

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di CHIMICA BIOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOSCIENZE E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO: BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO XXIV

**SVILUPPO ED APPLICAZIONI BIOMEDICHE DI SISTEMI NANOSTRUTTURATI
SUPERPARAMAGNETICI COSTITUITI DA MAGHEMITE (SAMN, SURFACE ACTIVE MAGHEMITE
NANOPARTICLES) E BIOELEMENTI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maria Catia Sorgato

Supervisore: Ch.mo Prof. Fabio Vianello

Dottorando: Giulietta Sinigaglia

INDICE

ABSTRACT	Pag. 1
RIASSUNTO	Pag. 5
ABBREVIAZIONI	Pag. 9
SCOPO DELLA TESI	Pag. 11
1. INTRODUZIONE	Pag. 13
1.1 NANOPARTICELLE DI OSSIDO DI FERRO	Pag. 14
1.2 NANOPARTICELLE DI MAGHEMITE E LORO APPLICAZIONI	Pag. 18
1.3 FUNZIONALIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE CON BIOMOLECOLE	Pag. 21
1.4 BIOMOLECOLE UTILIZZATE NELLO STUDIO DEL LEGAME CON NANOPARTICELLE MAGNETICHE	Pag. 24
1.4.1 Albumina di siero bovino	Pag. 25
1.4.2 Perossidasi di rafano	Pag. 26
1.4.3 Avidina	Pag. 28
1.4.4 Biotina	Pag. 30
1.4.5 Glucosio ossidasi	Pag. 32
1.4.6 Ammino ossidasi di siero bovino	Pag. 34
2. MATERIALI E METODI	Pag. 39
2.1 REAGENTI E SOLVENTI	Pag. 39
2.2 METODI	Pag. 40
2.2.1 Le sonde fluorescenti	Pag. 40
2.3 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE	Pag. 43
2.4 DIFFRAZIONE A RAGGI X (XRPD)	Pag. 44
2.5 MICROSCOPIA A TRASMISSIONE ELETTRONICA	Pag. 45
2.6 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN TRASFORMATA DI FOURIER	Pag. 47
2.7 SPETTROMETRIA DI MASSA	Pag. 52
2.8 SPETTROSCOPIA MOSSBAUER	Pag. 54
2.9 MISURE DI MAGNETIZZAZIONE	Pag. 56
2.10 PROTOCOLLI	Pag. 57
2.10.1 Sintesi di nanoparticelle di maghemite	Pag. 57

2.10.2	Cinetica di risospensione delle SAMN in mezzi diversi	Pag. 57
2.10.3	Effetto del pH sulla cinetica di risospensione delle SAMN	Pag. 58
2.10.4	Immobilizzazione di proteine direttamente sulla superficie delle SAMN	Pag. 58
2.10.5	Determinazione dei parametri cinetici enzimatici della perossidasi di rafano	Pag. 59
2.10.6	Determinazione dei siti biotinilabili dei complessi SAMN@avidina	Pag. 59
2.10.7	Caratterizzazione della superficie delle SAMN tramite impiego della sonda fluorescente rodamina B isotiocianato	Pag. 60
2.10.8	Analisi della cinetica di binding tra SAMN e RITC	Pag. 60
2.10.9	Studio dell'isoterma di Langmuir per il complesso SAMN@RITC	Pag. 61
2.10.10	Modificazioni della sonda RITC con gruppi amminici	Pag. 62
2.10.11	Determinazione della resa quantica del complesso SAMN@RITC	Pag. 62
2.10.12	Uso della sonda RITC per immobilizzare proteine sulla superficie delle SAMN	Pag. 63
3.	RISULTATI	Pag. 69
3.1	CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE	Pag. 70
3.1.1	Analisi Mossbauer e in spettroscopia infrarosso	Pag. 70
3.1.2	Misure di magnetizzazione	Pag. 73
3.1.3	Diffrazione a raggi x (XRPD)	Pag. 74
3.1.4	Analisi mediante microscopia a trasmissione e scansione elettronica	Pag. 75
3.1.5	Cinetiche di risospensione delle nanoparticelle in mezzi diversi	Pag. 76
3.1.6	Analisi tramite spettroscopia UV-Vis	Pag. 79
3.1.7	Interazione diretta tra proteine e la superficie delle nanoparticelle	Pag. 81
3.1.8	Legame della sonda fluorescente rodamina B isotiocianato alla superficie delle nanoparticelle	Pag. 94
3.1.9	Utilizzo del complesso SAMN@RITC come sistema di immobilizzazione di enzimi	Pag. 103
4.	DISCUSSIONE	Pag. 119
4.1	FUNZIONALIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE	Pag. 120
4.2	NANOPARTICELLE FUNZIONALIZZATE CON LA SONDA FLUORESCENTE RODAMINA B ISOTIOCIANATO COME SISTEMA DI IMMOBILIZZAZIONE DI ENZIMI	Pag. 124
	BIBLIOGRAFIA	Pag. 131

Abstract

With the rapid development of nanotechnology, magnetic nanoparticles are currently being widely studied. It has long been known that the physico-chemical properties of magnetic nanoparticles can be vastly different from those of the corresponding bulk material. In particular, nanoparticles characteristics are: large surface-to-volume ratio, high surface reaction activity, high catalytic efficiency, and strong adsorption ability, which are helpful for the immobilization of desired biosensing molecules.

The nanoparticles used in the present research project (called surface active maghemite nanoparticles, SAMN), were synthesized by a new simple method and original procedure in the dimension range around 10 nm, and are characterized by specific chemical behavior without any superficial modification or coating derivatization. These magnetic nanoparticles show high average magnetic moment and superparamagnetic properties, which means that, the particles are attracted by an external magnetic field, but retain no residual magnetism at field removal. Therefore, suspended superparamagnetic particles can be removed from the suspension using an external magnet, but they do not form aggregates after removal of the external magnetic field. An international patent, supported by the University of Padova, was applied about the synthetic method and further applications. Material characterization was carried out by transmission electron microscopy, spectrophotometric and spectrofluorimetric assays, Mossbauer and FTIR spectroscopy, SQUID magnetic measurements in the temperature range 2-300 K and X-ray powder diffraction studies (*Acta Biomaterialia*, 2012), in collaboration with the Department of Chemical Sciences and the Department of Geo Sciences of the University of Padova and the Centre for Nanomaterial Research at the Palacky University in Olomouc (Czech Republic).

The surface of these maghemite nanoparticles was functionalized with proteins of high biotechnological interest, such as horseradish peroxidase, avidin and biotin to combine the advantages of immobilized proteins on nano-materials and easy operation of magnetic nanoparticles. This nanostructured magnetic nanoparticle-

bioelement system was used to develop inexpensive, simple and rapid methods to purify proteins, immobilize enzymes for applications in clinical diagnostics, and biosensor development. In particular, the SAMN@avidin complex was used to purify biotinylated recombinant protein, namely human sarcoplasmic (SERCA-1A) Ca^{2+} -ATPase, expressed in *S. Cerevisiae*. This macromolecule is a membrane protein, abundantly present in skeletal muscles where it functions as an indispensable component of the excitation-contraction coupling. The transporter serves as a prototype of a whole family of cation transporters, the P-type ATPases, which in addition to Ca^{2+} transporting proteins count Na^+, K^+ -ATPase and H^+, K^+ , proton- and heavy metal transporting ATPases as prominent members. The purification procedure was aimed to produce SERCA 1a crystals, in order to determine, by x-ray crystallography, the 3D structure of this calcium ATP-ase, helping to elucidate important aspects of pump activity and regulation. Furthermore, the ability of a fluorescent probe, rhodamine B isothiocyanate, to interact with nanoparticle surface was used, by the isothiocyanate functionality, to immobilize glucose oxidase (GOx) and bovine serum amino oxidase (BSAO). These enzymes (GOx and BSAO) immobilized on nanoparticle surface retained their catalytic activity, although a reduction of catalytic activity was observed. This reduction was attributed to steric effects, i.e., a lower accessibility of the active site for the substrate, conformational changes in the enzyme structure following the immobilization or partial denaturation of the enzyme during the experimental conditions used for the immobilization.

The SAMN@GOx complex was used to develop an electrochemical biosensor for glucose determination in food samples (Biosensors and Bioelectronics, 2012). Meanwhile, the SAMN@BSAO adduct was used to produce cytotoxic products, such as hydrogen peroxide, aldehydes and ammonia, in tumor cells (International Journal of Nanomedicine, 2012). The presence of nanocatalyst can be conveniently monitored by its fluorescence and it can be quickly removed by the application an external magnet and re-used several times without loss of the catalytic efficiency.

The present experimental work produced the following manuscript:

M. Magro, G. Sinigaglia, L. Nodari, J. Tucek, K. Polakova, Z. Marusak, S. Cardillo, G. Salviulo, U. Russo, R. Stevanato, R. Zboril, F. Vianello, 2012. Charge binding of rhodamine derivative to OH⁻ stabilized nanomaghemite – Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. Accepted for publication in *Acta Biomaterialia*, IF. 4.822.

G. Sinigaglia, M. Magro, G. Miotto, S. Cardillo, E. Agostinelli, R. Zboril , E. Bidollari and F. Vianello, 2012. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. Accepted for publication in *International Journal of Nanomedicine*, IF. 4.976.

D. Baratella, M. Magro, G. Sinigaglia, R. Zboril, G. Salviulo and F. Vianello, 2012. A glucose biosensor based on novel maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles. Submitted for publication in *Biosensors and Bioelectronics*, IF. 5.361.

Riassunto

Con il rapido sviluppo delle nanotecnologie, le nanoparticelle magnetiche sono ad oggi largamente studiate. Da tempo è noto, che le proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle differiscono da quelle del materiale grezzo avente la stessa composizione. In particolare, le caratteristiche che compongono le nanoparticelle sono: elevato rapporto superficie su volume, elevata reattività superficiale, elevata efficienza catalitica e forte capacità di adsorbimento, caratteristiche utili nell'immobilizzare sulla loro superficie determinate molecole.

Le nanoparticelle utilizzate in questo progetto di ricerca, chiamate SAMN (surface active maghemite nanoparticles), sono state sintetizzate mediante un semplice ed innovativo metodo di sintesi, in un intervallo di dimensioni attorno ai 10 nm, e sono caratterizzate da un comportamento chimico specifico senza alcuna modificazione o derivatizzazione superficiale. Queste nanoparticelle magnetiche presentano un elevato momento magnetico e proprietà superparamagnetiche, ossia, tali particelle sono in grado di rispondere all'applicazione di un campo magnetico esterno e, una volta rimosso, non trattengono alcuna magnetizzazione residua. Perciò, particelle superparamagnetiche rimosse, possono essere rimosse da una sospensione, mediante applicazione di un campo magnetico esterno e, una volta rimosso, non formano aggregati. Un brevetto internazionale, che coinvolge l'Università di Padova, è stato depositato a protezione del metodo di sintesi e di alcune applicazioni. La caratterizzazione del materiale è stata effettuata mediante microscopio a trasmissione elettronica, analisi spettrofotometriche e spettrofluorimetriche, spettroscopia infrarosso e Mossbauer, da misure di magnetizzazione nell'intervallo di temperatura tra 2 K e 300 K e mediante studi di diffrazione a raggi x su polveri (XRPD) (Acta Biomaterialia, 2012), in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche e il Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova e il Centro di Ricerca per i Nanomateriali dell'Università di Palacky in Olomouc (Repubblica Ceca).

