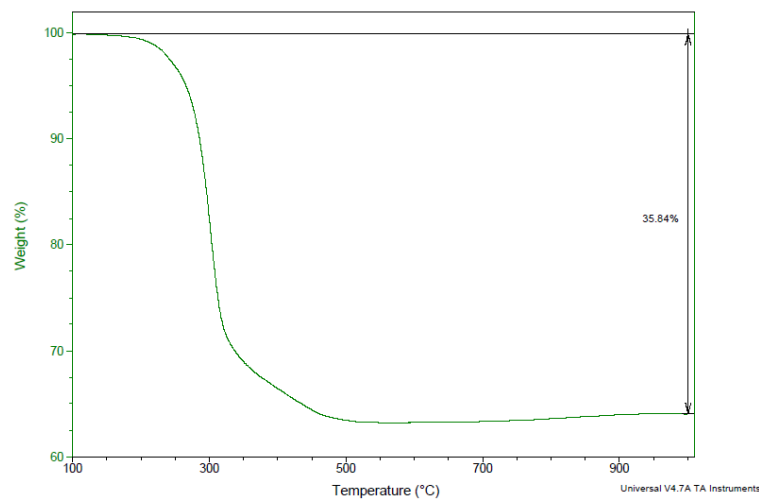
Si sono ottenuti 0.028 mg (38%) di un solido color porpora.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 8.125 (d, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.12 (t, 1H), 7.08 (d, 2H), 6.80 (d, 1H), 6.76 (t, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.01 (d, 1H), 3.42 (q, 2H), 3.08 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.03 (t, 4H).

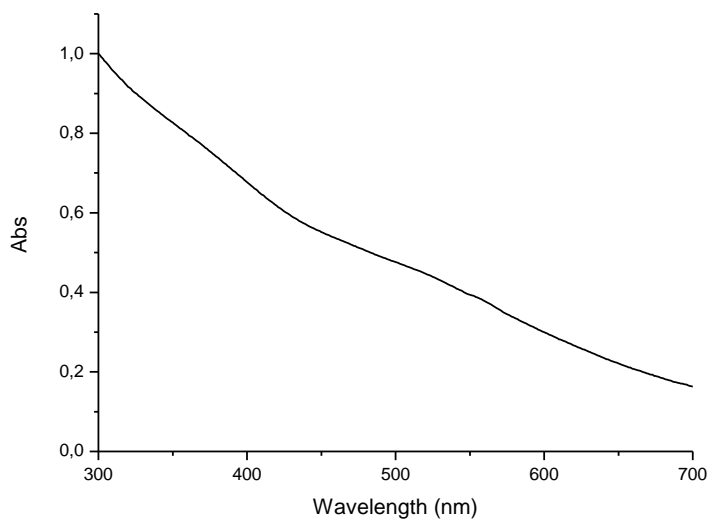
✓ **Caratterizzazione delle nanoparticelle 1 TEG-Amide**



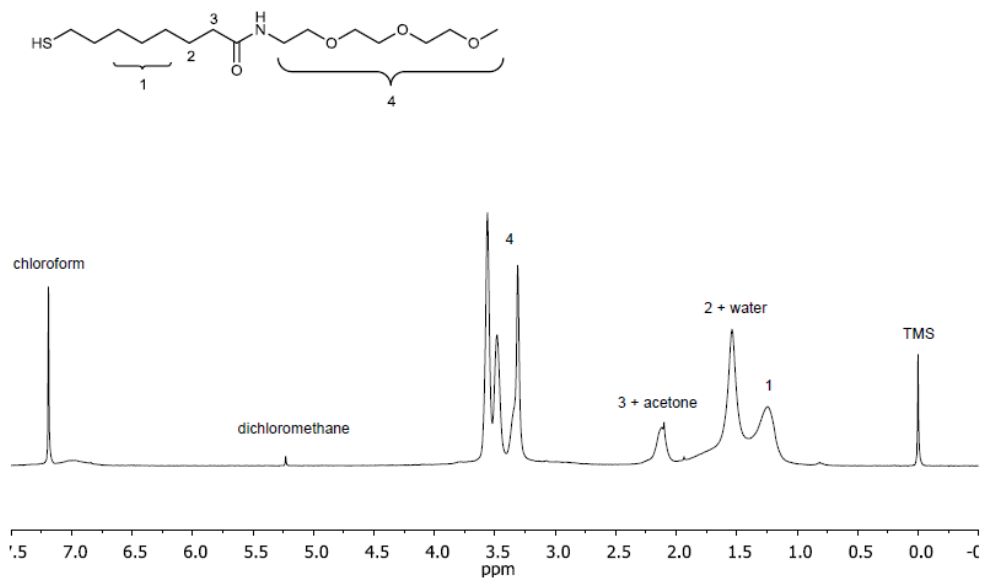
**Figura 4.1:** Immagine TEM delle nanoparticelle 1 TEG-Amide e grafico della distribuzione media dei diametri; diametro medio:  $1.8 \pm 0.5$  nm.



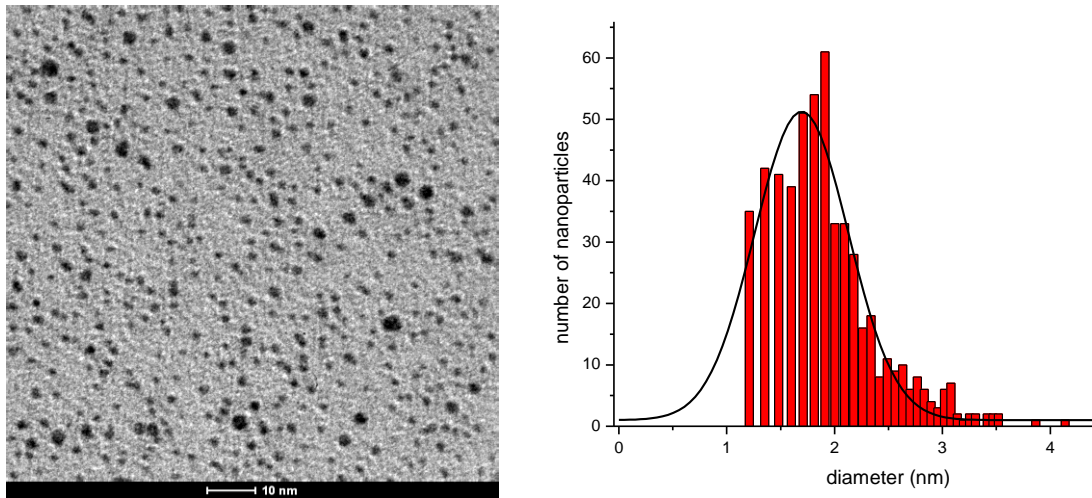
**Figura 4.1:** Analisi TGA delle nanoparticelle 1 TEG-Amide, campione acquisito in aria.



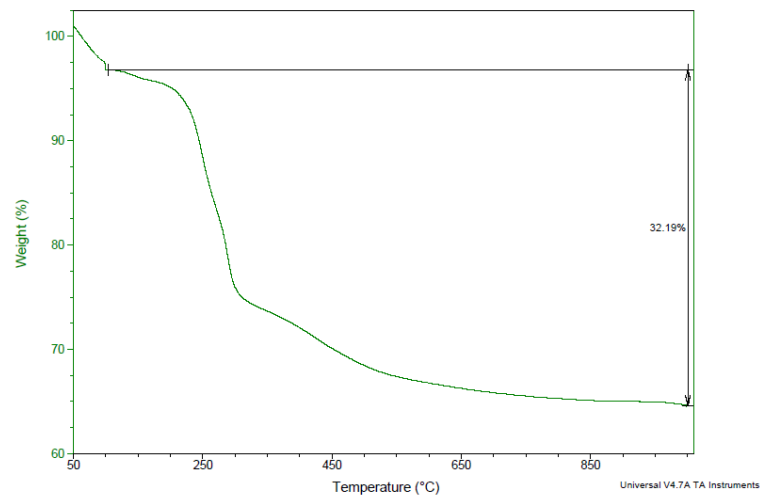
**Figura 4.1:** Spettro UV-Vis di un campione di nanoparticelle **1** TEG-Amide (0.1 mg/mL) a 25°C in acqua.



**Figura 4.1:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di un campione di nanoparticelle **1** TEG-Amide in  $\text{CDCl}_3$ .

✓ Caratterizzazione delle nanoparticelle 2 Fosforilcolina

**Figura 4.1:** Immagine TEM delle nanoparticelle **2** Fosforilcolina e grafico della distribuzione media dei diametri; diametro medio:  $1.7 \pm 0.4$  nm



**Figura 4.1:** Analisi TGA delle nanoparticelle **2** Fosforilcolina, campione acquisito in aria.

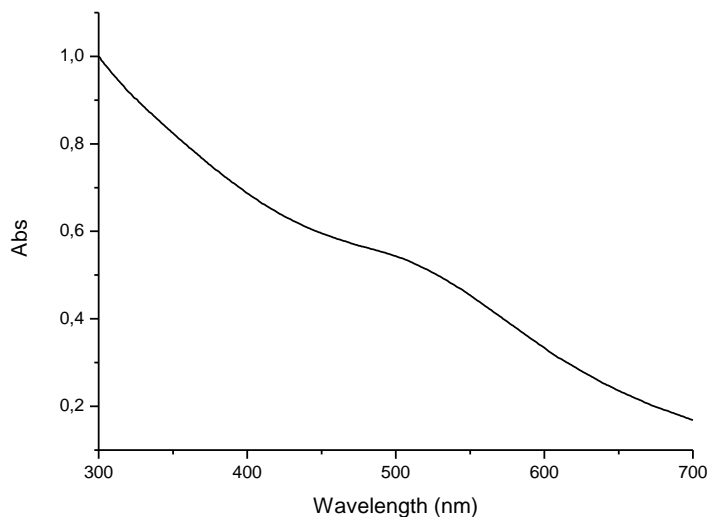


Figura 4.1: Spettro UV-Vis di un campione di nanoparticelle **2** Fosforilcolina (0.1 mg/mL) a 25°C in acqua.

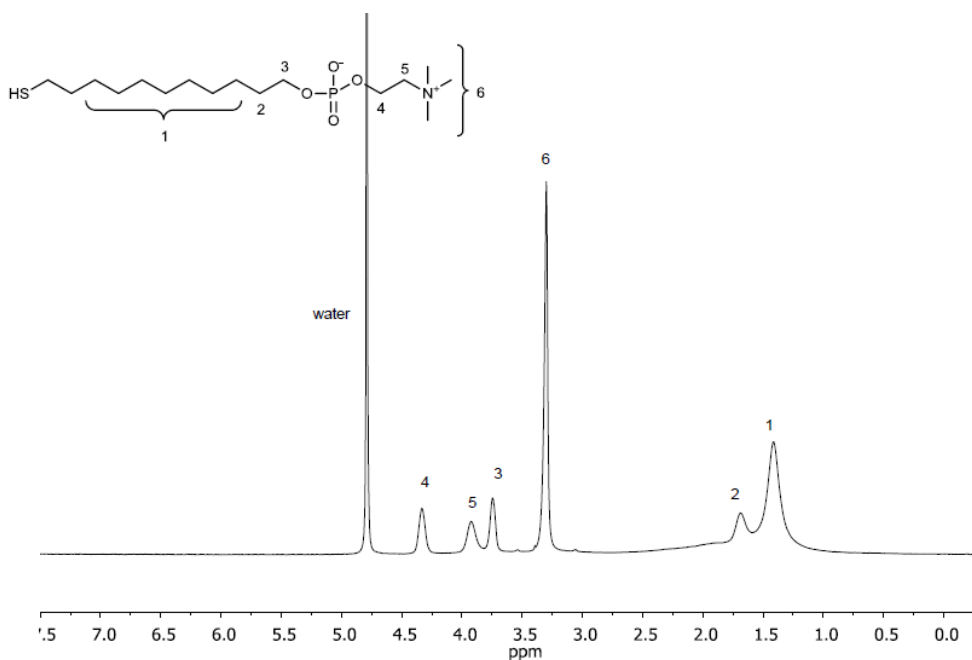
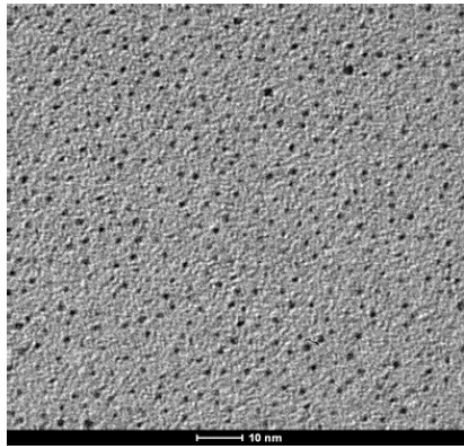