La superficie di queste nanoparticelle è stata funzionalizzata con proteine di grande interesse biotecnologico, quali la perossidasi di rafano, l'avidina e la biotina, allo scopo di unire il vantaggio proveniente dall'immobilizzazione delle

proteine su nanomateriali e la semplicità d'uso delle nanoparticelle magnetiche. Questo sistema nanostrutturato magnetico composto da nanoparticelle e bioelementi, è stato usato per sviluppare un metodo poco costoso, semplice e rapido per la purificazione di proteine, per l'immobilizzazione di enzimi, per applicazioni in clinica diagnostica e per lo sviluppo di biosensori. In particolare, il complesso SAMN@avidina è stato usato per purificare la proteina umana ricombinante Ca²⁺-ATPasica, SERCA-1A, espressa in *S. Cerevisiae*. La SERCA è una proteina di membrana Ca²⁺-ATPasica abbondante nel muscolo scheletrico la cui funzione è indispensabile nel sistema di accoppiamento eccitazione-contrazione. Viene usata come prototipo di un'intera famiglia di pompe ATP-asiche di tipo P, che oltre ad essere coinvolte nel trasporto dello ione Ca²⁺, sono coinvolte anche nel sistema di trasporto dei protoni Na⁺,K⁺ e H⁺,K⁺ e nel trasporto di metalli pesanti. Purificare in maniera efficiente tale proteina, permette di analizzarla mediante cristallografica a raggi x ed elucidare così importanti aspetti dell'attivazione della pompa e la sua regolazione.

Inoltre, la capacità della sonda, rodamina B isotiocianato, di interagire con la superficie delle nanoparticelle, tramite il gruppo isotiocianato, è stata sfruttata per immobilizzare la glucosio ossidasi (GOx) e l'ammino ossidasi di siero bovino (BSAO). Questi enzimi (GOx e BSAO) immobilizzati sulla superficie delle nanoparticelle mantengono la loro attività catalitica, sebbene sia stata osservata una riduzione dell'attività catalitica. La riduzione è attribuita ad effetti sterici, ad esempio, alla minor accessibilità del sito attivo al substrato, a cambi conformazionali nella struttura enzimatica in seguito all'immobilizzazione o alla parziale denaturazione dell'enzima nelle condizioni sperimentali usate per la sua immobilizzazione.

Il complesso SAMN@GOx è stato usato per sviluppare un biosensore elettrochimico per la determinazione del glucosio in campioni alimentari (Biosensors and Bioelectronics, 2012). Nel frattempo, il complesso SAMN@BSAO è stato usato per produrre prodotti citotossici, quali perossido di idrogeno, aldeidi ed ammoniaca, in cellule tumorali (International Journal of Nanomedicine, 2012). La presenza del nanocatalizzatore può essere convenientemente monitorata mediante la sua fluorescenza e può essere rapidamente rimosso tramite

applicazione di un campo magnetico esterno e riutilizzato diverse volte senza perdere la sua efficienza catalitica.

Il presente lavoro di tesi ha prodotto i seguenti manoscritti:

M. Magro, G. Sinigaglia, L. Nodari, J. Tucek, K. Polakova, Z. Marusak, S. Cardillo, G. Salviulo, U. Russo, R. Stevanato, R. Zboril, F. Vianello, 2012. Charge binding of rhodamine derivative to OH⁻ stabilized nanomaghemite – Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. Accepted for publication in *Acta Biomaterialia*, IF. 4.822.

G. Sinigaglia, M. Magro, G. Miotto, S. Cardillo, E. Agostinelli, R. Zboril , E. Bidollari and F. Vianello, 2012. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. Accepted for publication in *International Journal of Nanomedicine*, IF. 4.976.

D. Baratella, M. Magro, G. Sinigaglia, R. Zboril, G. Salviulo and F. Vianello, 2012. A glucose biosensor based on novel maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles. Submitted for publication in *Biosensors and Bioelectronics*, IF. 5.361.

Abbreviazioni

BSA	Albumina di siero bovino
BSAO	Ammino ossidasi di siero bovino
GOx	Glucosio ossidasi
HQ	Idrochinone
HRP	Perossidasi di rafano
RITC	Rodamina B isotiocianato
SAMN	Surface Active Maghemite Nanoparticle
SPM	Spermina tetraidrocloridrato

SCOPO DELLA TESI

Le nanotecnologie stanno oggi attraversando un periodo di grande e rapida evoluzione, riscuotendo un sempre maggior interesse per le possibili applicazioni sia in ambito medico-scientifico che analitico e nella catalisi chimica, come agenti di contrasto in imaging di risonanza magnetica nucleare, nell'uso come vettori farmaceutici sito specifici e nella separazione e purificazione di molecole biologiche e cellule (Shubayev V.I., 2009). Nell'ambito di tale disciplina, infatti, è studiata, ed applicata allo sviluppo di nuovi processi e dispositivi, la combinazione tra le proprietà chimiche delle strutture molecolari in soluzione e quelle fisiche, proprie della fase macroscopica. Sono ormai disponibili in commercio differenti tipi di nanoparticelle, che mostrano proprietà così diverse tra loro da richiedere appropriati sistemi di classificazione. In altre parole, per poter comprendere il comportamento di tali nanostrutture è necessario disporre del maggior numero possibile di elementi di caratterizzazione, sia fisici che chimici.

Le nanoparticelle utilizzate nel presente progetto di ricerca, chiamate SAMN (surface active maghemite nanoparticles), sono sintetizzate nel laboratorio del Prof Vianello, del Dipartimento di Chimica Biologica, mediante un semplice ed innovativo metodo di sintesi, in un intervallo di dimensioni attorno ai 10 nm e presentano caratteristiche superficiali peculiari, come un'eccellente stabilità colloidale senza alcun rivestimento superficiale, al contrario degli esempi presenti attualmente in letteratura. Un brevetto internazionale, che coinvolge l'Università di Padova, è stato depositato a protezione del metodo di sintesi e di alcune applicazioni.

Lo scopo di questo progetto di ricerca verte su:

- La caratterizzazione del materiale sintetizzato, tramite l'impiego di diverse tecniche strumentali, quali, microscopia a trasmissione elettronica, analisi spettrofotometriche e spettrofluorimetriche, spettroscopia infrarosso e Mossbauer, misure di magnetizzazione nell'intervallo di temperatura tra 2 K e 300 K e mediante studi di diffrazione a raggi x su polveri (XRPD). Tale caratterizzazione è stata condotta in collaborazione con il Dipartimento di

Scienze Chimiche e il Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova e il Centro di Ricerca per i Nanomateriali dell'Università "Palacky" ad Olomouc (Repubblica Ceca).

- La caratterizzazione delle proprietà delle nanoparticelle in sospensione acquosa. Le caratteristiche superficiali delle SAMN sono responsabili del loro comportamento nel solvente e si è provveduto quindi, a studiarne la cinetica di risospensione, in mezzi diversi, al fine di individuare quello che maggiormente ne stabilizza la superficie.
- La funzionalizzazione superficiale delle SAMN. La funzionalizzazione delle SAMN è stata condotta con il duplice scopo di studiarne, da un lato la superficie tramite l'impiego di sonde fluorescenti, dall'altro con l'obiettivo di valutare la possibilità di legami diretti tra macromolecole e particella.
- Lo sviluppo di nuove applicazioni bio-nanotecnologiche delle nanoparticelle. In particolare, obiettivo finale del progetto, in vista di un possibile sfruttamento industriale del materiale innovativo prodotto in laboratorio, è l'individuazione, lo sviluppo e la messa a punto di applicazioni, quali biosensori elettrochimici competitivi rispetto ai dispositivi già esistenti, originali sistemi di purificazione di proteine e supporti multifunzionali per l'immobilizzazione di enzimi.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

Le nanotecnologie stanno oggi attraversando un periodo di grande e rapida evoluzione, riscuotendo un sempre maggior interesse per le possibili applicazioni sia in ambito medico-scientifico che analitico e nella catalisi chimica, come agenti di contrasto in imaging in risonanza magnetica, l'uso come vettori farmaceutici sito specifici, separazione e purificazione di molecole biologiche e cellule (Shubayev V.I., 2009). Esse infatti permettono di combinare le proprietà chimiche delle strutture molecolari in soluzione a quelle fisiche proprie della fase macroscopica. Sono ormai disponibili in commercio differenti tipi di nanoparticelle che mostrano proprietà così diverse tra loro da richiedere appropriati sistemi di classificazione. Alcune caratteristiche chimico fisiche, ad esempio, si osservano solo al di sotto di una certa soglia dimensionale, come il surface plasmon resonance nel caso di nanoparticelle d'oro (Van Dijk M.A., 2006) o il superparamagnetismo per nanoparticelle di alcuni ossidi di ferro (Zboril R., 2002). Molte caratteristiche possono essere tipiche di nanoparticelle con una certa forma, come i nanotubi, e non di altre dello stesso materiale e dimensioni, ma di forma diversa. In altre parole, per poter dare una corretta interpretazione dei risultati ottenuti dall'applicazione di nanoparticelle è necessario disporre del maggior numero possibile di elementi di caratterizzazione delle stesse, sia fisica (immagini al microscopio a trasmissione elettronica, spettri UV-Visibile, diffrazione ai raggi X, spettri in spettroscopia infrarossa, misure di magnetizzazione, analisi in calorimetria a scansione differenziale) che chimica (potenziale Z, stabilità in sospensione al variare del solvente, reattività, stabilità dei complessi con altre specie chimiche). Nel corso di questa tesi si sono utilizzate nanoparticelle di maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) dalle proprietà superparamagnetiche (paragrafo 1.1), sintetizzate nel laboratorio del Prof Vianello, il cui metodo di sintesi, protetto da brevetto internazionale

(Magro M., 2010), avviene esclusivamente in solvente acquoso, eliminando in tal modo i costi di smaltimento dei solventi organici. Si può quindi affermare che la sintesi avviene nel rispetto dell'ambiente e può essere considerata una "green chemistry reaction".

Le nanoparticelle magnetiche, trovano diverse applicazioni in letteratura grazie alla loro capacità di migrare quando immerse in un campo magnetico (Jun Y.W., 2008). La possibilità inoltre, di funzionalizzarne la superficie permette la formazione di complessi con molecole di interesse e quindi la separazione e purificazione tramite magnetoforesi (Fan J., 2003). Il maggior rapporto superficie su volume le rende particolarmente adatte come sistema di amplificazione del segnale in biosensori gravimetrici.

1.1 Nanoparticelle di ossido di ferro

In natura, gli ossidi di ferro esistono in varie forme: le più comuni sono la magnetite (Fe_3O_4), la maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e l'ematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Le proprietà di questi materiali sono riassunte nella tabella 1 (Teja A.S., 2009).

Proprietà	<i>ematite</i>	<i>magnetite</i>	<i>maghemite</i>
Formula molecolare	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Densità (g/cm^3)	5.26	5.18	4.87
Temperatura di fusione ($^\circ\text{C}$)	1350	1583 - 1597	-
Durezza	6.5	5.5	5
Tipo di magnetismo	ferromagnetico debole o antiferromagnetico	ferromagnetico	ferrimagnetico
Temperatura di Curie (K)	956	850	820 - 986
Sistema cristallografico	romboedrico, esagonale	cubico	cubico o tetraedrico

Tabella 1: Proprietà fisiche e magnetiche degli ossidi di ferro.

Nell'ematite, gli anioni dell'ossigeno si strutturano in modo esagonale con gli ioni di Fe^{3+} che occupano i siti ottaedrici. Nella magnetite e nella maghemite, gli ioni di ossigeno sono posizionati in una struttura cubica strettamente condensata. La

magnetite presenta gli ioni Fe^{3+} distribuiti in modo casuale tra siti ottaedrici e tetraedrici e gli ioni Fe^{2+} nei siti ottaedrici.

La maghemite, forma allotropica della magnetite, possiede una struttura simile a quella della magnetite, ma ne differisce per la presenza esclusiva di ioni ferro allo stato trivalente (figura 1).

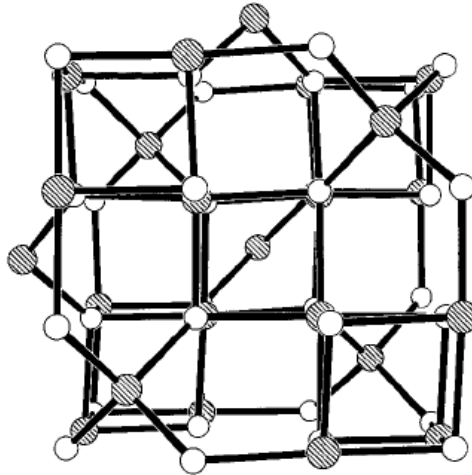


Figura 1: Struttura del cristallo di maghemite dove i cerchi ombreggiati rappresentano il ferro mentre quelli bianchi l'ossigeno (Zboril R., 2002).

Proprietà magnetiche degli ossidi di ferro

Gli ossidi di ferro sono caratterizzati dal possedere proprietà magnetiche.

I fenomeni magnetici nei materiali sono conseguenza di cariche elettriche in movimento, in particolare elettroni e nuclei degli atomi che generano campi magnetici per effetto dei loro spin. Non tutti i materiali sono magnetici e questo perché, nella maggior parte dei casi, gli spin magnetici si annullano a vicenda e la somma vettoriale dei momenti magnetici è nulla.

Per descrivere la forza e la tipologia di magnetizzazione di un materiale, generalmente si considerano tre parametri fondamentali:

- H_c , il campo coercitivo cioè il campo magnetico esterno necessario affinché la magnetizzazione del materiale venga ridotta a zero; questo parametro rappresenta anche l'energia minima richiesta per l'inversione di magnetizzazione del materiale.
- M_s , la magnetizzazione di saturazione, vale a dire il massimo valore di magnetizzazione che il materiale può raggiungere sotto l'azione di un campo magnetico esterno.

- M_R , la magnetizzazione residua che indica il valore di magnetizzazione rimanente in seguito all'allontanamento del campo magnetico esterno.

In generale i materiali magnetici sono caratterizzati dalla presenza di dipoli magnetici generati dallo spin dei loro elettroni; ciascuno di questi elettroni può assumere un'orientazione parallela o antiparallela rispetto ad eventuali campi magnetici esterni. Questa tipologia d'interazione genera un effetto magnetico macroscopico misurabile. I materiali magnetici si classificano in quattro tipi, a seconda della loro risposta all'applicazione di un campo magnetico esterno, paramagnetici, ferromagnetici, ferrimagnetici e antiferromagnetici (Halliday D., 1996). Il materiale paramagnetico è caratterizzato dalla presenza di dipoli magnetici orientati in maniera casuale che possono allinearsi solo in presenza di un campo magnetico esterno. Inoltre quando il campo magnetico esterno viene rimosso, i dipoli magnetici interni del materiale paramagnetico tornano a disporsi in maniera casuale senza acquisire una magnetizzazione residua (Figura 2).

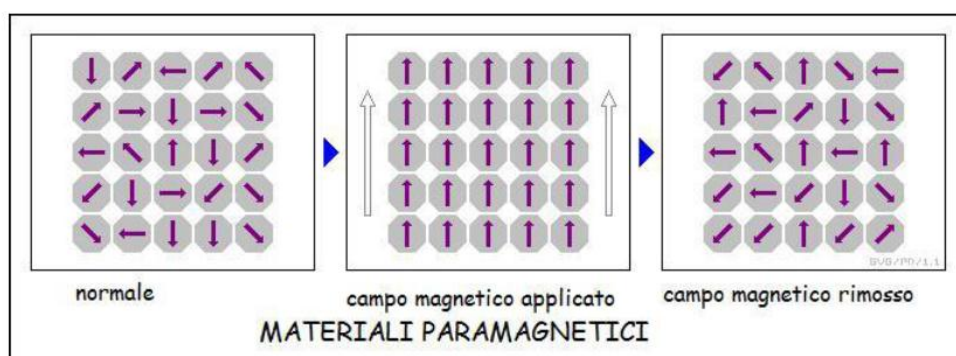


Figura 2: Rappresentazione schematica dell'orientamento dei dipoli magnetici di un materiale paramagnetico: orientamento casuale in assenza di un campo magnetico (a sinistra e a destra) e l'orientamento ordinato dei dipoli in presenza del campo magnetico esterno (al centro) (Halliday D., 1996).

Per quanto riguarda i materiali antiferromagnetici, contrariamente a quanto accade per i materiali ferromagnetici in cui la configurazione di minima energia si ha per spin paralleli, l'interazione tra gli atomi è tale da realizzare una configurazione di minima energia quando gli spin sono antiparalleli. La magnetizzazione di questi materiali, al di sotto di una certa temperatura detta di Néel, ed in assenza di un campo magnetico esterno, è praticamente nulla. La temperatura di Néel è la temperatura alla quale un materiale antiferromagnetico

diventa paramagnetico, vale a dire la temperatura alla quale l'ordinamento macroscopico dei domini magnetici cristallini nel materiale viene distrutto. Anche quando vi è un campo magnetico esterno, i dipoli magnetici tendono a mantenere la disposizione antiferromagnetica. Invece, in un materiale ferrimagnetico i momenti magnetici degli atomi in differenti regioni sono antiparalleli, come nei materiali antiferromagnetici, ma nei materiali ferrimagnetici, non essendo i momenti antiparalleli uguali in modulo, ne deriva un momento magnetico risultante non nullo e quindi il materiale presenta una magnetizzazione spontanea. Il ferrimagnetismo è detto anche antiferromagnetismo scompensato, proprio per il fatto che i momenti magnetici nei sottoreicoli non sono uguali in modulo (Halliday D., 1996).

Metodi di sintesi delle nanoparticelle in ossidi di ferro

Esistono diversi metodi per sintetizzare le nanoparticelle, principalmente due approcci vengono utilizzati nella loro sintesi: un metodo che prevede l'uso di surfattante ed uno solvente-dipendente. Tra le procedure di sintesi che coinvolgono l'uso di surfattanti vi è la co-precipitazione, basata nella simultanea precipitazione di Fe^{2+} e di Fe^{3+} in un mezzo acquoso basico (Kang Y.S., 1996). I prodotti che si ottengono però, sono caratterizzati dall'aver un basso grado di cristallinità. In alternativa, si possono utilizzare microemulsioni di acqua-olio in presenza di molecole di surfattante, la cui funzione è di stabilizzare le piccole gocce di acqua in solvente organico, le quali fungono da nano-reattori per la nucleazione e la crescita controllata delle nanoparticelle di ossido di ferro (Kang Y.S., 1996).

Un'altra metodica basata sull'uso di surfattanti è la sintesi colloidale di nanoparticelle in solventi organici ad alto punto di ebollizione; consiste nell'utilizzo di precursori organometallici, che subiscono una decomposizione termica, e di una miscela di surfattanti che regolano la nucleazione e la cinetica di crescita delle particelle (Park J., 2004). Sebbene questa tecnica sia in grado di produrre nanoparticelle con un'elevata cristallinità, uniformità delle dimensioni e forma, è un metodo costoso, a causa dell'utilizzo di specifici reagenti organici.

Un approccio di sintesi solvente-dipendente è quello idrotermale (Wang X., 2005); questo metodo si basa sul riscaldamento, fino ad ebollizione, di una miscela di sali di ossido di ferro in acqua. Il principio di tale tecnica è il controllo della pressione e

della temperatura della reazione, allo scopo di ottenere nanoparticelle con proprietà magnetiche ottimali. La tecnica però non permette un controllo sulle dimensioni e forme delle nanoparticelle che risultano così disomogenee.

1.2 Nanoparticelle di maghemite e loro applicazioni

Le nanoparticelle di maghemite soddisfano diversi requisiti che trovano applicazioni in campo biomedico, tra cui stabilità chimica in condizioni fisiologiche, biocompatibilità (Shubayev V.I., 2009; Veisegh O., 2010) e proprietà superparamagnetiche (Gupta A.K., 2005) (figura 3). Le proprietà superparamagnetiche permettono di direzionare le nanoparticelle mediante applicazione di un campo magnetico esterno.

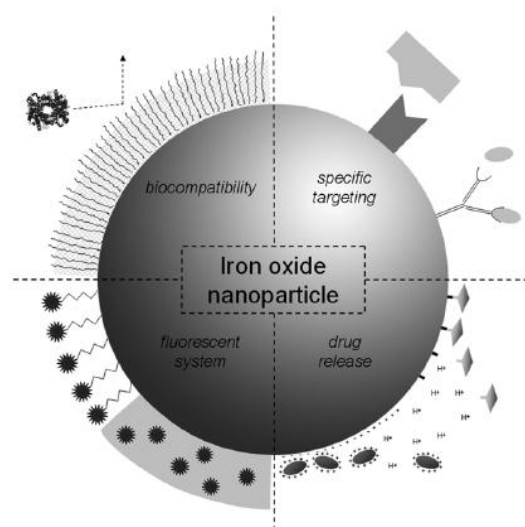


Figura 3: Possibili modificazioni superficiali delle nanoparticelle di maghemite per applicazioni biomediche (Figuerola A., 2010).

Di seguito una breve descrizione di alcuni campi in cui trovano impiego le nanoparticelle di maghemite.

Nanoparticelle in terapia

Uno dei principali problemi in ambito clinico è rappresentato dalla scarsa selettività degli agenti terapeutici verso il sito bersaglio, come nel caso dei chemioterapici, riducendo così l'efficacia nell'azione del principio attivo.

Si è quindi pensato di ovviare a questo problema impiegando le nanoparticelle come trasportatori molecolari sfruttando, da un lato la loro chimica superficiale, nel tentativo di creare dei complessi tra nanoparticella e molecola d'interesse, dall'altro, le loro proprietà superparamagnetiche che permettono di direzionarle verso un sito-specifico mediante l'applicazione di un campo magnetico esterno.