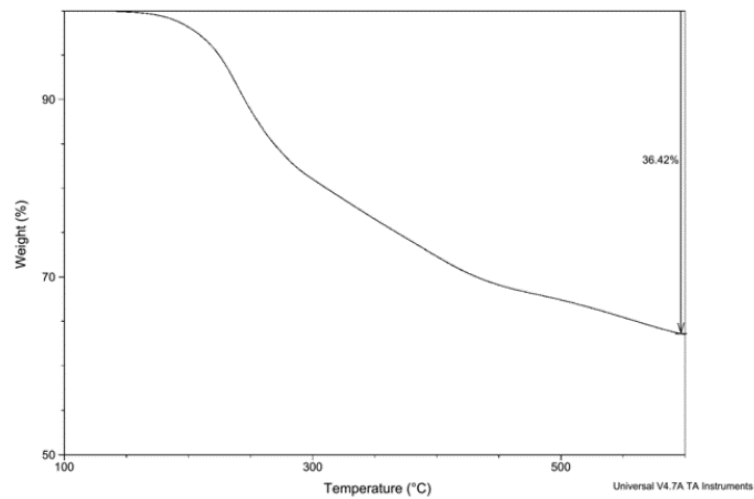
Figura 4.1: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di un campione di nanoparticelle **2** Fosforilcolina in  $\text{D}_2\text{O}$ .

✓ **Caratterizzazione delle nanoparticelle 9 Ammonio**

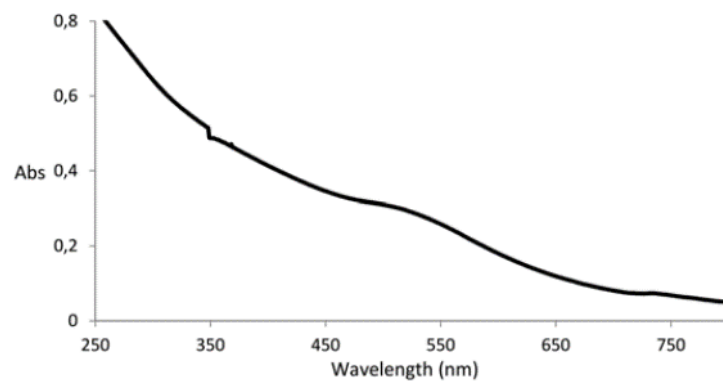
L'analisi delle immagini TEM del campione di nanoparticelle **9** Ammonio ha rilevato un diametro medio di  $1.6 \pm 0.2$  nm.



**Figura 4.1:** Immagine TEM delle nanoparticelle 9 Ammonio.



**Figura 4.1:** Analisi TGA delle nanoparticelle 9 Ammonio, campione acquisito in aria.



**Figura 4.1:** Spettro UV-Vis di un campione di nanoparticelle 9 Ammonio (0.1 mg/mL) a 25°C in acqua.

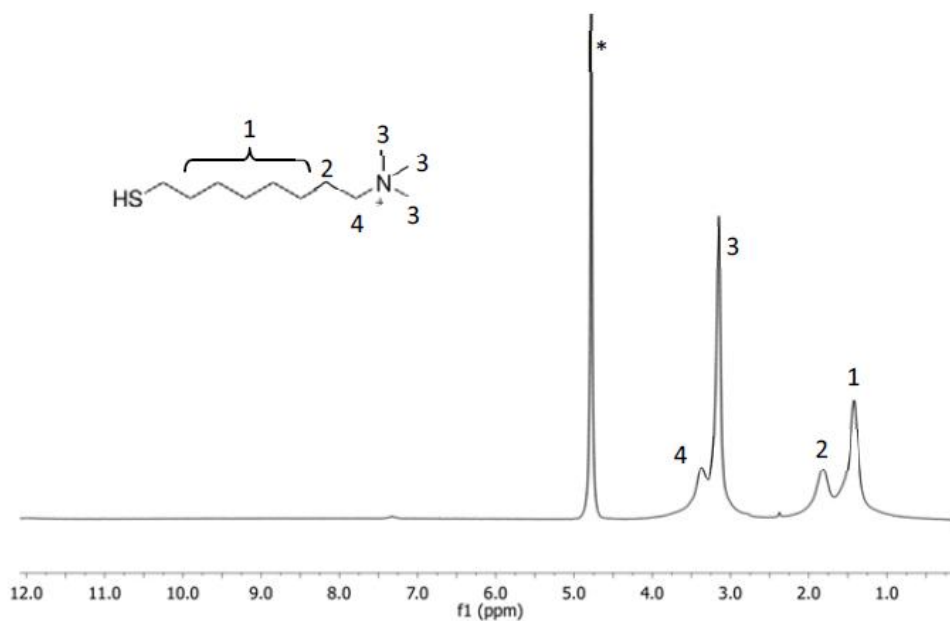


Figura 4.1: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di un campione di nanoparticelle **9** Ammonio in  $^*\text{D}_2\text{O}$ .

✓ **Caratterizzazione delle nanoparticelle 10 Piridinio**

L'analisi delle immagini TEM del campione di nanoparticelle **10** Piridinio ha rilevato un diametro medio di  $1.6 \pm 0.2$  nm.

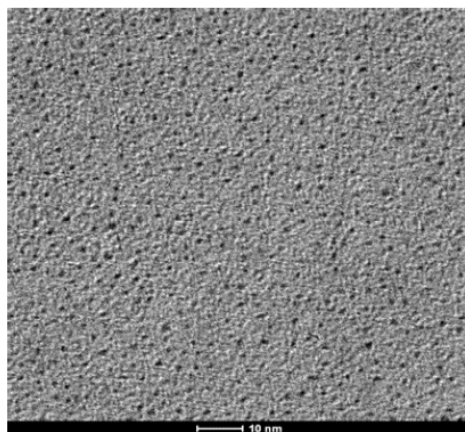


Figura 4.1: Immagine TEM delle nanoparticelle **10** Piridinio.

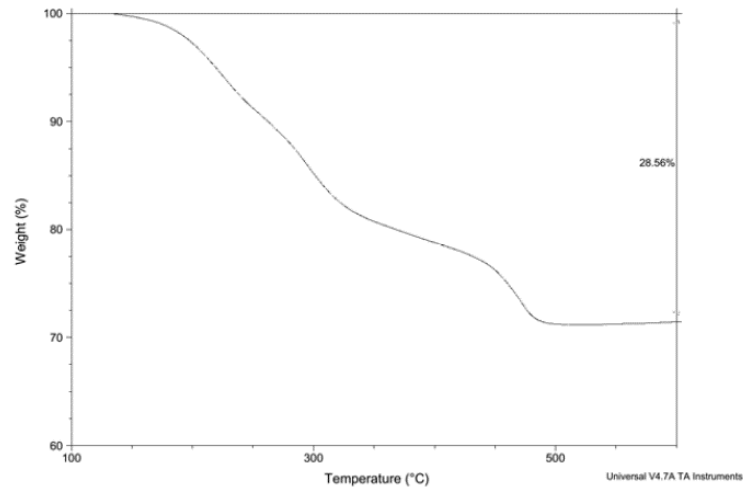


Figura 4.1: Analisi TGA delle nanoparticelle **10** Piridinio, campione acquisito in aria.

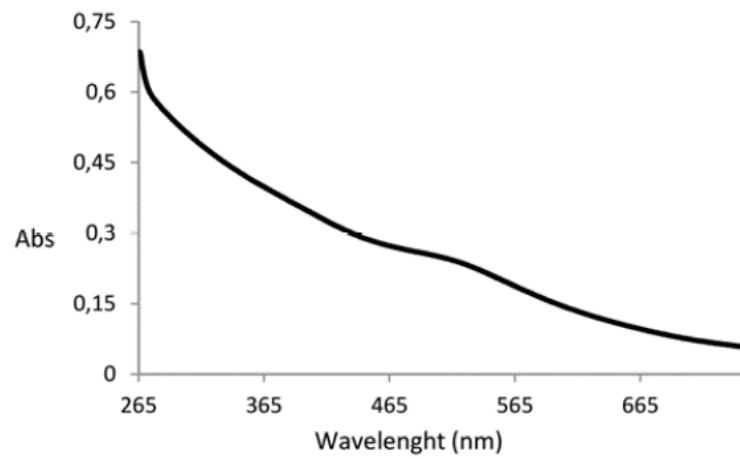


Figura 4.1: Spettro UV-Vis di un campione di nanoparticelle **10** Piridinio (0.1 mg/mL) a 25°C in acqua.

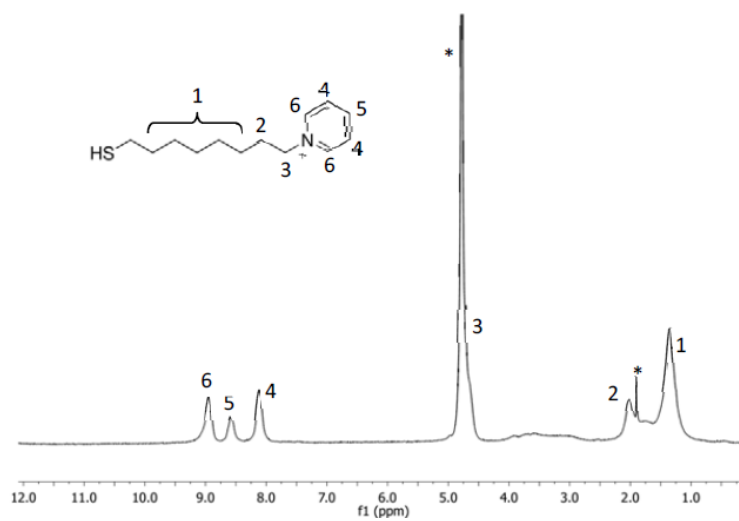


Figura 4.1: Spettro <sup>1</sup>H-NMR di un campione di nanoparticelle **10** Piridinio in \*D<sub>2</sub>O.



## 5. Bibliografia

---

- (1) Binghe Wang, E. V. A. *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*; JOHN WILEY & SONS, INC.: Hoboken, New Jersey, 2011; Vol. 15.
- (2) Czarnik, A. W. In *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*; Czarnik, A. W., Ed. 1993; Vol. 538, p 1.
- (3) Jonathan W. Steed, J. L. A. *Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- (4) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 1515.
- (5) Xu, Z.; Chen, X.; Kim, H. N.; Yoon, J. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 127.
- (6) Oton, F.; Tarraga, A.; Espinosa, A.; Velasco, M. D.; Molina, P. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 4590.
- (7) McRae, R.; Bagchi, P.; Sumalekshmy, S.; Fahrni, C. J. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 4780.
- (8) de Silva, A. P.; de Silva, S. A. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1986**, 1709.



- (9) Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *Nano Today* **2007**, *2*, 18.
- (10) Huang, T.; Murray, R. W. *Langmuir* **2002**, *18*, 7077.
- (11) Huang, C.-C.; Chang, H.-T. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 8332.
- (12) Chen, S.-J.; Chang, H.-T. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 3727.
- (13) Zhang, N.; Liu, Y.; Tong, L.; Xu, K.; Zhuo, L.; Tang, B. *Analyst* **2008**, *133*, 1176.
- (14) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. *Nat Biotech* **2001**, *19*, 365.
- (15) Niemeyer, C. M. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 4128.
- (16) Maxwell, D. J.; Taylor, J. R.; Nie, S. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 9606.
- (17) West, J. L.; Halas, N. J. *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, *11*, 215.
- (18) You, C.-C.; Miranda, O. R.; Gider, B.; Ghosh, P. S.; Kim, I.-B.; Erdogan, B.; Krovi, S. A.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. *Nat Nano* **2007**, *2*, 318.
- (19) Phillips, R. L.; Miranda, O. R.; You, C.-C.; Rotello, V. M.; Bunz, U. H. F. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2590.
- (20) Bajaj, A.; Miranda, O. R.; Kim, I.-B.; Phillips, R. L.; Jerry, D. J.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 10912.
- (21) De, M.; Rana, S.; Akpınar, H.; Miranda, O. R.; Arvizo, R. R.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. *Nature chemistry* **2009**, *1*, 461.
- (22) Niu, H.-T.; Jiang, X.; He, J.; Cheng, J.-P. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 6521.
- (23) Su, K. H.; Wei, Q. H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. *Nano Letters* **2003**, *3*, 1087.
- (24) Kim, Y.; Johnson, R. C.; Hupp, J. T. *Nano Letters* **2001**, *1*, 165.
- (25) Huang, C.-C.; Chang, H.-T. *Chemical Communications* **2007**, 1215.
- (26) Lee, J.-S.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 4093.
- (27) Lee, J.-S.; Ulmann, P. A.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. *Nano Letters* **2008**, *8*, 529.
- (28) Liu, J.; Lu, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6642.
- (29) Liu, J.; Lu, Y. *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 3231.
- (30) Liu, J.; Lu, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 12298.
- (31) Liu, J.; Lu, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12677.
- (32) Bunka, D. H. J.; Stockley, P. G. *Nat Rev Micro* **2006**, *4*, 588.

- (33) Pavlov, V.; Xiao, Y.; Shlyahovsky, B.; Willner, I. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 11768.
- (34) Liu, J.; Lu, Y. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 90.
- (35) Liu, J.; Lu, Y. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 1667.
- (36) Liu, J.; Mazumdar, D.; Lu, Y. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7955.
- (37) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, *382*, 607.
- (38) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078.
- (39) Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 1959.
- (40) Feldkamp, U.; Niemeyer, C. M. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1856.
- (41) Reynolds, R. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 3795.
- (42) Han, M. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 4954.
- (43) Brust, M.; Schiffrin, D. J.; Bethell, D.; Kiely, C. J. *Advanced Materials* **1995**, *7*, 795.
- (44) You, C.-C.; Arvizo, R. R.; Rotello, V. M. *Chemical Communications* **2006**, 2905.
- (45) Guarise, C.; Pasquato, L.; De Filippis, V.; Scrimin, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 3978.
- (46) Laromaine, A.; Koh, L.; Murugesan, M.; Ulijn, R. V.; Stevens, M. M. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 4156.
- (47) Wang, Z.; Lévy, R.; Fernig, D. G.; Brust, M. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2214.
- (48) Choi, Y.; Ho, N.-H.; Tung, C.-H. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 707.
- (49) Chah, S.; Hammond, M. R.; Zare, R. N. *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 323.
- (50) Farnoush Faridbod, V. K. G. a. H. A. Z. *International Journal of Electrochemistry* **2011**, *2011*, 2.
- (51) Katz, E.; Willner, I.; Wang, J. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 19.



- (52) Yu, A.; Liang, Z.; Cho, J.; Caruso, F. *Nano Letters* **2003**, *3*, 1203.
- (53) Guo, S.; Wang, E. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *598*, 181.
- (54) Lahav, M.; N. Shipway, A.; Willner, I. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1999**, 1925.
- (55) Lahav, M.; Gabai, R.; N. Shipway, A.; Willner, I. *Chemical Communications* **1999**, 1937.
- (56) Blonder, R.; Sheeney, L. *Chemical Communications* **1998**, 1393.
- (57) Shipway, A. N.; Lahav, M.; Blonder, R.; Willner, I. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 13.
- (58) Thompson, D. T. *Nano Today* **2007**, *2*, 40.
- (59) Ding, L.; Hao, C.; Xue, Y.; Ju, H. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1341.
- (60) Kurniawan, F.; Tsakova, V.; Mirsky, V. M. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1937.
- (61) Wang, J.; Wang, F.; Zou, X.; Xu, Z.; Dong, S. *Electrochemistry Communications* **2007**, *9*, 343.
- (62) Raj, C. R.; Okajima, T.; Ohsaka, T. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *543*, 127.
- (63) Roy, P. R.; Okajima, T.; Ohsaka, T. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *561*, 75.
- (64) Wang, L.; Bai, J.; Huang, P.; Wang, H.; Zhang, L.; Zhao, Y. *Electrochemistry Communications* **2006**, *8*, 1035.
- (65) Li, W.-h.; Fraser, S. E.; Meade, T. J. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1413.
- (66) Que, E. L.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 1517.
- (67) Odom, J. D.; Ellis, P. D.; Walsh, H. C. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 3529.
- (68) Gamsey, S.; Baxter, N. A.; Sharrett, Z.; Cordes, D. B.; Olmstead, M. M.; Wessling, R. A.; Singaram, B. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6321.
- (69) Zhao, Y.; Swager, T. M. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 18770.
- (70) Zhao, Y.; Markopoulos, G.; Swager, T. M. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 10683.
- (71) Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258.

- (72) Salvia, M.-V.; Salassa, G.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *Journal of the American Chemical Society* **2015**.
- (73) Perrone, B.; Springhetti, S.; Ramadori, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11768.
- (74) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Gentilini, C.; Polizzi, S.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 16384.
- (75) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9326.
- (76) DeFeo, E. M.; Wu, C.-L.; McDougal, W. S.; Cheng, L. L. *Nat Rev Urol* **2011**, *8*, 301.
- (77) Macpherson, C. R.; Milne, M. D.; Evans, B. M. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1955**, *10*, 484.
- (78) Manea, F.; Houillon, F. B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 6165.
- (79) Bonomi, R.; Selvestrel, F.; Lombardo, V.; Sissi, C.; Polizzi, S.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Scrimin, P. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 15744.
- (80) Pieters, G.; Pezzato, C.; Prins, L. J. *Langmuir* **2013**, *29*, 7180.
- (81) James, T. L.; McDonald, G. G. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1973**, *11*, 58.
- (82) Wilkinson, A. D. M. a. A. *Blackwell Scientific Publications* **1997**.
- (83) Hahn, E. L. *Physical Review* **1950**, *80*, 580.
- (84) Lapresta-Fernandez, A.; Cywinski, P. J.; Moro, A. J.; Mohr, G. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1821.
- (85) Lenik, J.; Wardak, C.; Marczevska, B. *Cent. Eur. J. Chem* **2008**, *6*, 513.
- (86) Marquez, D. T.; Carrillo, A. I.; Scaiano, J. C. *Langmuir* **2013**, *29*, 10521.
- (87) Chen, A.; Shapiro, M. J. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 669A.
- (88) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 1809.
- (89) Fihey, A.; Perrier, A.; Browne, W. R.; Jacquemin, D. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 3719.
- (90) Klajn, R. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 148.
- (91) Fischer, E.; Hirshberg, Y. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1952**, 4522.



- (92) Shiraishi, Y.; Itoh, M.; Hirai, T. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 13737.
- (93) Kitamura, M.; Suzuki, T.; Abe, R.; Ueno, T.; Aoki, S. *Inorganic Chemistry* 2011, *50*, 11568.
- (94) Pengo, P.; Polizzi, S.; Battagliarin, M.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Journal of Materials Chemistry* 2003, *13*, 2471.
- (95) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* 2008, *24*, 4120.





# “NMR Chemosensing” Using Monolayer-Protected Nanoparticles as Receptors

Barbara Perrone, Sara Springhetti, Federico Ramadori, Federico Rastrelli,\* and Fabrizio Mancin\*

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova, via Marzolo 1, 35131 Padova, Italy

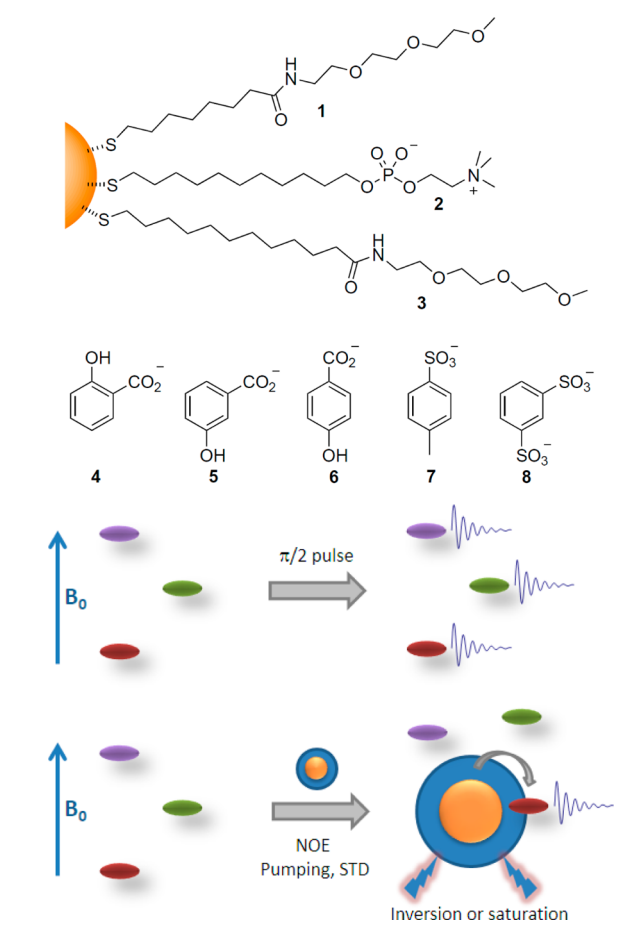
**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** A new sensing protocol based on NMR magnetization transfer sequences and the molecular recognition abilities of nanoparticles allows the detection and identification of organic molecules in complex mixtures.

According to its definition, a chemosensor is “a molecule of abiotic origin that signals the presence of matter or energy”.<sup>1</sup> This concept has been commonly translated into a supramolecular receptor that, upon selective binding (recognition) of its target (analyte), undergoes a measurable change in its properties.<sup>2</sup> Such a change, properly monitored, reveals the presence of the analyte in the sample under investigation. Typical molecular properties used for signal generation include luminescence,<sup>3</sup> absorbance,<sup>4</sup> redox potential,<sup>5</sup> relaxivity,<sup>6</sup> and many others. Although several advantages justify the widespread interest in chemosensors, one intrinsic limitation of such an approach is that the reliability of a chemosensor response depends crucially on its selectivity. Indeed, the signal produced arises from a property of the chemosensor itself and therefore does not provide any direct information on the identity of the analyte detected. The user must presume that he is measuring the presence of the desired target rather than a known or unknown interferent because he trusts the recognition ability of the chemosensor. Indeed, the design of new sensing schemes that allow for direct individuation of the target in complex environments represent a major challenge. Our interest in understanding the structure and properties of monolayer-protected gold nanoparticles, particularly using new tools based on NMR spectroscopy,<sup>7</sup> led us to the development of a new sensing protocol that also allows analyte identification and quantification in complex mixtures. Moreover, the results reported here also address the more classic but still actual problem of realizing systems that can detect organic molecules in water, where most receptors fail in efficiently recognizing their targets.