Una delle applicazioni in questo senso è rappresentata da alcune formulazioni farmaceutiche ad azione antineoplastica. Gli agenti chemioterapici infatti, sono associati ad effetti collaterali spesso debilitanti a causa della loro incapacità di distinguere le cellule cancerose da quelle sane. La coniugazione con nanoparticelle permette di ottenere delle formulazioni vantaggiose, innanzitutto creando dei sistemi a prolungata circolazione, che aumentano il tempo di permanenza in circolo del farmaco. Inoltre, attraverso un campo magnetico, le particelle vengono trasportate nel sito specifico di azione e con esse anche il principio attivo concentrando quindi, il farmaco in un unico punto. Attualmente diversi farmaci sono stati coniugati alle nanoparticelle tra cui il paclitaxel, il metotrexato e la doxorubicina (Veisegh O., 2010; Figuerola A., 2010).

Parallelamente agli agenti chemioterapici, anche i radionuclidi svolgono un'azione antitumorale poichè attraverso il loro decadimento provocano un danneggiamento del DNA inducendo l'apoptosi della cellula. Anch'essi sono stati quindi legati alle nanoparticelle creando nuove e più vantaggiose formulazioni farmaceutiche (Veisegh O., 2010).

Anche gli anticorpi esercitano un effetto antiproliferativo attraverso l'inibizione di specifici recettori che mediano la crescita cellulare: evidenze cliniche hanno dimostrato, ad esempio, la possibilità di coniugare l'anticorpo Herceptin alle nanoparticelle e rendere quindi l'azione antineoplastica selettiva verso il tumore al seno (Veisegh O., 2010).

Oltre a permettere un direzionamento del farmaco verso la sede d'azione, le nanoparticelle possono anche prevenire la degradazione delle molecole ad esse coniugate; l'aumento dell'emivita plasmatica del principio attivo migliora

chiaramente l'efficacia terapeutica, riducendo al contempo la dose di farmaco necessaria. A tal proposito, le nanoparticelle sono state complessate ad acidi nucleici nella cosiddetta terapia genica (Veisegh O., 2010). Il principio è quello di modificare l'espressione genetica, silenziando in particolare i fattori di crescita delle cellule tumorali. La presenza delle nanoparticelle favorisce l'internalizzazione per via endocitica e protegge gli acidi nucleici dalle degradazioni enzimatiche che ne impediscono il raggiungimento della cellula bersaglio. Negli ultimi anni sta crescendo sempre più l'interesse verso una nuova tecnica terapeutica, detta ipertermia, basata sull'induzione selettiva di apoptosi delle cellule tumorali attraverso un riscaldamento specifico della regione danneggiata. Essa consiste nella dispersione a livello del tessuto bersaglio delle nanoparticelle nelle quali, applicando un campo magnetico esterno, si induce magnetizzazione. Se tale campo esterno viene applicato all'opportuna frequenza, l'energia magnetica viene convertita in energia termica, riscaldando le cellule nelle quali le nanoparticelle sono presenti. Se la temperatura viene mantenuta a circa 42°C per almeno 30 minuti, la massa tumorale va incontro a degradazione (Figuerola A., 2010).

Il rivestimento superficiale delle nanoparticelle nell'ipertermia gioca un ruolo essenziale. Si è visto infatti, come rivestimenti diversi delle nanoparticelle portassero a risultati differenti in termini di efficacia del trattamento. Ad esempio, la copertura con amminosilano ha rivelato risultati promettenti, mentre le nanoparticelle rivestite con destrano non presentano significative differenze rispetto ai controlli in esame (Figuerola A., 2010).

Nanoparticelle in diagnostica

Studi riportati in letteratura hanno dimostrato la possibilità di sfruttare le nanoparticelle anche in applicazioni diagnostiche, ad esempio nelle tecniche di risonanza magnetica (Llandro J., 2010). In questo specifico caso, infatti, esse vengono utilizzate come agenti di contrasto per cui il loro accumulo a livello della sede tumorale, permette il rilevamento del tessuto dato il loro effetto sui tempi di rilassamento dei nuclei di idrogeno dell'acqua. Funzionalizzando opportunamente la superficie delle particelle, inoltre, è possibile convogliare alcune sonde, sia organiche che inorganiche, che si localizzano in maniera specifica nella sede

neoplastica. In questo modo le particelle fungono di conseguenza da biomarkers tumorali, utilizzabili anche a fini diagnostici (Veisegh O., 2010; Figuerola A., 2010).

1.3 Funzionalizzazione delle nanoparticelle con biomolecole

L'aspetto fondamentale dell'interazione nanoparticelle - biomolecole, riguarda il mantenimento dell'integrità della parte organica coniugata alla superficie delle nanoparticelle. Questo significa che, sia la struttura tridimensionale che la funzione biologica della proteina, devono essere mantenute (Aubin-Tam M.E., 2008). In particolare, le nanoparticelle magnetiche sono ampiamente sfruttate per il legame con molecole biologiche grazie alla loro capacità di rispondere ad un campo magnetico esterno: questo consente di poter utilizzare la separazione magnetica per purificare ed identificare diverse specie biologiche e chimiche. I vantaggi dell'utilizzo di queste tecniche sono molteplici: la loro semplicità, la velocità con cui avviene la separazione magnetica e l'elevata specificità con cui possiamo identificare una molecola da una miscela complessa (Koneracká M., 2006).

Esistono diverse strategie per coniugare una proteina alla superficie della nanoparticella quali, l'adsorbimento elettrostatico, il legame covalente di un ligando alla superficie, il legame di una proteina ad un cofattore coniugato alla nanoparticella ed il legame diretto della proteina ad essa (Figura 4) (Aubin-Tam M.E., 2008).

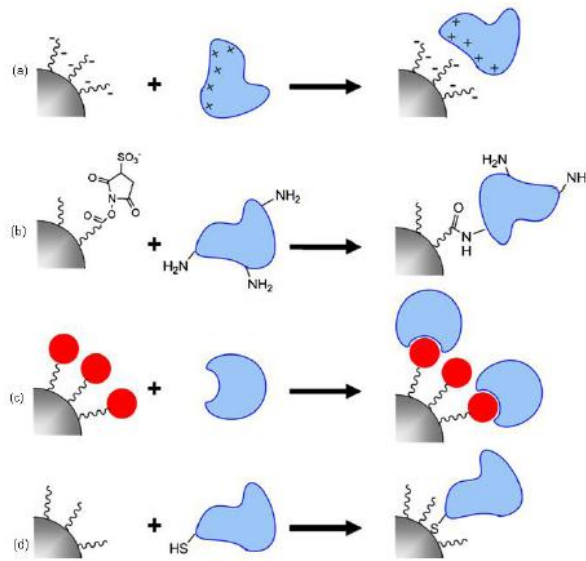


Figura 4: Strategie di legame nanoparticelle - proteina: (a) adsorbimento elettrostatico della proteina, (b) legame covalente del ligando alla nanoparticella, (c) legame della proteina ad un cofattore legato alla nanoparticella, (d) legame diretto degli aminoacidi della proteina al core della nanoparticella (Aubin-Tam M.E., 2008).

L'adsorbimento elettrostatico, (Figura 4a), è il metodo più semplice poiché non richiede alcuna reazione chimica. L'interazione è favorita da opportuni valori di pH e a bassa forza ionica del mezzo, di modo che la superficie delle nanoparticelle e le catene laterali della proteina siano attratte elettrostaticamente. Trattandosi però, di un'interazione non-specifica, la proteina può interagire con la superficie della nanoparticella con qualsiasi orientazione.

Il legame covalente della proteina ai gruppi funzionali presenti sulla superficie della nanoparticella (Figura 4b) è una tecnica che dipende principalmente dalla presenza di gruppi chimici che prendono parte alla reazione. Inoltre questo approccio è influenzato dalla chimica di superficie della nanoparticella, cioè dalla tipologia, dalla concentrazione e distribuzione dei gruppi funzionali. I gruppi reattivi delle proteine con cui il ligando interagisce possono essere i gruppi amminici dei residui di lisina o i gruppi tiolici delle cisteine. Un reattivo di condensazione molto usato è l'1-etil-(3-dimetilaminopropil) carbodiimmide (EDC) che favorisce il legame tra ammine primarie e gruppi carbossilici.

Il legame della proteina ad un cofattore coniugato alla superficie della nanoparticella (Figura 4c) si basa sull'affinità specifica del cofattore per il suo

ligando. Un esempio è il sistema biotina-avidina, la cui costante di associazione è elevata ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Coniugando molecole di biotina alla superficie delle nanoparticelle, si induce il legame della biotina con la avidina, la quale, con i suoi quattro siti di legame, è in grado di legare più molecole di biotina. Il vantaggio di questo sistema è che esiste una grande varietà di ligandi che possono essere funzionalizzati con la biotina, inoltre è un metodo versatile per ottenere un'interazione specifica (Green N.M., 1990). Un'altra strategia è quella di funzionalizzare le nanoparticelle con anticorpi; i coniugati nanoparticella - anticorpo sono molto utilizzati in tecniche di imaging per specifiche proteine, o per localizzare alcuni recettori cellulari (Ackerson C.J., 2006).

Il legame diretto della proteina agli atomi di superficie della nanoparticella (Figura 4d), è uno dei metodi più utilizzati per la creazione di nanosensori (Aubin-Tam M.E., 2008). Tra le reazioni di legame diretto, vi sono quelle che sfruttano la chimica dei tioli, oppure quelle che impiegano un His-tag (catena peptidica costituita da 6 residui di istidina), che è in grado d'interagire direttamente con gli atomi di superficie quali Zn, Ni, Cu, Fe, Co e Mn. Un aspetto importante riguarda l'ingombro sterico sulla superficie della nanoparticella: potrebbe essere difficile per la proteina target raggiungere la superficie se i gruppi funzionali presenti su di essa sono densamente impaccati o troppo ingombranti.

Nonostante il legame diretto di biomolecole sulla superficie delle nanoparticelle risulti essere stabile e non influenzi le proprietà delle particelle stesse, viene poco utilizzato perchè la formazione di tale legame comporta la conoscenza delle caratteristiche superficiali delle nanoparticelle e studi preliminari per valutare la capacità di legare diverse biomolecole nelle diverse condizioni sperimentali. Il problema principale nel legame proteina-nanoparticella è dovuto al fatto che i siti di legame presenti sulle proteine possono essere molteplici e dunque provocare un legame della proteina alle nanoparticelle con una orientazione casuale, che può avere effetti finali indesiderati, quali la denaturazione e quindi la perdita di attività o il blocco del sito attivo da parte della nanoparticella (figura 5). Nel caso degli enzimi, il legame con strutture nanometriche può provocare una modificazione del sito attivo, tale da ridurre l'attività dell'enzima: studi condotti attraverso simulazioni di "dinamica molecolare" hanno dimostrato che a differenti orientazioni del sistema enzima-nanostruttura, corrispondono diverse mobilità

conformazionali del sito attivo e dunque diverse caratteristiche cinetiche dell'enzima (Ye X.S., 2009).

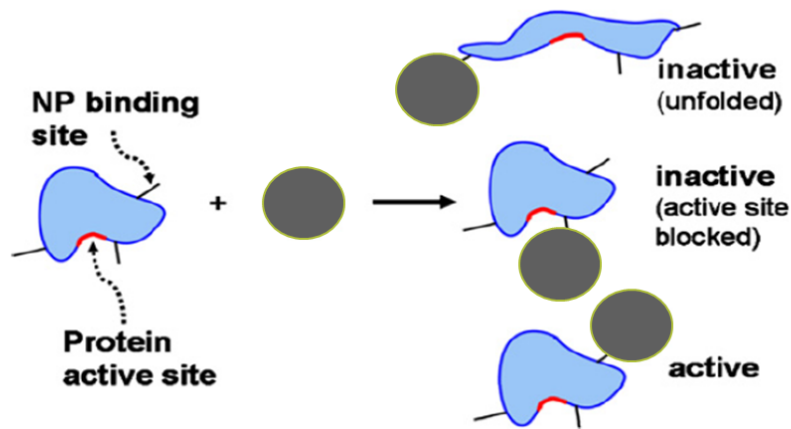


Figura 5: Possibili modi di interazione nanoparticella – proteina (Aubin-Tam M.E., 2008).