As a test mixture, we selected a group of three water-soluble aromatic compounds with similar sizes and features, namely, sodium salicylate (4), sodium *p*-toluenesulfonate (7), and disodium benzene-1,3-disulfonate (8) (Chart 1). The identification of the single components from a <sup>1</sup>H NMR spectrum of this fairly simple mixture (Figure 1a) is not trivial at all, and this is a well-known drawback that heavily limits its usefulness in the case of complex mixtures. However, when we mixed the same sample with gold nanoparticles (2 nm gold core diameter) protected with thiol 1 (Chart 1), we were able to extract just

**Chart 1. (top) Nanoparticle-Coating Thiols and Analytes Used in This Work; (bottom) Working Scheme for Nanoparticle-Based NMR Sensing with NOE Pumping Experiments**

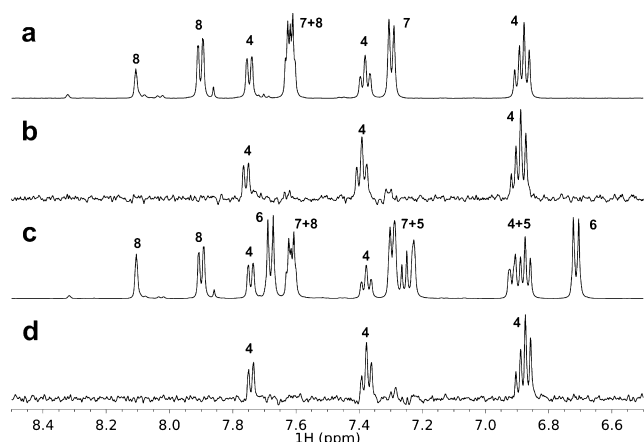


those signals arising from salicylate by means of diffusion-assisted nuclear Overhauser effect (NOE) experiments (NOE pumping; Figure 1b).<sup>8</sup>

In designing this experiment, we had in mind two starting points. First, it is well-known that water-soluble monolayer-protected gold nanoparticles can incorporate hydrophobic molecules in the protecting monolayer.<sup>10</sup> Second, several NMR experiments have been devised to identify compounds with

Received: July 1, 2013

Published: July 26, 2013

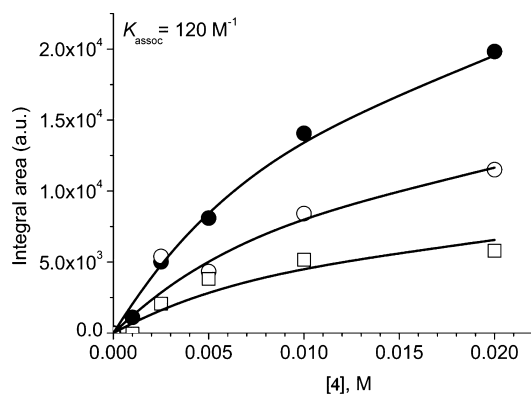


**Figure 1.** (a)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of a mixture of molecules **4**, **7**, and **8** (7 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ ). (b) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of **1**-coated gold nanoparticles (70  $\mu\text{M}$ ). (c)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of a mixture of molecules **4**–**8** (7 mM in 100 mM carbonate buffer, pH 10).<sup>9</sup> (d) NOE-pumping subspectrum of the sample from (c) in the presence of **1**-coated gold nanoparticles (70  $\mu\text{M}$ ).

binding affinity to proteins and other biomacromolecules on the basis of the transfer of net magnetization (or saturation) from large systems to small bound molecules.<sup>8,11</sup> Among these, the NOE-pumping experiment originally proposed by Shapiro<sup>8</sup> looked particularly suitable for our purposes. This experiment consists of two blocks: first, the signals of the small molecules in the sample are canceled (dephased) with a diffusion filter, and second, a NOE experiment is started immediately after. In this way, only the signals of the small molecules interacting with the macromolecule in the fast-exchange regime can be detected, as they arise from the magnetization transferred from the macromolecule, which survives the diffusion filter. Hence, in our experiment the nanoparticles can be considered as “self-organized” supramolecular receptors that recognize their substrate and label it by magnetization transfer, which in turn generates the detected response (Chart 1). It should be noted that the signal produced in this way does not arise from the chemosensor but from the analyte itself, and containing as much information as a NMR spectrum does, it allows not only the detection but also the unambiguous identification of the target.

The selectivity we found using this protocol is somehow surprising. NOE pumping of a water solution containing **1**-coated nanoparticles and the three isomers salicylate (**4**), 3-hydroxybenzoate (**5**), and 4-hydroxybenzoate (**6**), which differ only in the relative positions of the two functional groups, revealed the presence of solely the salicylate signals [see the Supporting Information (SI)]. This selectivity remained unaffected even when all of the compounds **4**–**8** so far studied were mixed together in a single tube with the nanoparticles. Again, only the salicylate signals emerged from the NOE-pumping experiment (Figure 1c,d), with a substantial simplification of the spectrum of the mixture and clear detection of the presence of salicylate in the sample.

It is important to note that besides selective detection, the method reported here also allows quantitative determination of the analyte. In a series of experiments performed with different concentrations of salicylate (Figure 2), we found that the integrals of the analyte signals increased according to a saturation profile, as expected for a binding process. Fitting



**Figure 2.** Relative areas of NMR signals of **4** (●, 6.8 ppm; ○, 7.4 ppm; □, 7.5 ppm) in the NOE-pumping experiment as functions of its concentration. Solid lines are best fits to the data. Conditions: [**1**-nanoparticles] = 70  $\mu\text{M}$ , 100 mM carbonate buffer, pH 10.

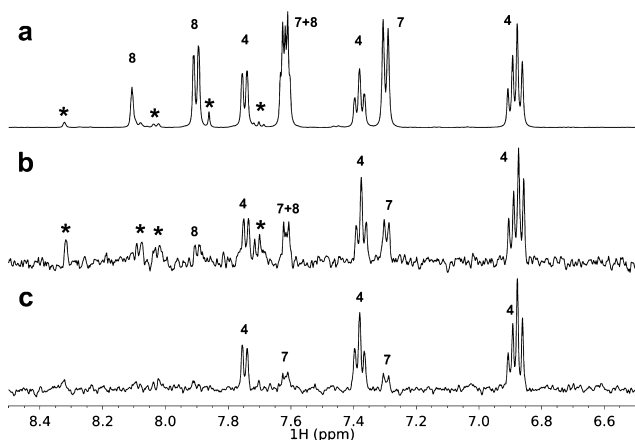
of the relative intensity data with a 1:1 binding model provided an apparent association constant ( $K_{\text{assoc}}$ ) of  $120 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ . This value is comparable to those reported by Pasquato and Lucarini<sup>10</sup> for the association of organic radicals to **1**-coated nanoparticles of similar size and confirms that analyte quantification, upon construction of a calibration curve, is possible with this method. In fact, recalculation of the concentration of salicylate in the independent experiment of Figure 1d using the parameters obtained from the fitting of the data in Figure 2 (see the SI) yielded a value of  $6.8 \pm 0.4 \text{ mM}$ , which is very close to the analytical value (7.0 mM). Under the conditions used (4 h acquisition, 70  $\mu\text{M}$  nanoparticle concentration), the experiment reported in Figure 2 also allowed a detection limit of 2.5 mM for sodium salicylate to be established.

The effective binding of salicylate to the nanoparticles was confirmed by selective NOE experiments (see the SI). Upon selective inversion of the nanoparticle resonances, we observed that the signals arising from salicylate displayed clear NOEs, confirming the direct interaction of the two species. The NOE intensities appeared to be larger when the signals relative to the alkyl chains of thiol **1** were inverted. This observation suggests that salicylate is probably localized in the inner, hydrophobic, region of the monolayer.

The remarkable selectivity obtained with **1**-coated nanoparticles should therefore arise from the different hydrophobicities of the five mixture components. As a matter of fact, computationally predicted *n*-octanol/water partition coefficients at pH 7.4 (logD) follow the order **4** ( $-1.14$ ) > **6** ( $-1.35$ )  $\approx$  **5** ( $-1.47$ ) > **7** ( $-2.57$ )  $\gg$  **8** ( $-7.14$ ),<sup>12</sup> with **4** being the most hydrophobic of the series. A similar correlation was obtained by submitting the mixture of the five compounds to HPLC separation using a C18 reversed-phase column (see the SI). Here, the order of elution times was: **8**  $\ll$  **7** < **6** < **5**  $\ll$  **4**. These observations indicate that the **1**-coated nanoparticles act as selective receptors for hydrophobic molecules, with a threshold that can be set at calculated logD (pH 7.4) values around  $-1.2$  or HPLC retention times around 9–10 min under the adopted conditions.

However, other structural parameters influence the recognition process. One of the main advantages brought about by the use of nanoparticles as detection agents is the ease of their modification. Indeed, the use of nanoparticles coated with a different thiol, namely, phosphorylcholine derivative **2**, led to a

different selectivity. When used to analyze the mixture of **4**, **7**, and **8** by NOE pumping, these nanoparticles were able to reveal the presence of not only **4** but also **7** and **8** as well as (with remarkable sensitivity) an impurity contained in the latter (Figure 3b). Hence, a change in the features of the



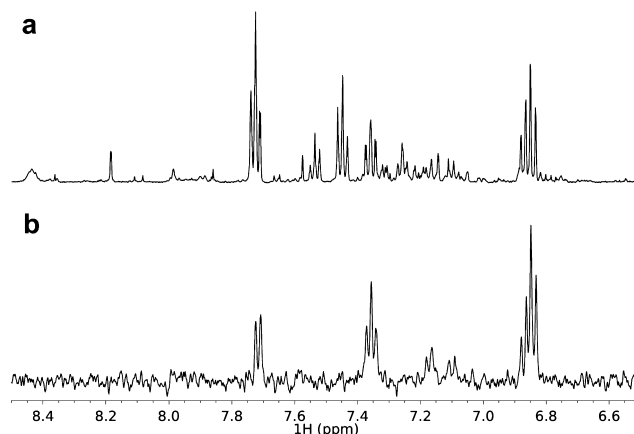
**Figure 3.** (a)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of a mixture of molecules **4**, **7**, and **8** (7 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ ). (b) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of 2-coated gold nanoparticles (70  $\mu\text{M}$ ). (c) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of 3-coated gold nanoparticles (70  $\mu\text{M}$ ). The asterisks identify the signals of an impurity in compound **8**.

nanoparticle-coating monolayer led in this case to a broadening of the affinity toward different molecules. To identify the features of the coating thiol **2** that were responsible for such an affinity modification, as **2** features both a longer alkyl chain (11 carbon atoms) and a different headgroup (phosphoryl choline), we synthesized thiol **3** featuring an 11-carbon alkyl chain as in **2** and a triethyleneglycol headgroup as in **1**. The results of NOE-pumping experiments performed with 3-coated nanoparticles (Figure 3c) revealed a selectivity in between that of the 1- and 2-coated nanoparticles, indicating that both the size of the hydrophobic region in the coating monolayer and the specific interactions with the thiol headgroup may affect the binding affinity, a well-known phenomenon for HPLC stationary phases. Such observations also indicate that hydrophobicity is not the only source of recognition. In fact, although hydroxybenzoates **5** and **6** are more hydrophobic than *p*-toluenesulfonate **7**, they were not associated with the nanoparticles and hence were not revealed by the NOE-pumping experiment (see the SI). It is likely that an amphiphilic structure, with quite well-defined hydrophilic and hydrophobic regions, is required for the inclusion of the analyte in the monolayer.

Since there are no limitations on the chemical structures of the analytes and the nanoparticle-coating thiols, the NOE-pumping experiment has the advantage of very general applicability. However, we found that in some cases the experimental times and detection limits of the protocol can be substantially improved by using saturation transfer difference (STD) experiments.<sup>11</sup> While conceptually similar to an NOE experiment, the STD experiment provides stronger signals because saturation can be driven for longer periods compared with typical NOE mixing times. The final result is that the intensities of the signals stemming from interacting molecules decrease, allowing these signals to be revealed by subtraction from a reference spectrum. The use of STD is, however, limited

by the requirement that there must be no overlap between the signals of the analyte and the macromolecule. Salicylate and 1-coated nanoparticles meet such conditions, allowing us to cut the acquisition times down to 30 min and reduce the detection limit to 250  $\mu\text{M}$  using STD experiments (see the SI).

Finally, we decided to test our nanoparticle-based NMR sensing protocol in a situation as challenging as the analysis of drug metabolites in urines. Indeed, NMR-based metabolomics is an area of utmost interest that could substantially benefit from any protocols that would expand the amount of information attainable.<sup>13</sup> In this framework, we added 1-coated nanoparticles to a human urine sample containing 5 mM sodium salicylate, a concentration similar to that found in urines after medium-dose administration of acetylsalicylic acid.<sup>14</sup> Clean detection of salicylate in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the urine sample (Figure 4a) was quite difficult, since its



**Figure 4.** (a)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of human urine containing 5 mM sodium salicylate. (b) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of 1-coated gold nanoparticles (70  $\mu\text{M}$ ).

signals were mixed with many others having similar intensities and chemical shifts in the aromatic region (e.g., those of hippuric acid). On the other hand, the NOE-pumping experiment canceled out the whole bunch of matrix signals, leaving only those of salicylate (Figure 4b) and allowing for a clear and unambiguous detection of the target molecule. A similar experiment (see the SI) also allowed us to reveal and identify another metabolite of acetylsalicylic acid, salicylic acid, that is excreted in urines under different physiological conditions.

To our knowledge, all of the NMR-based chemosensors reported to date follow the “classical” approach, in which the recognition causes modifications of a chemosensor property, such as the ability to affect the water relaxivity<sup>6</sup> or the chemical shift of a receptor’s heteronucleus.<sup>15</sup> In this way, most of the meaningful information associated with NMR data is lost. More similar to our approach is “chromatographic NMR spectroscopy”, where interactions with a stationary phase are used to perturb the diffusion coefficients of the sample components in such way that the NMR signals can be separated by means of a diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY) experiment.<sup>16</sup> However, besides the intrinsic difficulty of spreading the diffusion rates with a chromatographic medium, this approach suffers from limitations such as the need for high resolution in both the frequency and diffusion domains as well as nontrivial spectral inversion problems. The “NMR chemosensing” approach introduced here retains all of the structural

information provided by NMR spectroscopy, can be very easily implemented on standard instruments, and can benefit from the features of monolayer-protected nanoparticles, which can be easily tailored to meet the recognition requirements of different classes of analytes.<sup>17</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

Synthesis and characterization of the organic compounds and nanoparticles and results of additional NMR experiments. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

[federico.rastrelli@unipd.it](mailto:federico.rastrelli@unipd.it); [fabrizio.mancin@unipd.it](mailto:fabrizio.mancin@unipd.it)

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the ERC Starting Grants Project MOSAIC (Grant 259014). The authors acknowledge Davide Zaramella and Massimo Bellanda for assistance with HPLC and STD measurements, respectively, and Moreno Lelli and Giulio Tognin for helpful discussions.

## ■ REFERENCES

- (1) *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*; Czarnik, A. W., Ed.; ACS Symposium Series 538; American Chemical Society: Washington, DC, 1993.
- (2) Bissell, R. A.; De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Lynch, P. L. M.; Maguire, G. E. M.; Sandanayake, K. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 187–195.
- (3) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.
- (4) Xu, Z.; Chen, X.; Kim, H. N.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 127–137.
- (5) Oton, F.; Tarraga, A.; Espinosa, A.; Velasco, M. D.; Molina, P. J. *Org. Chem.* **2006**, *71*, 4590–4598.
- (6) McRae, R.; Bagchi, P.; Sumalekshmy, S.; Fahrni, C. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4780–4827.
- (7) (a) Rastrelli, F.; Jha, S.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14222–14223. (b) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1523–1525. (c) Guarino, G.; Rastrelli, F.; Scrimin, P.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7200–7203.
- (8) Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258–10259.
- (9) This experiment was performed using a carbonate buffer to prove that the particle selectivity is not affected under high-ionic-strength conditions.
- (10) (a) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9326–9329. (b) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Gentilini, C.; Polizzi, S.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16384–16385. (c) Pezzato, C.; Lee, B.; Severin, K.; Prins, L. J. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 469–471.
- (11) Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- (12) Data from the Chemspider database.
- (13) DeFeo, E. M.; Wu, C. L.; McDougal, W. S.; Cheng, L. L. *Nat. Rev. Urol.* **2011**, *8*, 301–311.
- (14) MacPherson, C. R.; Milne, M. D.; Evans, B. M. *Br. J. Pharmacol.* **1955**, *10*, 484–489.
- (15) Kitamura, M.; Suzuki, T.; Abe, R.; Ueno, T.; Aoki, S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 11568–11580.

- (16) (a) Pages, G.; Delaurent, C.; Caldarelli, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5950–5953. (b) Reddy, G. N. M.; Ballesteros-Garrido, R.; Lacour, J.; Caldarelli, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3255–3258.
- (17) Perrone, B.; Springhetti, S.; Ramadori, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F. Patent application PD2013A000153 (30/5/2013).

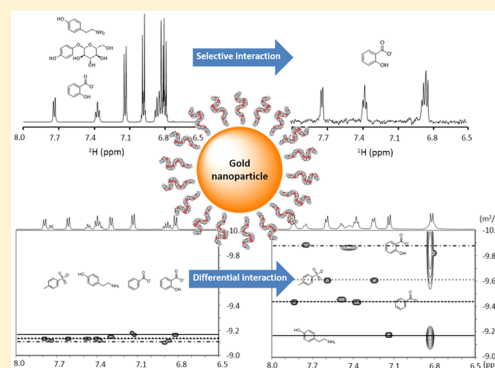
# Nanoparticle-Assisted NMR Detection of Organic Anions: From Chemosensing to Chromatography

Marie-Virginie Salvia, Federico Ramadori, Sara Springhetti, Marta Diez-Castellnou, Barbara Perrone,<sup>†</sup> Federico Rastrelli,\* and Fabrizio Mancin\*

Università di Padova, Dipartimento di Scienze Chimiche, via Marzolo 1, Padova, Italy

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** Monolayer-protected nanoparticles provide a straightforward access to self-organized receptors that selectively bind different substrates in water. Molecules featuring different kinds of noncovalent interactions (namely, hydrophobic, ion pairing, and metal–ligand coordination) can be grafted on the nanoparticle surface to provide tailored binding sites for virtually any class of substrate. Not only the selectivity but also the strength of these interactions can be modulated. Such recognition ability can be exploited with new sensing protocols, based on NMR magnetization transfer and diffusion-ordered spectroscopy (DOSY), to detect and identify organic molecules in complex mixtures.

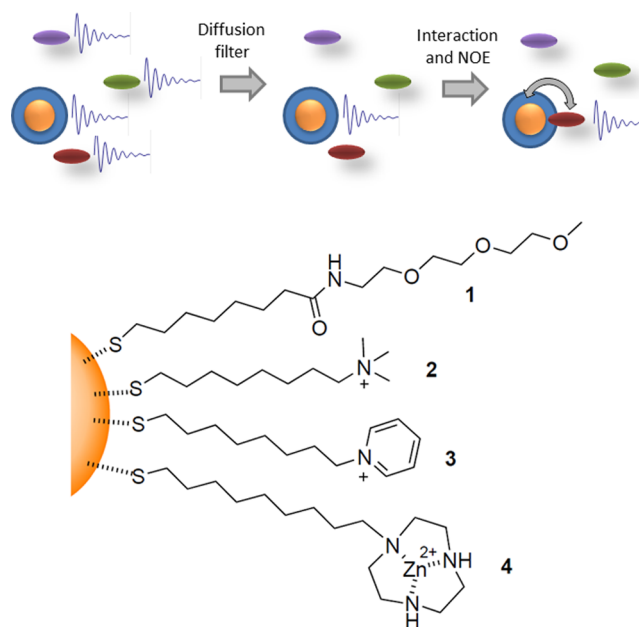


## INTRODUCTION

Detection of a selected compound within a complex mixture is a common problem that chemists face every day. Several effective analytical techniques (chromatography, biochemical assays, biosensors, selective electrodes, chemosensors) have been developed, but most of them still suffer from the limitation of providing only indirect or poor information on the identity of the analyte. Indeed, the target molecule is differentiated from other components of the mixture on the basis of its interaction with the detection system and on the property changes it induces. As a result, the information provided (retention time, color change, and current or voltage variation) relies on the selectivity of the detection system and errors due to the presence of known and unknown interfering species in the mixture are always possible.<sup>1</sup>

NMR spectroscopy is probably the most powerful technique for the identification of organic compounds, even when their structure is unknown. Indeed, the amount of information provided by NMR is often sufficient to assign, with relative easiness, the chemical structure of most compounds. Unfortunately, the use of this technique for direct analysis of complex mixtures is generally compromised by the excess of information stemming from the combination of many (and most likely overlapping) spectra. Therefore, detection of the target analyte is often impossible because its signals are masked by those of other components, mainly matrix interferents.<sup>2</sup> We recently proposed “NMR chemosensing” (Chart 1) as a new protocol for analyte identification and quantification in complex mixtures, based on the use of nanoparticle-based receptors.<sup>3</sup> More specifically, this method relies on the ability of monolayer-protected nanoparticles to bind selected substrates by noncovalent interactions,<sup>4</sup> complemented with an inter-

**Chart 1. (Top) Nanoparticle-Based NMR Sensing with NOE Pumping Experiments: Working Scheme. (Bottom) Nanoparticle-Coated Thiols Used in This Article**



molecular nuclear Overhauser effect (NOE) transfer of magnetization between spins of the monolayer and of the bound analyte.

Received: October 31, 2014

Published: December 22, 2014

The NMR strategy we used to detect the analyte is the “NOE pumping” experiment,<sup>5</sup> which is divided in two blocks (Chart 1). First, a diffusion filter is applied to dephase (cancel) the signals of the fast diffusing, small molecules in the sample. Only the magnetization of the large species, in this case the nanoparticles, survives after this step. Second, a NOE experiment is started immediately after the diffusion filter. During this step, the magnetization is transferred from the nanoparticles to the interacting molecules (in fast exchange regime) and the corresponding signals are detected. The strength of this method rests on its ability to extract the relevant information directly from the analyte in the form of an NMR spectrum of the interacting molecule. Hence, the target molecule can be detected, unambiguously identified, and even quantified using a proper calibration curve.

In our previous report,<sup>3</sup> we demonstrated that NMR chemosensing performed with ultrafine (1.8 nm core diameter) gold nanoparticles coated with a monolayer of amphiphilic neutral molecules (**1**, Chart 1) was able to selectively detect salicylate in water in the presence of several other aromatic anions of similar structure. Such selectivity was ascribed to hydrophobic interactions, since the nanoparticle coating monolayer forms a self-organized hydrophobic pseudophase and salicylate has the highest *n*-octanol/water partition coefficient among the tested molecules. Target detection was also possible in urine, again in the presence of overlapping interferents. In this case, the NMR-chemosensing techniques also allowed the detection and identification of the salicylic acid which, albeit structurally similar to salicylate, has a different NMR spectrum.

In this paper, we extend the scope of nanoparticle-based NMR detection by showing how the self-organized nature of nanoparticles can be exploited to design binding sites tailored at the detection of different analytes. This also allows tuning the selectivity and increasing the sensitivity of NMR chemosensing. Finally we will show that the affinity modulation also allows the use of nanoparticles in the context of “chromatographic NMR”,<sup>6</sup> another technique for the simultaneous identification of multiple analytes in complex mixtures.

## RESULTS AND DISCUSSION

Owing to the ease of preparation and modification of monolayer protected nanoparticles, the potential applications of NMR chemosensing are quite broad. Nanoparticle preparation simply requires the mixing of functional thiols with a gold salt and a reducing agents (or with preformed nanoparticles).<sup>7</sup> Such simple operation leads to the formation of defined objects (the gold nanocrystals) coated with an ordered 3D monolayer of organic molecules. Even when the molecular structure of the coating thiols is relatively simple, as for those reported in Chart 1, cooperation between the functional groups may create recognition patterns for selected molecules.<sup>8</sup> Consequently, nanoparticles capable of recognizing and binding different substrates can be easily designed, prepared, and used.

Early NMR chemosensing experiments were characterized by high selectivity but suffered from a relatively low sensitivity. Indeed, for sodium salicylate a limit of detection (LOD) of 2.5 mM was achieved using **1**-coated nanoparticles at 70  $\mu$ M concentration.<sup>3</sup> Such a low sensitivity stems from the moderate affinity of the analyte for the nanoparticles monolayer (an apparent association constant,  $K_{\text{assoc}}$ , of 120  $\text{M}^{-1}$  was

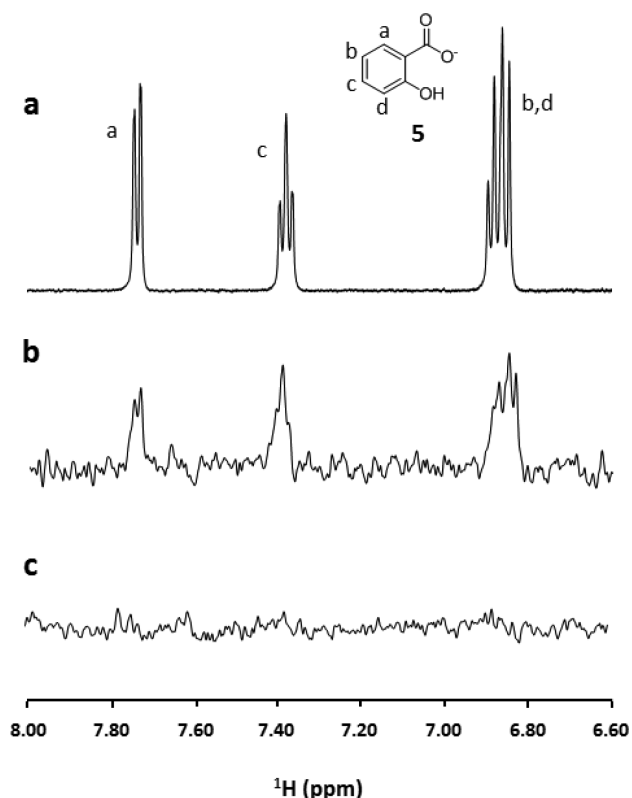
measured),<sup>3</sup> which in turn is due to the fact that binding is based only on hydrophobic interactions.