Una volta ottenuti i coniugati nanoparticella-proteina è opportuno separarli e purificarli. Esiste una grande varietà di approcci che possono essere sfruttati a questo scopo e la scelta della tecnica più adatta dipende anche dalla tipologia di materiale di cui sono costituite le nanoparticelle. Nel caso di nanoparticelle con proprietà magnetiche, come quelle utilizzate in questo lavoro, per purificare i coniugati nanoparticella-proteina è sufficiente utilizzare un magnete. L'introduzione del magnete difatti, porta alla separazione dei coniugati nanoparticelle – proteina dalla proteina libera, che rimane invece in soluzione. Questo tipo di tecnica di separazione è utile per applicazioni nelle quali una proteina specifica deve essere isolata da una miscela di proteine. Altri tipi di tecniche utilizzate per purificare il coniugato nanoparticella-proteina sono: la cromatografia a scambio ionico, la gel filtrazione, l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e l'elettroforesi. Quest'ultima utilizzata per separare una miscela di biomolecole di diverso peso molecolare e diverso punto isoelettrico.

1.4 Biomolecole utilizzate nello studio del legame con nanoparticelle magnetiche

Le proteine utilizzate per lo svolgimento di questo lavoro sono l'albumina di siero bovino (BSA), la perossidasi da rafano (HRP), l'avidina, la glucosio ossidasi (GOx) e

l'ammino ossidasi di siero bovino (BSAO).

1.4.1 Albumina di siero bovino

L'albumina è una delle proteine sieriche più abbondanti e più studiate vista la facilità con cui può essere purificata in grande quantità a partire dal sangue bovino. Essa viene sintetizzata a partire dal fegato, sottoforma di precursore inattivo chiamato proalbumina e la sua sintesi rappresenta circa un ottavo della produzione proteica totale epatica. La proalbumina, una volta formata nel reticolo endoplasmatico rugoso arriva all'apparato del Golgi dove viene processata per formare l'albumina. Questa, infine, viene concentrata in granuli secretori per essere riversata nei sinusoidi epatici ed entrare nel circolo sanguigno (Peters T., 1977).

La sua economicità e le sue caratteristiche permettono di utilizzarla in campo biotecnologico, in numerose applicazioni quali, saggi ELISA, analisi immunoistochimiche e per stabilizzare gli enzimi durante saggi di digestione enzimatica. Nel caso dei saggi ELISA la BSA rappresenta una molecola bloccante, ossia una molecola inerte che lega i siti liberi del supporto adsorbente, impedendo agli anticorpi di legare epitopi non specifici. In questo modo tale proteina è in grado di minimizzare il segnale aspecifico che può comparire nel corso dell'analisi e ridurre quindi la possibilità di rilevazione di falsi positivi (Steinitz M. 2000).

La BSA, che presenta una struttura molto simile all'albumina umana, è costituita da una singola catena di 607 aminoacidi con un peso molecolare di 66 kDa, ha punto isoelettrico di 4.7 e non presenta alcun grado di glicosilazione (Peters T. 1977).

La sua struttura secondaria è stata definita come "loop-and-link" poiché è formata da una serie di nove loop doppi, collegati a dei piccoli segmenti amminoacidici.

Questa organizzazione è permessa dalla presenza di 17 legami disolfuro che avvengono tra coppie di cisteine ed è responsabile della stabilità e flessibilità della BSA. La sua forma tridimensionale è stata determinata mediante diffrazione a raggi X e presenta una dimensione di $1,7 \times 4,2 \times 4,2 \text{ nm}^3$ (Bloomfield V., 1966). La struttura è costituita prevalentemente da α -eliche, circa il 67%, e per la percentuale restante è formata da regioni random coil mentre non contiene foglietti- β (figura 6) (Carter D.C., 1994).



Figura 6: *Struttura terziaria dell'albumina di siero bovino.*

L'albumina sierica presenta numerose funzioni: innanzitutto contribuisce per l'80% alla pressione colloidale del sangue, assicurandone il mantenimento della composizione e lo scorrimento nel sistema vasale, e ne mantiene costante il pH. Alcuni domini di proteina possiedono poi la capacità di legare due particolari ligandi: gli acidi grassi a lunga catena e la bilirubina. Nel primo caso lo scopo è quello di trasportare e rendere più solubili gli acidi grassi nel plasma, nel secondo legare e inattivare un metabolita tossico (Emerson T.E., 1989).

1.4.2 Perossidasi di rafano

La perossidasi di rafano è un enzima contenente eme estratto dal rafano, una pianta erbacea perenne coltivata nelle zone temperate. Come per la BSA, anche la perossidasi viene utilizzata in numerose applicazioni biotecnologiche, quale componente di kit diagnostici basati su test immunologici, chemiluminescenti e per il trattamento delle acque industriali di scarico (Veitch N.C., 2004). La perossidasi catalizza la reazione di ossidazione dei fenoli, presenti ad esempio, nelle acque di scarico, utilizzando come ossidante l'acqua ossigenata, con conseguente formazione e precipitazione dei prodotti ossidati. Poiché i fenoli rappresentano la maggior fonte di inquinamento di queste acque, il trattamento con la perossidasi ne riduce la tossicità (Cooper V.A., 1996).

La perossidasi di rafano è costituita da una singola catena polipeptidica di 308 aminoacidi e un peso molecolare di 44 kDa. Presenta un grado di glicosilazione variabile che va dal 18 al 22% e un punto isoelettrico di 7.2.

La struttura terziaria è assicurata da 4 ponti disolfuro che collegano cisteine lontane tra loro mentre la struttura secondaria è costituita prevalentemente da α -eliche, da una piccola zona di foglietti- β e le dimensioni del cristallo sono di $6,2 \times 3,5 \times 7,5 \text{ nm}^3$ (Vianello F., 2000).

La molecola è composta dal gruppo eme e due atomi di calcio. I siti di legame per il calcio sono collocati in posizione distale e l'altro prossimale rispetto al piano dell'eme e sono collegati a questa regione tramite un sistema di legami idrogeno (figura 7). Gli ioni calcio sono essenziali per l'integrità strutturale e funzionale dell'enzima, difatti la perdita di questi ioni porta ad una diminuzione dell'attività e della stabilità dell'enzima oltre che a un cambiamento dell'intorno del gruppo eme (Veitch N.C., 2004).

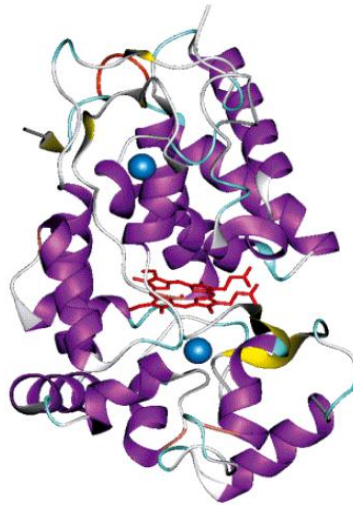
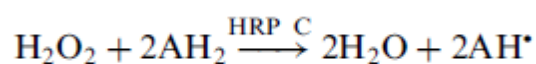


Figura 7: Struttura tridimensionale dell'enzima perossidasi di rafano. In blu sono riportati gli ioni calcio mentre in rosso il gruppo eme (Veitch N.C., 2004).

La perossidasi catalizza la seguente reazione generale usando come agente ossidante il perossido di idrogeno (H_2O_2):



dove AH_2 rappresenta il substrato riducente e AH^\bullet il radicale prodotto. Tipici substrati sono fenoli aromatici, fenoli acidi, indoli, ammine e composti solfonati.

Nella pianta l'enzima perossidasi è implicato nel metabolismo dell'acido indol-3-acetico, nel processo di lignificazione e di cross-linking tra le pareti cellulari e presenta la capacità di conferire resistenza alle infezioni. Infatti, la specie radicalica che si forma, AH \cdot , nelle piante è coinvolta in reazioni di cross-linking tra polisaccaridi, tirosine e prende parte in reazioni coinvolte nella biosintesi della lignina e nella formazione della suberina. Queste reazioni vengono attivate in risposta ad un segnale esterno, ad esempio un danno tessutale alla pianta (Veitch N.C., 2004).

1.4.3 Avidina

L'avidina è una glicoproteina che viene estratta dall'albume di uova di origine aviaria, di rettili e di anfibi e viene impiegata in campo biotecnologico nelle applicazioni di tipo diagnostico (Zerega B., 2001). Presenta la più elevata affinità ($K_a \approx 10^{15} M^{-1}$) finora conosciuta per il suo naturale ligando, la biotina.

L'avidina è una proteina basica tetramerica costituita da quattro subunità identiche ciascuna contenente 128 aminoacidi, ha un peso molecolare di 67 kDa, presenta un punto isoelettrico di 9.5 e un grado di glicosilazione pari a circa al 10% del suo peso totale. Dalla risoluzione della struttura tridimensionale, tramite cristallografia a raggi X, del tetramero, ne derivano delle dimensioni di 5.6 x 5 x 4 nm³ (Zsila F., 2009). Ogni monomero è costituito da otto foglietti- β antiparalleli, che insieme vanno a formare un classico β -barrel (Figura 8).

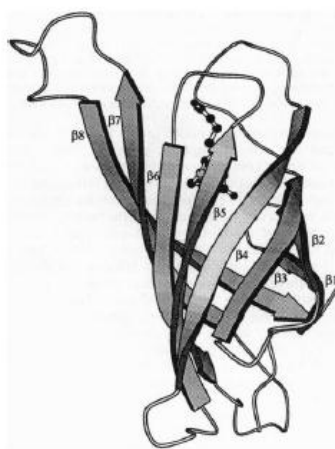


Figura 8: Rappresentazione del folding di un monomero di avidina-biotina, con gli otto filamenti antiparalleli del β -barrel (Livnah O., 1993).

La struttura secondaria dell'avidina è costituita da circa il 70% di foglietti- β e la restante da strutture disordinate a random coil, senza la presenza di α -eliche. Dalla struttura terziaria dell'avidina si individuano tre regioni di interazione monomero-monomero; queste hanno il compito di contribuire alla rigidità della struttura quaternaria e prendono parte al legame con la biotina (Figura 9).