In this context, a first rationale of the NOE pumping experiment can be drawn in close parallel to the theory of relaxation developed for liable water spins in proteins hydration (see the Supporting Information).<sup>9</sup> The NOE-pumping experiment probes the intermolecular cross-relaxation rates,  $\sigma$ , between protons of the analytes and protons on the monolayer. In turn, the quantity  $\sigma$  results from a linear combination of spectral density functions (SDFs) calculated at different Larmor frequencies. By assuming that the analyte exchange on the monolayer and the nanoparticle rotation are statistically independent processes, it is possible to define a characteristic correlation time  $\tau_{c,k}$  which depends on both the rotational correlation time  $\tau_c$  of the nanoparticle and on the mean residence time  $\tau_{M,k}$  of the analyte spin in the monolayer. In this theoretical framework, it can be shown that the effect of the correlation time  $\tau_{c,k}$  on the SDFs is such that the absolute values of the cross relaxation rates rapidly increase as  $\tau_{M,k} > \tau_c$  (see the Supporting Information for examples). In other words, the stronger the interactions between the analytes and the monolayer, the larger will be the analytes signals emerging from NOE pumping experiments. Consequently, higher affinity of the nanoparticle for the analyte should result in lower detection limits.

Starting from these considerations, we decided to verify how the nanoparticle affinity for the substrate could be improved by introducing a second effective interaction that adds to the hydrophobic one.<sup>8e</sup> Since salicylate is negatively charged, the use of electrostatic ion pairing as the additional interaction was quite a logical choice. In this view, thiols **2–4** (Chart 1), bearing different positively charged headgroups, were synthesized by standard or literature procedures (see the Supporting Information). Gold nanoparticles (AuNps) (1.7 nm average gold core diameter, see the Supporting Information) coated with thiols **1–4** (**1–4**-AuNp) were then prepared and tested as anions receptors for NMR chemosensing.

As expected, when used in NOE pumping experiments, **2**-AuNp proved to be highly effective in detecting salicylate in water (or buffered solutions), with a sizable sensitivity improvement as compared to **1**-AuNp. Figure 1 reports the results of NOE pumping experiments performed with AuNp 15  $\mu$ M and salicylate 1 mM. While in the spectrum recorded with **1**-AuNp (Figure 1c) the salicylate signals are undetectable, they clearly emerge in the NOE pumping spectrum recorded with **2**-AuNp (Figure 1b, S/N = 5.3). By defining the limit of detection (LOD) as the analyte concentration that produces signals whose intensity is greater than 3 times the standard deviation of the noise, we could determine a LOD of 0.5 mM for salicylate detection with **2**-AuNP.

The higher affinity of these nanoparticles for salicylate was confirmed with a titration experiment (Figure 2a) wherein NOE pumping experiments were run on a series of samples containing **2**-AuNp with increasing concentrations of salicylate. The integrated intensities of the salicylate signals increase with the concentration, reaching a plateau at about 2 mM. A fit of the integrated intensities versus the analyte concentration with a 1:1 binding model<sup>10</sup> provides an apparent association constant ( $K_{\text{assoc}}$ ) of  $\sim 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , a value which is above the limit that can be precisely determined by NMR. If we compare this figure with the value of 120  $\text{M}^{-1}$  previously obtained with **1**-coated nanoparticles,<sup>3</sup> where the interaction is prevalently hydrophobic, it appears that the additional ion

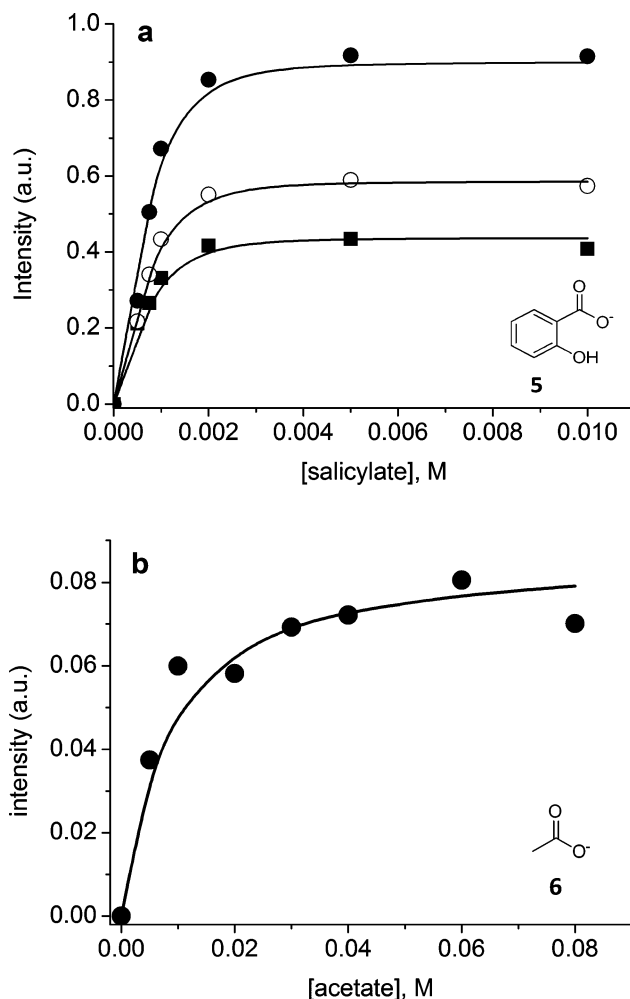


**Figure 1.** (a)  $^1\text{H}$  NMR subpectrum of 1 mM sodium salicylate (**5**) in  $\text{D}_2\text{O}$ . (b) NOE-pumping subpectrum of the same sample in the presence of 2-AuNp. (c) NOE-pumping subpectrum of the same sample in the presence of 1-AuNp. Conditions:  $[\text{AuNp}] = 15 \mu\text{M}$ , carbonate buffer 20 mM, pD = 10, 28  $^\circ\text{C}$ .

pairing in 2-AuNp contributes at least as effectively as the hydrophobic interaction ( $10^2 \times 10^2$ ) to the substrate binding. Such a hypothesis was confirmed by a second titration experiment performed using acetate (**6**) as substrate (Figure 2b). Here, the hydrophobic contribution to the substrate binding is negligible and ion pairing is the sole interaction at play. In line with the previous analysis, the determined binding constant is  $140 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ .

To further investigate how the concurrence of both the electrostatic ion pairing and the hydrophobic interaction ensures a higher substrate affinity (and consequently lower detection limits), we applied NMR chemosensing to a series of carboxylic acids featuring different chain lengths (Figure 3). In this case, the nanoparticles residual signals, which are normally present in the NOE pumping spectrum, were removed by background subtraction. As expected, using 2-AuNp at 15  $\mu\text{M}$  and carboxylic acids at 2 mM concentration, no signals were detected in the NOE-pumping experiment when acetate was the analyte. Very weak signals were found with butyrate (**7**), with just the triplet of the terminal methyl group (0.8 ppm) appearing in the spectrum. Finally, all the signals relative to sodium hexanoate (**8**) were clearly visible in the spectrum. Hence, low concentration recognition requires the presence in the substrate of both an anionic charge and an alkyl chain containing at least five carbon atoms.

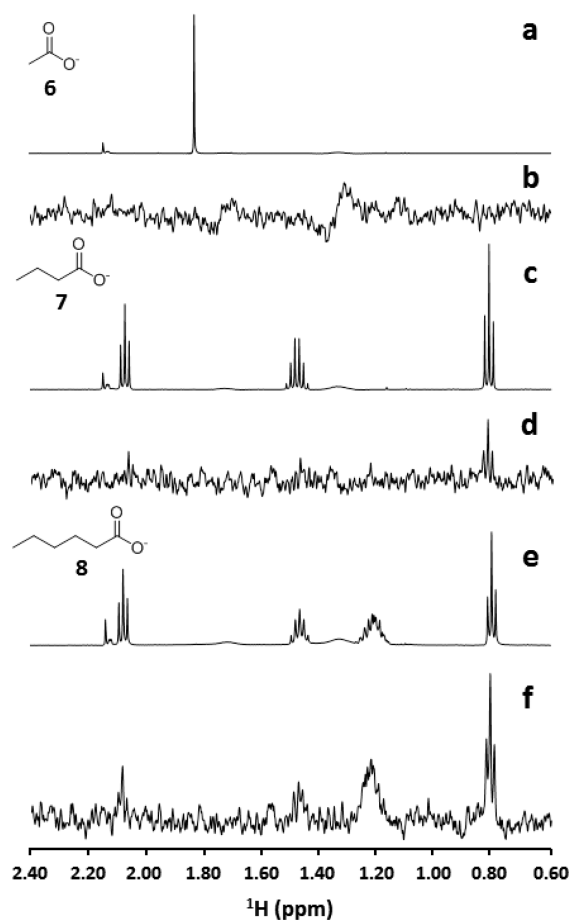
On the basis of such information, we tested the selectivity of the sensing system on a mixture of salicylate (**5**), tyramine (**9**), and arbutin (**10**). All these molecules have an amphiphilic structure including a negatively charged (**5**), positively charged (**9**),<sup>11</sup> or neutral (**10**) polar moiety and an aromatic nonpolar



**Figure 2.** Integrated intensities of the different salicylate (a, ● = 6.8 ppm, ○ = 7.4 ppm, □ = 7.75 ppm) or acetate (b, ● = 1.98 ppm) signals in NOE-pumping experiments with 2-AuNp, as a function of the analyte concentration. Solid line: best fit of the data. Conditions:  $[\text{AuNp}] = 15 \mu\text{M}$ , carbonate buffer 20 mM, pD = 10, temp = 28  $^\circ\text{C}$ .

tail. This ensures that, while hydrophobic interaction is possible with the aromatic portion of all the three substrates, electrostatic ion-pairing interaction is available only to salicylate. Indeed, only salicylate was detected in the NMR chemosensing experiment (Figure 4), confirming that a simultaneous hydrophobic and electrostatic interaction is a prerequisite for successful detection. In addition, the spectrum reported in Figure 4 nicely highlights the advantages and potentials of NMR chemosensing. Looking just at the 6.9–6.8 ppm region, the presence of salicylate in the mixture is hardly assessed by standard NMR experiments due to the signal overlap. However, the salicylate signals nicely stand out in the NOE pumping spectrum, allowing for unambiguous identification of the analyte.

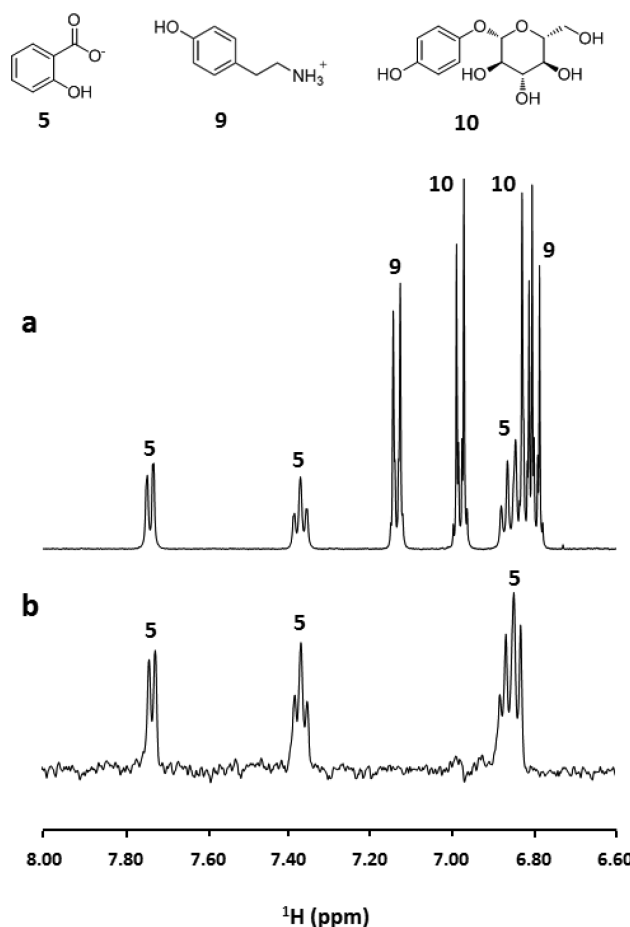
More insight into the behavior of the sensing system was obtained by investigating the detection of other potential analytes featuring negatively charged groups. As reported in Figure 5, when a mixture of salicylate (**5**), benzoate (**11**), tosylate (**12**), and tyramine (**9**, as negative control) is analyzed by NOE pumping, the signals of all the three anionic species are present in the NOE pumping spectrum. In line with our expectations, 2-AuNp nanoparticles also detect other and more hydrophilic aromatic anions, besides salicylate, that were



**Figure 3.** (a)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of sodium acetate (6). (b) NOE-pumping subspectrum of 6 in the presence of 2-AuNp. (c)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of sodium butanoate (7). (d) NOE-pumping subspectrum of 7 in the presence of 2-AuNp. (e)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of sodium hexanoate (8). (f) NOE-pumping subspectrum of 8 in the presence of 2-AuNp. Conditions: [carboxylates] = 2 mM, [AuNp] = 15  $\mu\text{M}$ , carbonate buffer 20 mM, pD = 10. 2-AuNp signals were removed by subtraction of a NOE pumping spectrum obtained in the absence of analytes.

not detected by 1-AuNp nanoparticles.<sup>3</sup> Signal intensities in the NOE pumping spectrum (Figure 5b) are, however, different for each analyte, roughly following the order  $5 > 12 > 11$ . This trend indeed suggests a parallel binding affinity, with salicylate interacting more strongly than tosylate and benzoate. Within this series the ion-pairing interaction can be considered similar for each anionic analyte, and the affinity modulation is likely due to a different strength of the hydrophobic interaction. However, the computationally predicted *n*-octanol/water partition coefficients at pH 7.4 (log *D*) for 5, 11, and 12 are, respectively, -1.14, -0.98 and -2.57.<sup>13</sup> At difference from what we reported previously for 1-AuNp,<sup>3</sup> and also here in the case of linear carboxylic acids, there is not a clear correlation between log *D* values and nanoparticles affinity, indicating that the interaction with the nanoparticle-coating monolayer is different from the simple partition into a hydrophobic phase.

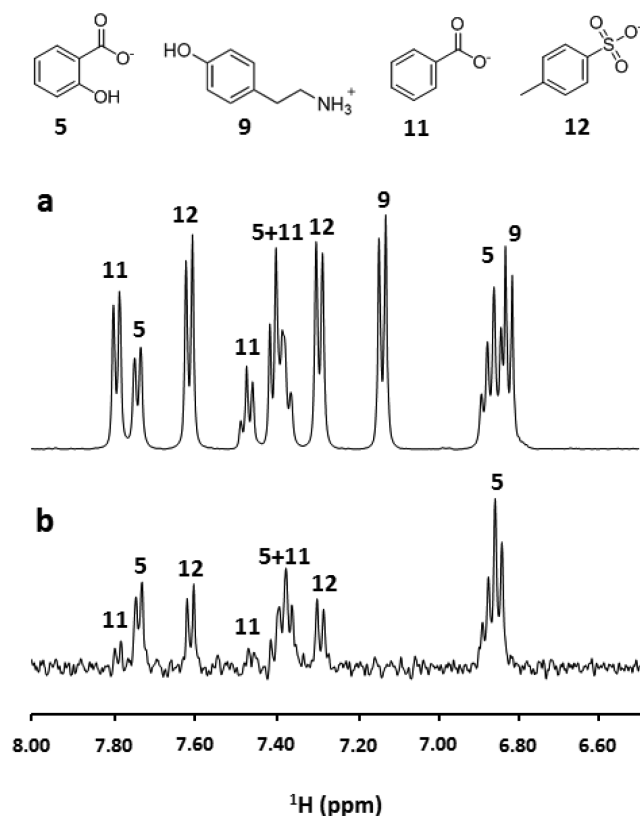
The possibility of easily modifying and optimizing the monolayer binding properties is clearly a fundamental advantage of using monolayer-protected nanoparticles, which behave as scaffolds to self-organize molecular binding sites. Hence, we decided to reverse the previous approach and search for nanoparticles capable to detect hydrophilic carboxylates



**Figure 4.** (a)  $^1\text{H}$  NMR subspectrum of sodium salicylate (5), tyramine (9), and arbutin (10), 2 mM each in  $\text{D}_2\text{O}$ . (b) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of 2-coated gold nanoparticles. Conditions: [AuNp] = 15  $\mu\text{M}$ , HEPES buffer 10 mM, pD = 7.0.

such as acetate at low concentrations. To this end, 3-AuNp and 4-AuNp nanoparticles were screened, together with 2-AuNp, for their ability to detect 10 mM sodium acetate in water. The NOE pumping experiment performed with 3-AuNp does not reveal the presence of acetate (see the Supporting Information). In the case of 2-AuNp only a weak signal, just above the detection limit, emerges in the spectrum. On the other hand, a large signal is seen in the NOE pumping experiment performed with 4-AuNp. The different behavior of the three nanoparticles reveals that the higher sensitivity of 4-AuNp is likely due to an additional interaction besides those already examined. Indeed, while trimethylammonium and *N*-alkylpyridinium headgroups are expected to provide only electrostatic interactions, Zn(II) ions may contribute with additional metal-ligand coordination interactions. Moreover, cooperative binding of the carboxylate group to two metal centers can be postulated.<sup>8</sup>

The ability of 4-coated nanoparticles to detect small-molecule organic anions was then tested by analyzing via NMR chemosensing a mixture containing sodium acetate (6), sodium dimethylphosphate (13), ethanol (14), methanol (15), and DMF (16). As expected, only the two anions emerge from the NOE pumping experiment (Figure 6). The intensity of the dimethyl phosphate signal is larger than that of acetate, suggesting a greater affinity of 4-coated nanoparticles for the

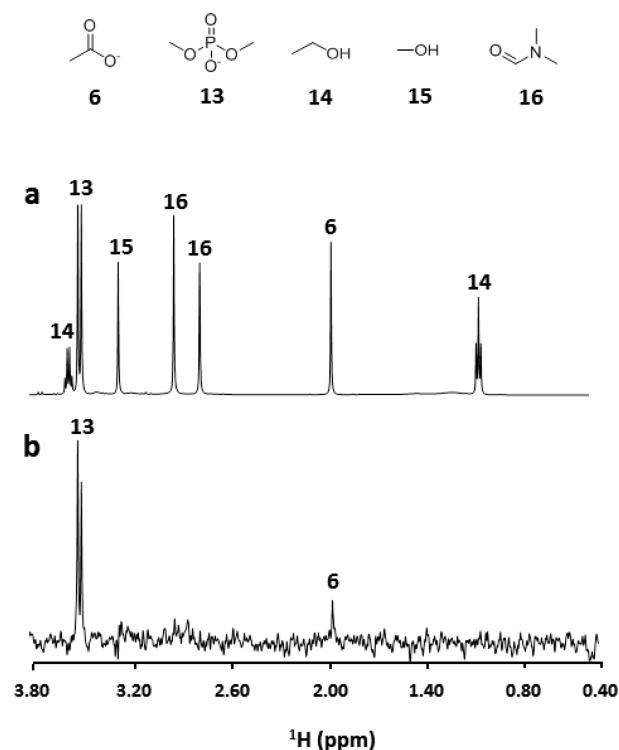


**Figure 5.** <sup>1</sup>H NMR subspectrum of sodium salicylate (5), sodium benzoate (11), potassium tosylate (12), and tyramine (9), 2 mM each in D<sub>2</sub>O. (b) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of 2-coated gold nanoparticles. Conditions: [AuNp] = 15 μM, HEPES buffer 10 mM, pD = 7.0.

former. Such evidence is in line with the recent observations by Prins and co-workers, who demonstrated that polyphosphate ions bind more strongly to 4-coated nanoparticles than polycarboxylates.<sup>14</sup>

All of the above experiments demonstrate that monolayer-protected nanoparticles can be easily tailored to change their affinity toward selected substrates. Hydrophobic, ion-pairing, and metal–ligand coordination interactions can be combined to provide stronger interaction and/or different selectivity. In summary, 1-coated nanoparticles detect only highly hydrophobic species, 2-coated nanoparticles detect moderately (and highly) hydrophobic organic anions, and 4-coated nanoparticles can be used for highly hydrophilic organic anions.

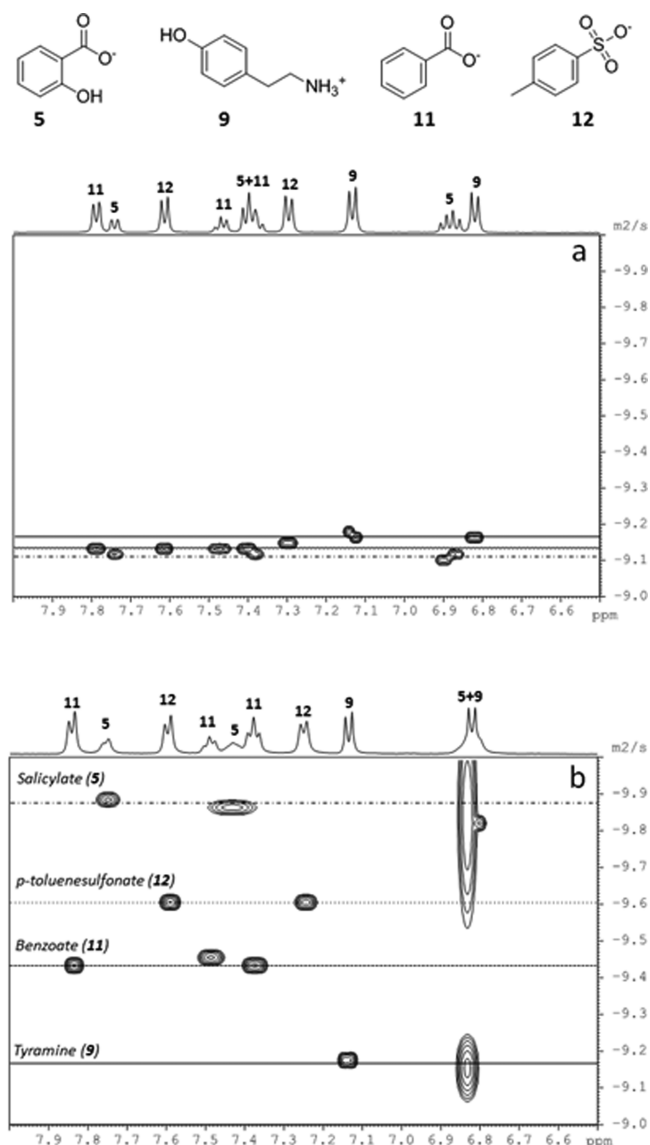
The peculiar recognition properties found for monolayer-protected nanoparticles promptly suggest their use in combination with other analytical techniques based on NMR. A few years ago, Caldarelli and co-workers introduced the idea of “chromatographic NMR”<sup>6</sup> to analyze complex mixtures of organic molecules, extending to solid phases the principle of “affinity NMR” championed by Shapiro.<sup>15</sup> In this technique, interactions with a solid stationary phase (silica gel) are used to perturb the diffusion coefficients of dissolved analytes in such way that their NMR signals can be conveniently separated by diffusion-ordered spectroscopy (DOSY).<sup>16</sup> However, because of the sample heterogeneity, all spectra must be acquired under magic-angle spinning conditions to reduce the anisotropy of the magnetic susceptibility. An alternative approach to reduce the magnetic field inhomogeneity across the sample consists in matching the magnetic susceptibility of the silica gel with that



**Figure 6.** (a) <sup>1</sup>H NMR subspectrum of sodium acetate (6), sodium dimethylphosphate (13), ethanol (14), methanol (15), and DMF (16) each at 10 mM concentration in D<sub>2</sub>O. (b) NOE-pumping subspectrum of the same sample in the presence of 4-coated gold nanoparticles. Conditions: [AuNp] = 15 μM. The NOE pumping pulse scheme was complemented with a CPMGz filter<sup>12</sup> to improve the baseline.

of proper mixtures of deuterated solvents<sup>17</sup> or in the use of soluble stationary phases.<sup>18</sup> In this intriguing context, we reasoned that most of such problems could be overcome by use of nanoparticles as a pseudostationary phase. In fact, 2 nm gold core nanoparticles are small enough to not perturb the magnetic field homogeneity across the sample (thus allowing the use of solution-state NMR), yet they are large enough to have quite low diffusion coefficients. Most importantly, the nanoparticles affinity toward a specific class of molecules can be tuned by the proper choice of the monolayer, as already demonstrated. Combined together, such features could potentially allow a pseudochromatographic resolution of very complex mixtures by solution-state NMR, even on spectrometers of moderate field strengths.