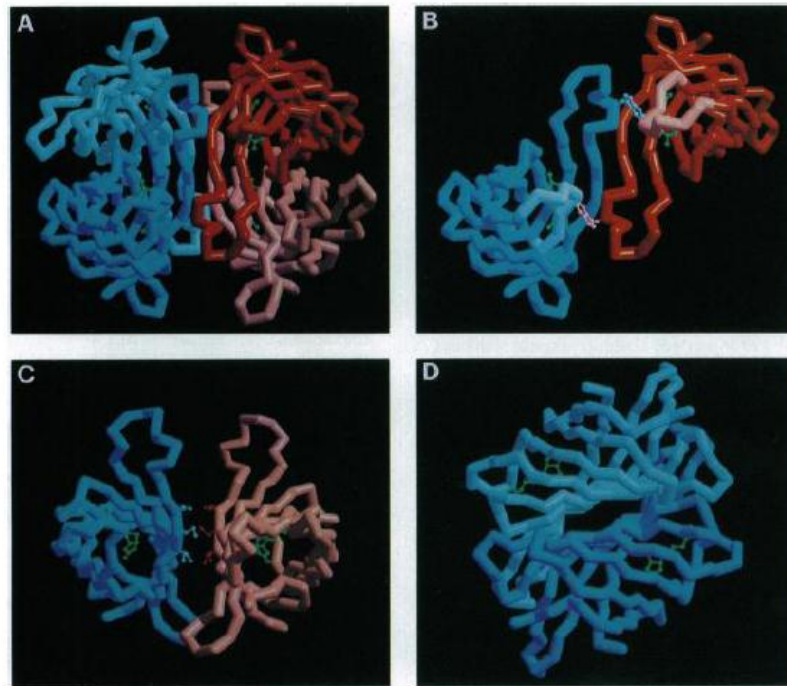


Figura 9: Rappresentazione della struttura quaternaria dell'avidina. (A) Struttura quaternaria del tetramero di avidina. Le quattro molecole di biotina legate sono indicate in verde, mentre i colori dei monomeri sono numerati come segue: 1, blu; 2, rosso; 3, rosa; 4, celeste. (B) Interazione 1-2 che avviene tra i monomeri 1 e 2. (C) Interazione 1-3 tra i monomeri 1 e 3. (D) Interazione 1-4 tra i monomeri 1 e 4 (Livnah O., 1993).

La maggior parte delle interazioni coinvolte tra monomeri sono forze di van der Waals, ma anche legami ad idrogeno che interessano i residui aminoacidici polari e le molecole di acqua (Figura 9D). Il sito di legame per la biotina è localizzato all'estremità del β -barrel e questo è caratterizzato dalla presenza di aminoacidi polari ed aromatici che prendono parte al legame. Inoltre i residui aromatici nel sito di legame formano una tasca idrofobica nella quale le molecole di biotina risiedono stabilmente. Durante il binding, le molecole di biotina sostituiscono il network di molecole di solvente e uno dei loops, quello che connette il foglietto- β 3

e 4, si posiziona nel sito di legame, bloccandovi la biotina. Infatti durante tale processo, tre aminoacidi specifici del loop instaurano interazioni forti con la biotina stessa (Figura 9B).

L'avidina viene sintetizzata sottoforma di precursore, e la proteina matura viene prodotta in seguito alla perdita del peptide segnale di 24 aminoacidi durante il processo di secrezione.

Alcuni studi hanno dimostrato che la produzione di avidina avviene in risposta a diversi segnali ed in fasi diverse del ciclo vitale di un organismo (Zerega B., 2001). Nell'ovidotto di gallina, ad esempio, la sintesi di avidina è indotta da ormoni di tipo progestinico (Tuohimaa P., 1989), da danni di tipo tissutale e segnali di tipo tossico. Inoltre l'avidina risulta presente in elevate quantità sia nell'ovidotto che in altri tessuti in seguito ad un'infezione di tipo batterico e virale, mostrando una chiara correlazione con i processi infiammatori (Elo H.A., 1980): in modo particolare è stato dimostrato che l'avidina viene prodotta in coltura da mioblasti e condrociti di embrioni di pulcino in seguito ad esposizione con il lipopolisaccaride batterico (LPS) e l'interleuchina-6 (IL-6). In embrioni in via di sviluppo, l'avidina è stata poi localizzata mediante analisi immunoistochimica a livello delle fibre muscolari scheletriche e nella piastra di crescita della cartilagine. Una caratteristica funzionale importante dell'avidina è che, negli stadi finali dello sviluppo embrionale, impedisce e limita la proliferazione cellulare permettendo, tuttavia, il completamento della differenziazione.

Alla luce di queste osservazioni l'avidina, quando interagisce con la biotina extracellulare, regola la proliferazione delle cellule interferendo con la biosintesi degli acidi grassi durante la fase finale della differenziazione. Per quanto riguarda invece il suo ruolo nel processo infiammatorio ha una funzione antibiotica di inibizione della crescita microbica.

1.4.4 Biotina

La biotina, o vitamina H o B7, è una vitamina idrosolubile dal peso molecolare di 244 Da. E' contenuta nel fegato, nel latte, nel tuorlo d'uovo, nei cereali, oltre ad essere prodotta dalla flora batterica intestinale.

Strutturalmente essa presenta due anelli tra loro condensati: uno imidazolico ed uno tiofenico, a cui è poi legata una catena laterale di acido valerianico (figura 10).

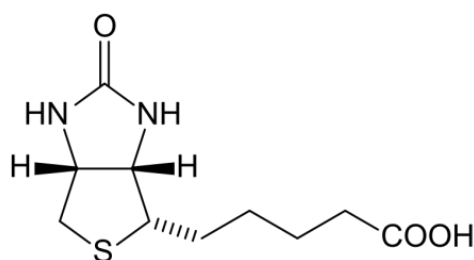


Figura 10: Formula di struttura della biotina.

Essendo una vitamina, la biotina è un composto organico essenziale che, nella sua forma biologicamente attiva, svolge la funzione di cofattore di vie metaboliche cellulari e in processi fisiologici. Essa infatti svolge nell'organismo il ruolo di trasportatrice di gruppi carbossilici, condizionando vari processi fisiologici tra cui la sintesi degli acidi grassi e la gluconeogenesi. La biotina infatti riveste il ruolo di cofattore di varie carbossilasi ATP-dipendenti, interagendo con il sito attivo dell'enzima tramite un legame amidico che coinvolge l'acido valerianico ed un residuo di lisina del sito. La reazione di carbossilazione prevede il trasferimento di una molecola di CO_2 da un donatore ad un accettore passando per un intermedio di carbossibiotina. Le principali carbossilasi umane alle quali partecipa la biotina sono: la piruvato carbossilasi, la propionil-CoA carbossilasi, la metilcrotonil carbossilasi e l'acetil-CoA carbossilasi.

Sistema avidina-biotina

La biotina è una molecola di interesse nelle applicazioni cliniche e biomediche per due sostanziali ragioni: da un lato, la presenza della catena laterale contenente un gruppo carbossilico permette di derivatizzare la biotina con composti di varia natura, tra cui anticorpi e proteine, dall'altro, essa presenta una forte affinità ($K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$) con l'avidina. Data l'elevata affinità, il complesso biotina-avidina costituisce un modello ideale in studi di bioconiugazione, rendendosi adatta ad una varietà di applicazioni. Esistono difatti in commercio diversi reagenti biotinilati, primi fra tutti numerosi anticorpi monoclonali, specifici per un'ampia gamma di

antigeni. Questo rende il sistema avidina-biotina particolarmente utile, sia per studi sperimentali che per analisi di routine di tipo immunochimico.

Esiste infatti un'ampia varietà di reagenti che possono essere marcati con la biotina e che spiega la versatilità della biomolecola (Wilchek M., 2010). Tale versatilità deriva anche dal fatto che la coniugazione di biomolecole con la biotina non altera la loro funzione biologica, lasciandone quindi intatta l'attività.

Tra le principali applicazioni del sistema avidina - biotina vi è la cromatografia di affinità, il direzionamento di farmaci sito-specifico, la diagnostica clinica, i biosensori di affinità, gli immunodosaggi.

Il principale problema nelle applicazioni della biotina, consiste nella necessità di utilizzare condizioni drastiche, come l'esposizione a formammide ad alte temperature, per il recupero dei reagenti. Ciò provoca naturalmente la denaturazione dell'avidina, impedendo pertanto un riutilizzo del sistema. Temperature di 70 - 80°C (Holmberg A., 2005) si è visto essere in grado di provocare il distacco tra biotina e avidina, senza comprometterne la struttura e l'attività e rendendo quindi i composti disponibili per altre applicazioni.

1.4.5 Glucosio Ossidasi

L'enzima glucosio ossidasi, classificato come EC 1.1.3.4, appartiene alla famiglia delle ossidoreduttasi, un gruppo di enzimi che presentano una molecola di FAD o flavina-adeninadineucleotide nel loro sito attivo e per questo definiti flavoproteine. L'enzima glucosio ossidasi catalizza la reazione di ossidazione del β -D-glucosio a D-glucono- δ -lattone e perossido di idrogeno (H_2O_2), usando l'ossigeno molecolare come accettore di elettroni. La reazione avviene in due fasi (figura 11): nella fase riduttiva l'enzima catalizza la reazione di ossidazione del glucosio a gluconolattone, che viene idrolizzato spontaneamente ad acido gluconico. In questa fase il FAD è ridotto a $FADH_2$. Nella fase ossidativa il $FADH_2$ viene ossidato a FAD reagendo con O_2 , con produzione di H_2O_2 portando l'enzima alla condizione iniziale.

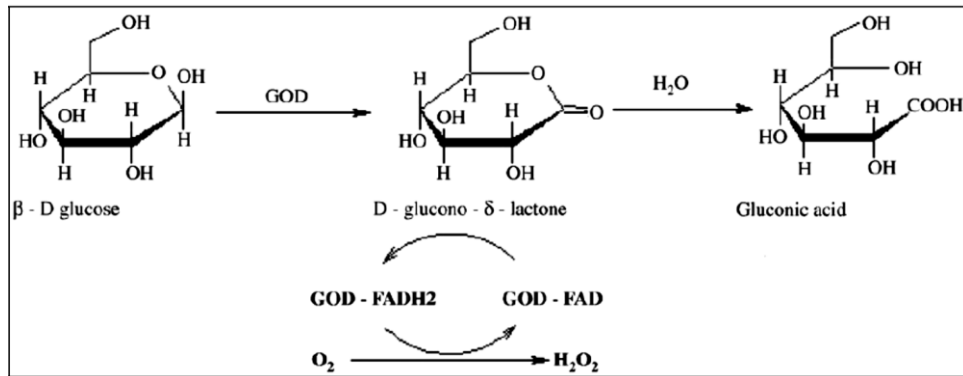


Figura 11: Schema della reazione catalizzata dalla glucosio ossidasi.

Il ruolo biologico di questo enzima è centrato sulla produzione di H_2O_2 , composto tossico in grado di danneggiare le strutture cellulari. In natura l'enzima, presente in molte specie di funghi, svolge un ruolo protettivo di questi organismi dalle infezioni batteriche. Infatti, quando l'enzima non era ancora stato identificato, gli si era attribuito il nome di penicillina A o notatina. L'enzima viene commercialmente purificato da differenti specie di funghi, tra cui l'*Aspergillus* e il *Penicillium*, sebbene l'*Aspergillus niger* sia il microrganismo più comunemente utilizzato dall'industria per la produzione e l'estrazione dell'enzima.

L'enzima si presenta come una glicoproteina dimerica (figura 12), costituita da due subunità identiche tenute legate da ponti disolfuro, contenente entrambe una molecola di FAD, legata in modo non covalente. Ogni subunità è formata da una sequenza di 587 aminoacidi. Le subunità si strutturano in due domini, uno di essi lega il FAD, l'altro il substrato. I carboidrati costituiscono il 24% in peso dell'enzima (Kalisz H.M., 1991).

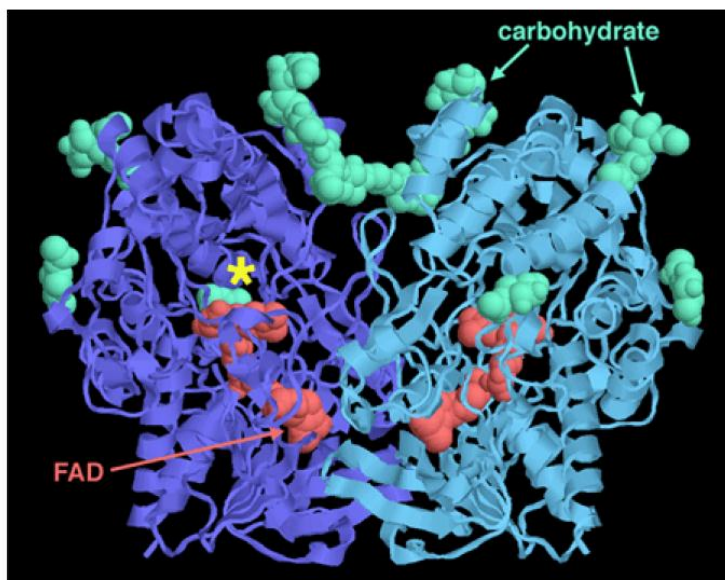


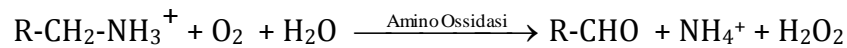
Figura 12: Struttura dell'enzima glucosio ossidasi. I due dimeri sono colorati rispettivamente in viola e in azzurro. Ciascun monomero presenta nel sito attivo una molecola di FAD (rosso). Il sito attivo in cui si lega il glucosio (simbolo *) è in una regione immediatamente superiore al FAD. Le catene di carboidrati che compongono l'enzima sono evidenziate in verde.

L'enzima ha un peso molecolare di 160 kDa, una dimensione pari a $7 \times 5.5 \times 8 \text{ nm}^3$, presenta un'elevata specificità per il glucosio, è molto stabile in un ampio intervallo di temperatura e pH e presenta un punto isoelettrico di 4.2. La struttura secondaria della glucosio ossidasi è costituita da circa il 28 % di α -eliche e il 18 % di foglietti- β (Bankar S.B., 2009).

L'enzima è largamente impiegato nell'industria alimentare, farmaceutica e chimica, con un'ampia varietà di applicazioni, dai biosensori per il glucosio alle celle a combustibile, dalla conservazione dei cibi e delle bevande alla produzione del vino, dai prodotti per l'igiene orale alla produzione di acido gluconico (Wong C.M., 2008).

1.4.6 Amino ossidasi di siero bovino

L'amino ossidasi di siero bovino è un enzima contenente rame e appartiene ad una classe eterogenea di enzimi classificati come EC 1.4.3.6, che catalizza la reazione di ossidazione di amine primarie nelle corrispondenti aldeidi, con riduzione dell'ossigeno molecolare a perossido di idrogeno e il rilascio di ammoniaca, secondo la reazione:



La deaminazione ossidativa delle ammine avviene con un meccanismo cinetico tipo ping-pong, che si può suddividere in due passaggi; un primo passaggio vede la formazione di un complesso molecolare tra l'enzima e la poliamina seguito dalla condensazione tra il gruppo ammino terminale della poliamina e il gruppo carbonilico del cofattore generando una base di Schiff. Nel secondo passaggio la base va poi incontro a isomerizzazione e conseguente idrolisi con ossidazione del cofattore da parte dell'ossigeno molecolare (Stevanato R., 1995).

Le amino ossidasi sono enzimi ubiquitari, ampiamente distribuite in mammiferi, piante e microrganismi (procarioti ed eucarioti) (Knowles P.F., 1994). Nei mammiferi si trovano ampiamente distribuite in diversi organi e tessuti, quali cellule vascolari, adipociti, placenta, rene, milza, fegato e plasma, mostrando specificità tissutali in diverse specie. Sempre nei mammiferi, le amino ossidasi sono coinvolte in alcuni processi fisiologici che coinvolgono i segnali cellulari, la proliferazione, la differenziazione e il sviluppo cellulare, l'apoptosi e la detossificazione tissutale (Lunelli M., 2005).

Le amino ossidasi sono omodimeri glicosilati la cui componente in carboidrati rappresenta il 14% in peso dell'enzima. Le subunità hanno una dimensione compresa tra 70 e 95 kDa a seconda della specie da cui sono isolati. Ogni monomero è costituito da tre domini proteici, chiamati D2, D3 e D4 (figura 13). La differenza principale consiste nella presenza o nell'assenza del dominio N-terminale (D1), il quale si trova nell'amino ossidasi a rame in *Escherichia coli* ma non in quelle di *Arthrobacter globiformis*, *Hansenula polymorpha*, semi di pisello e in BSAO (Brazeau B.J., 2004). Il dominio N-terminale (D2), composto dai residui amminoacidici 57-161, è il più piccolo mentre il dominio C-terminale (D4) è il più grande e comprende circa 400 residui amminoacidici. I domini D2 e D3 si trovano ubicati sulla superficie più esterna mentre il dominio D4 si trova nella parte interna dell'enzima e ne ospita il sito attivo. Quest'ultimo è accessibile attraverso un lungo canale composto dai domini D3 e D4. Gli aminoacidi che compongono il canale determinano la specificità del substrato delle varie amino ossidasi (Lunelli M., 2005).

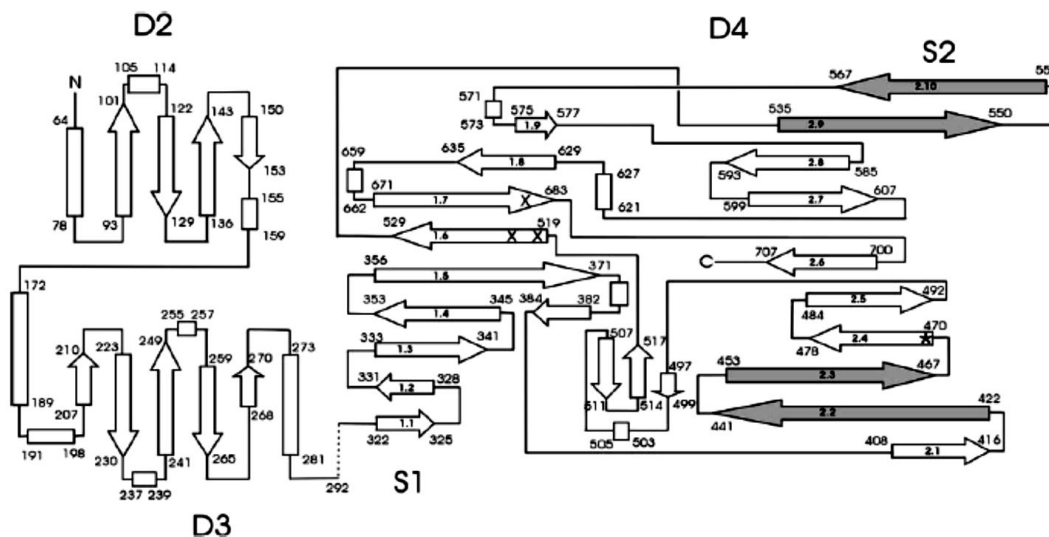


Figura 13: Struttura di uno dei due monomeri dell'enzima BSAO. I domini sono numerati da D2 a D4. I numeri indicano l'inizio e la fine degli elementi che compongono la struttura secondaria. L'asterisco mostra la posizione del chinone (TPQ), l'x quella del residuo amminoacidico di istidina che coordina lo ione rame. Le frecce in grigio scuro indicano la posizione delle due braccia lunghe che protrudono dal dominio D4 del monomero (Lunelli M., 2005).

Ogni subunità contiene un ione rame e un cofattore legato covalentemente, la 2,4,5 triidrossifenilalanina chinone (TPQ), formato all'interno del sito attivo per ossidazione di un singolo residuo di tirosina, conservato in tutte le amino ossidasi. La struttura quaternaria della BSAO è stata determinata tramite cristallografia a raggi x ed è risultato avere forma a parallelepipedo con una dimensione pari a 10.5 x 6 x 4.5 nm³ con un peso molecolare di 170 kDa (Lunelli M., 2005) (figura 14).

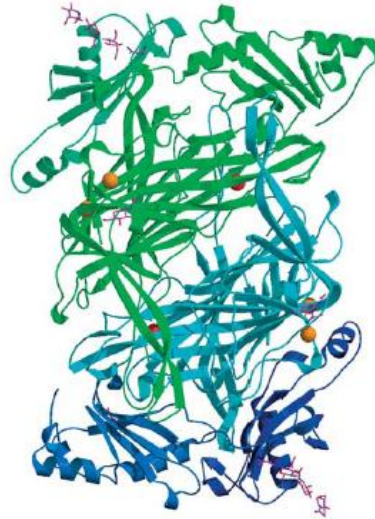


Figura 14: *Struttura quaternaria dell'amino ossidasi di siero bovino. I 3 domini che compongono ogni monomero sono rappresentati con sfumature diverse di verde e blu. I due ioni rame sono rappresentati in rosso mentre il TPQ in arancio. I carboidrati sono rappresentati con bastoncini color porpora (Lunelli M., 2005).*

Il meccanismo catalitico delle amino ossidasi è stato studiato nel corso degli ultimi anni e i risultati ottenuti, su base di studi cinetici e spettroscopici, come di quelli strutturali e funzionali usando forme mutate, non hanno ancora chiarito quale sia il ruolo fisiologico di questi enzimi. Nei batteri questi enzimi consentono l'assimilazione del carbonio e dell'azoto ossidando le amine. Negli animali, le amino ossidasi a rame sono proteine extracellulari e possono circolare libere nel siero o essere associate con la superficie esterna delle cellule, dove sono coinvolte in processi di detossificazione e nella trasmissione di segnali cellulari. Ad esempio, si è visto essere coinvolte nel rimuovere velocemente dalla circolazione l'istamina, molecola con funzione regolatoria a livello neurologico e infiammatorio. Nelle piante il ruolo delle amino ossidasi è tuttora non chiaro, sebbene sembrano svolgere un duplice ruolo; da un lato svolgono una funzione di controllo nel cross-linking della parete cellulare durante il suo sviluppo, dall'altro svolgono un ruolo di difesa, in risposta ad attacchi di patogeni, usando il perossido di idrogeno prodotto dall'ossidazione delle amine (Parsons M.R., 1995).

Studi recenti hanno evidenziato come le cellule cancerogene contengano un maggior quantitativo di poliamine endogene, i cui prodotti di ossidazione sono in grado di indurre stress ossidativo con attivazione delle vie che portano a morte

cellulare per via apoptotica o non apoptotica in diverse linee tumorali (Lindsay G.S., 1999; Calcabrini A., 2002). Inoltre, il perossido di idrogeno e le aldeidi generate dal sistema enzimatico BSAO/poliamina, sono in grado di superare la resistenza ai farmaci chemioterapici nelle cellule di melanoma M14 (Agostinelli E., 2006a) e nell'adenocarcinoma umano al colon (LoVo) (Agostinelli E., 2006b; 2006c), aspetto di particolare interesse, dal momento che uno dei problemi della terapia convenzionale anticancro è proprio lo sviluppo della resistenza ai farmaci. Si può quindi utilizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno come cura potenziale contro il cancro, in analogia agli altri processi di formazione di radicali liberi (Agostinelli E., 2006d).