Starting from such premises we decided to test this idea on the 2–AuNp, salicylate (5), benzoate (11), tosylate (12), and tyramine (9) mixtures previously investigated via NMR chemosensing. In this case, the single components cannot be easily isolated with a standard <sup>1</sup>H spectrum, NOE pumping (Figure 5b), or even DOSY (Figure 7a). However, if the DOSY experiment is repeated in the presence of 2–AuNp (Figure 7b), each component is easily identified on the basis of its altered diffusion coefficient, which is directly related to the affinity for the nanoparticles monolayer. It is evident from Figure 7b that salicylate (5) diffusion coefficient is the most reduced: indeed, salicylate interacts with 2–AuNp so strongly that a chemical shift perturbation is also observed. Regrettably, such perturbation results in a superposition of the signals of salicylate and tyramine at 6.84 ppm, but the difference in diffusion coefficients induced by the nanoparticles allows to



**Figure 7.** DOSY experiment performed on a mixture of sodium salicylate (**5**), sodium benzoate (**11**), potassium tosylate (**12**), and tyramine (**9**) in water in the absence (a) or in the presence (b) of 2-AuNp. Conditions: [AuNp] = 90  $\mu$ M, HEPES buffer 10 mM, pD = 7.0.

resolve the overlap in the diffusion dimension, epitomizing the major advantage of chromatographic NMR. A decrease of the tosylate (**12**) and benzoate (**11**) apparent diffusion coefficients is also noticed, yet to a lesser extent due to their smaller interaction with the nanoparticles. As expected from the outcome of the NOE pumping experiment, the DOSY map shows no change for tyramine (**9**) diffusion coefficient in the absence and in the presence of nanoparticles.

NMR diffusometry further corroborates what has been observed so far in NOE-pumping experiments (Figure 5b): that is, monolayers of organic molecules coating gold NPs can effectively interact with small molecules via noncovalent interactions. Indeed, cases exist where a NOE-pumping experiment is not selective enough because of the strong interactions at play (Figure 5b), whereas a diffusion coefficient change is generally not observed for weak interactions.<sup>5</sup> In this respect, NOE pumping and nanoparticles-assisted DOSY can be seen as complementary techniques.

## CONCLUSION

The results here reported nicely demonstrate how the combination of monolayer-protected nanoparticles with NMR can disclose new detection protocols and improve existing ones. We have shown that noncovalent interactions between AuNp coating monolayers and analytes can be exploited to label and detect the interacting molecules either by magnetization transfer or by a perturbation of their diffusion coefficient. The self-organized and multifunctional nature of nanoparticles allows for an easy design and construction of new receptors where the substrate affinity can be tailored by modulating and combining different interactions. When the interaction is selective and the exchange is fast on the diffusion time scale, the spins located on the NPs monolayer can be used as a magnetization source to be selectively transferred to the interacting analytes via NOE. In such way, only the signals of the interacting species are found in the final spectrum and the NOE pumping experiment easily allows to probe the affinity of different substrates for the nanoparticles. On the other hand, when the interactions are strong, a variation of the analytes diffusion coefficient can be observed, which allows for optimal separation in diffusion-ordered spectra. A problem that still needs to be addressed is the presence of residual nanoparticles signals in the NOE pumping spectrum. This drawback can be partially overcome by appropriately designing the nanoparticle coating monolayer, i.e., by pairing, as in the case of salicylate detection, nonaromatic monolayers with aromatic substrates. Other solutions of more general application may involve a fine-tuning of the experimental parameters or the development of NMR editing techniques capable to suppress the background signal. Several potential applications are at reach of these methods and their development is ongoing in our laboratory.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Synthesis and characterization of new organic compounds and nanoparticles; additional NMR experiments. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*fabrizio.mancin@unipd.it

\*federico.rastrelli@unipd.it

### Present Address

<sup>†</sup>Bruker BioSpin AG, Industriestrasse 26, 8117 Fällanden, Switzerland.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Funded by the ERC Starting Grants Project MOSAIC (Grant No. 259014) and PRAT CPDA132473/13 granted to F.R. by Università degli Studi di Padova. We acknowledge Giulia Altoè for performing some preliminary experiments. We also acknowledge Diego Frezzato for helpful discussions.

## REFERENCES

- (1) Limited direct information is provided only by chromatographic techniques where sample component separation is coupled with optical or mass spectroscopy analysis.
- (2) For recently reported methods for NMR detection and identification of compounds in mixtures, see: (a) Kitamura, M.;

Suzuki, T.; Abe, R.; Ueno, T.; Aoki, S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 11568–11580. (b) Zhao, Y.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18770–18773. (c) Zhao, Y.; Markopoulos, G.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10683–10690. (d) Plaunt, A. J.; Clear, K. J.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10499–10501.

(3) Perrone, B.; Springhetti, S.; Ramadori, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11768–11771.

(4) (a) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9326–9329. (b) Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G. F.; Gentilini, C.; Polizzi, S.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16384–16385. (c) Bayir, A.; Jordan, B. J.; Verma, A.; Pollier, M. A.; Cooke, G.; Rotello, V. M. *Chem. Commun.* **2006**, 4033–4035. (d) Ghosh, P. S.; Verma, A.; Rotello, V. M. *Chem. Commun.* **2007**, 2796–2798. (e) Pezzato, C.; Lee, B.; Severin, K.; Prins, L. J. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 469–471. (f) Maiti, S.; Pezzato, C.; Martin, S. G.; Prins, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11288–11291.

(5) Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258–10259.

(6) (a) Viel, S.; Ziarelli, F.; Caldarelli, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 9696–9698. (b) Pages, G.; Delaurent, C.; Caldarelli, S. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2006**, *45*, 5950–5953. (c) Caldarelli, S. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, S48–S55. (d) Reddy, G. N. M.; Ballesteros-Garrido, R.; Lacour, J.; Caldarelli, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3255–3258.

(7) Zhao, P. X.; Li, N.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 638–665.

(8) (a) Manea, F.; Houillon, F. B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165–6169. (b) Bonomi, R.; Selvestrel, F.; Lombardo, V.; Sissi, C.; Polizzi, S.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15744–15745. (c) Zaupa, G.; Mora, C.; Bonomi, R.; Prins, L. J.; Scrimin, P. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 4879–4889. (d) Pieters, G.; Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Prins, L. J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916–1918. (e) Pieters, G.; Pezzato, C.; Prins, L. J. *Langmuir* **2013**, *29*, 7180–7185. (f) Diez-Castellnou, M.; Mancin, F.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1158–1161.

(9) Halle, B. J. *Chem. Phys.* **2003**, *119*, 12372–12385.

(10) Following the convention adopted for micelles, the nominal concentration of thiol units has been used as receptor concentration in the fitting.

(11) At pH 7, here used for the NMR chemosensing experiments.

(12) Rastrelli, F.; Jha, S.; Mancin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *31*, 14222–14224.

(13) Data from the Chemspider database.

(14) Pezzato, C.; Scrimin, P.; Prins, L. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 2104–2109.

(15) Gounarides, J. S.; Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Chromatogr. B* **1999**, *725*, 79–90 and references cited therein.

(16) Colbourne, A. A.; Meier, S.; Morris, G. A.; Nilsson, M. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10510–10512 and references cited therein.

(17) Hoffman, R. E.; Arzuan, H.; Pemberton, C.; Aserin, A.; Garti, N. *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 295–299.

(18) See: (a) Pemberton, C.; Hoffman, R. E.; Aserin, A.; Garti, N. *Langmuir* **2011**, *27*, 4497–4504. (b) Rogerson, A. K.; Aguilar, J. A.; Nilsson, M.; Morris, G. A. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7063–7064. (c) Huang, S.; Gao, J.; Wu, R.; Li, S.; Bai, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 11592–11595 and references cited therein.



# Ringraziamenti

---

Alla fine di ogni cammino i ringraziamenti sono doverosi, quindi il primo ringraziamento va senza ombra di dubbio al mio capo: prof. Fabrizio Mancin, quello che sono scientificamente lo devo solo a te, grazie per tutto!

Ovviamente il secondo ringraziamento va alla mia famiglia, alla mia mamma per essere sempre presente e premurosa, a mia sorella per esserci trovate e per avermi fatto il regalo più bello del mondo, l'avermi fatta diventare zia, due volte!! E ovviamente ai miei due zii che ci sono sempre e per qualunque cosa.

Una nota speciale per Davide, insieme siamo un 11: due unità che si accostano così bene da moltiplicare il loro valore, senza perdere la loro identità nella somma; un numero primo che nessun altro può dividerlo ad eccezione di se stesso e dell'unità, una di quelle unità che lo compongono. Grazie per la pazienza, da quando sto con te sono molto più forte e molto più felice.

Grazie ai genitori di Davide, Adriano e Michela, perché mi fanno sentire sempre come una figlia.

Ovviamente grazie agli abitanti del lab 207, a chi c'è ancora e a chi è già andato via, le giornate non sarebbero tanto leggere se non ci foste voi!! Grazie sopra tutti a Luca, Jakub ed Elisa.

Ai ragazzi dell'ufficio perché ogni tanto è bello fare due chiacchiere e a tutti quelli con cui ho condiviso un pezzo di vita nell'edificio 170.

Grazie a Fede per tutto quello che pazientemente mi hai spiegato mille volte sull'NMR!!

Non posso certo dimenticarmi di Stefano e Mauro, perché per ogni problema corrono sempre e in un laboratorio succede sempre qualcosa.

Un grazie davvero speciale alle mie fantasmagoriche e completamente fuori controllo coinquiline Ari e Sere, non me ne potevano capitare due migliori!!!

Alle mie amiche non vi metto certo in ordine di importanza perché nel mio cuore avete tutte un posto speciale quindi: Tizi e Mauro per le serate fuori, le scampagnate, le vacanze, le gite e lo shopping (e soprattutto perché ogni tanto invitate a cena Davide), Sara e Vero per le mitiche serate al karaoke...mi mancano dobbiamo riprendere!! Fra e



Al per essere sempre una certezza e per le lunghissime telefonate!!! Chiara perché non ci siamo ancora perse anche se mi piacerebbe passare più tempo con te!!

Grazie a tutte le persone con cui ho condiviso momenti importanti della mia vita anche se poi la strada ci ha portato lontane, la persona che sono adesso lo devo anche a voi. E alla fine un grazie davvero speciale a tutte le persone che ho dimenticato, vi chiedo umilmente perdono.

Voglio chiudere questi ringraziamenti con una citazione che è anche un augurio che mi faccio e che vi faccio:

“Sognate in grande, non c’è altro da fare. Per quanto ne sappiamo, ci è concessa una sola occasione, quindi abbandonate le vostre paure e vivete i vostri sogni.”

-Marilyn Monroe-