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti e solventi

Si riporta in tabella 2 l'elenco dei reagenti utilizzati nel corso del presente lavoro. Le sostanze riportate sono reperibili in commercio e sono state acquistate al massimo livello di purezza ottenibile, tale da non richiedere preliminari trattamenti di purificazione.

Nome del prodotto	Fornitore
Nanoparticelle di maghemite (SAMN)	
Sodio boro idruro (NaBH_4)	Fluka
Ferro cloruro (FeCl_3)	Fluka
Tetrametilammonio idrossido (TMAOH)	Sigma-Aldrich
Acido perclorico (HClO_4)	Sigma-Aldrich
Ammoniaca (NH_3)	Sigma-Aldrich
Sodio diidrogeno carbonato (NaH_2CO_3)	Fluka
Potassio diidrogeno fosfato (KH_2PO_4)	Fluka
Bicarbonato di ammonio (NH_4HCO_3)	Fluka
Albumina di siero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich
Avidina di albume di uovo di pollo	Protein Company
Biotina	Sigma-Aldrich
Perossidasi tipo I da rafano (HRP)	Sigma-Aldrich
Glucosio ossidasi da <i>Aspergillus niger</i> (GOx)	Sigma-Aldrich
Aminossidasi di siero bovino (BSAO)	

Idrochinone (HQ)	Sigma-Aldrich
B-D glucosio	Sigma-Aldrich
Spermina tetraidrocloreidrato (SPM)	Fluka
Perossido di idrogeno (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
N,N dimetilnilina	Sigma-Aldrich
4-amminoantipirina	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Fluoresceina	Sigma-Aldrich
Fluoresceina Isotiocianato (FITC)	Sigma-Aldrich
Fluoresceina 4 biotina	Sigma-Aldrich
Rodamina B	Sigma-Aldrich
Rodamina B Isotiocianato (RITC)	Sigma-Aldrich
Rodamina 110	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue	Bio-Rad Laboratories
Tripsina	Promega
Etanolamina (ETA)	Fluka
Glicina	Prolabo
Etilidiammina (EDA)	Fluka
Etanolo	Fluka

Tabella 2: Elenco dei reagenti e materiali utilizzati nel presente lavoro di tesi.

2.2 Metodi

2.2.1 Le sonde fluorescenti

Rodamina B Isotiocianato

La rodamina B isotiocianato la cui formula di struttura è riportata in figura 15 è una sonda molto usata in ambito biologico, soprattutto in immunofluorescenza. È un derivato della rodamina B e, quando viene eccitata, emette una radiazione nella regione rosso-arancione.

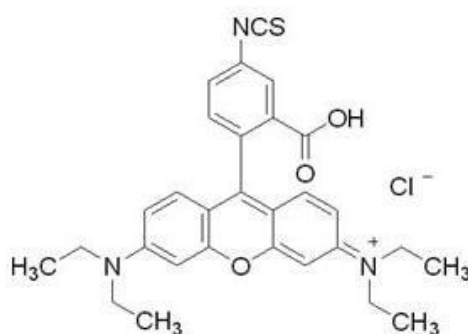
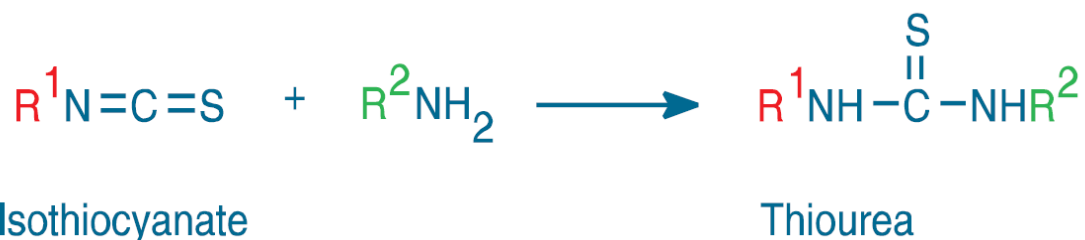


Figura 15: Formula chimica della rodamina B isotiocianato.

Il gruppo isotiocianato presente nella molecola è in grado di legare in maniera covalente ammine primarie e i gruppi ammino-terminali delle proteine con conseguente rottura di un doppio legame tra l'azoto e il carbonio del gruppo tiocianato con formazione di un legame tra questo carbonio e l'azoto dell'ammina. Tale reazione porta alla formazione di una tiourea come rappresentato nello schema 1. In questo modo è possibile legare alla sonda proteine e anticorpi.



Schema 1: Schema riassuntivo che descrive la formazione della tiourea dove R^1 indica la sonda mentre R^2 un qualsiasi gruppo amminico primario.

La Rodamina B Isotiocianato presenta un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 554 nm ed emette alla lunghezza d'onda di 580 nm. Presenta un assorbimento costante al variare del pH, una buona resa quantica (0.54 in etanolo) e un elevato coefficiente di estinzione molare ($106000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in etanolo) come riportato in letteratura (Valeur B., 2002).

Uno dei problemi dei fluorofori organici è la tendenza al self-quenching. E' noto che l'intensità di fluorescenza non è direttamente proporzionale alla quantità di sonda legata, per esempio a proteine. Difatti, si osserva una riduzione dell'intensità di fluorescenza all'aumentare del numero di molecole di sonda legate alla singola proteina. Se si osserva lo spettro di emissione ed eccitazione della sonda si nota

che la rodamina B isotiocianato presenta un piccolo Stokes shift; quindi se più molecole di sonda legate alla proteina si trovano sufficientemente vicine da ricadere all'interno della distanza di Forster (circa 40 Å) si avrà un trasferimento energetico da una molecola all'altra con conseguente diminuzione dell'intensità di fluorescenza emessa (Lakowicz J.R., 2010).

Fluoresceina-4-biotina

La fluoresceina biotinilata è stata utilizzata per quantificare i siti di legame disponibili per la biotina, da parte dell'avidina, in seguito al legame di quest'ultima con la superficie delle SAMN. La fluoresceina-4-biotina ha un peso molecolare di 644.70 g/mol e la sua struttura è riportata in figura 16.

Tale sonda è stata sviluppata come alternativa all'uso di biotina radioattiva per monitorare e quantificare i siti di legame per la biotina, sfruttando la fluorescenza o l'assorbimento (Gruber H.J., 1998).

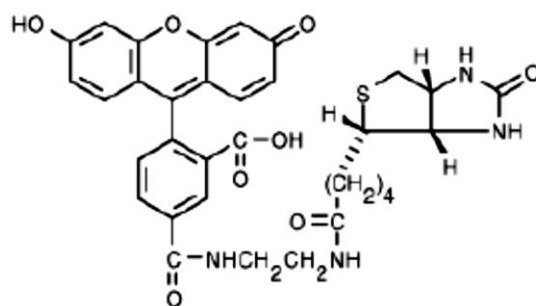


Figura 16: Formula chimica della Fluoresceina-4-biotina.

Come è riportato in figura 16, il legame tra la biotina e la fluoresceina, avviene in corrispondenza della catena laterale di acido valerianico della biotina. Questa sonda, quando eccitata ad una lunghezza d'onda di 492 nm, è in grado di fluorescere, emettendo ad una lunghezza d'onda di 524 nm.

L'analisi allo spettrofluorimetro è stata condotta utilizzando un tampone di carbonato di calcio, a pH 9.5 ad una concentrazione di 1 M; ciò perchè la sonda, in tali condizioni, risulta essere stabile.

2.3 Quantificazione delle proteine

I metodi di quantificazione proteica utilizzati prevedono, o la determinazione dell'assorbanza a 280 nm, il cui assorbimento è dato dalla presenza di amminoacidi aromatici, oppure mediante l'impiego di coloranti, come il Blu di Coomassie.

Metodo di Bradford

Questo metodo è molto utilizzato per la sua semplicità, per l'essere rapido, economico e sensibile. Si basa sull'utilizzo di un particolare colorante, il Blu di Coomassie in grado di legare amminoacidi basici come l'arginina e l'istidina e aromatici come la fenilalanina, il triptofano e la tirosina tramite la formazione di forti complessi non covalenti con le proteine attraverso interazioni elettrostatiche con gruppi aminici e carbossilici degli amminoacidi e tramite forze di Van der Waals.

Il colorante in assenza di proteine assorbe a un massimo di 465 nm, mentre quando è legato alla componente proteica, il massimo di assorbimento si sposta a 595 nm per la formazione del complesso proteina-colorante di colore blu (vedi figura 17).

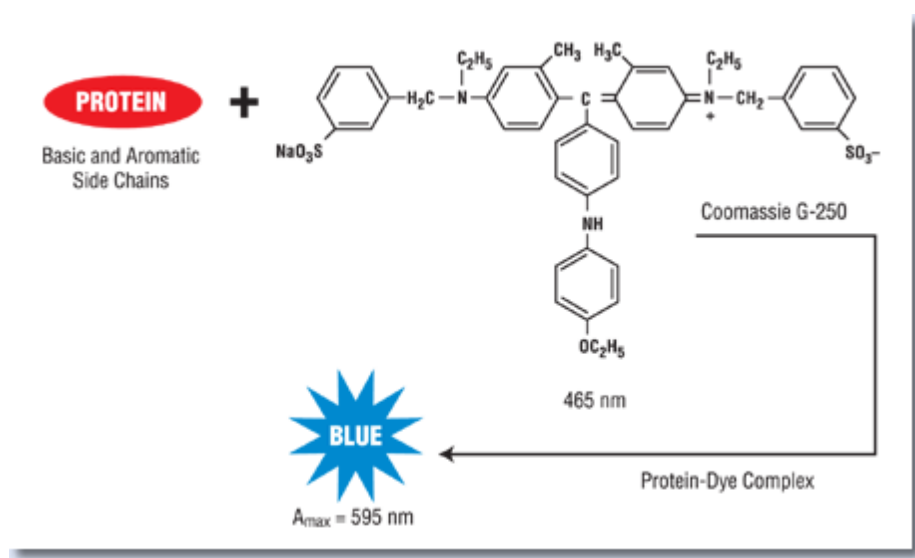


Figura 17: Schema della reazione che avviene nel metodo di Bradford tra il colorante (Coomassie) e le proteine.

La retta di taratura si esegue preparando aliquote a concentrazione nota di proteina standard, che in questo caso è l'albumina di siero bovino (BSA) a cui si aggiunge un volume costante di colorante e portando i campioni ad un volume finale equivalente. Ciascun campione viene lasciato a contatto con il colorante per 5 minuti, eseguendo poi la lettura ottica ad una lunghezza d'onda di 595 nm. L'assorbanza registrata è quindi proporzionale alla proteina presente, in quanto dipende dal colorante ad essa legato. Dalla retta di taratura costruita si ricava la concentrazione del campione d'interesse.

Tale metodo è stato impiegato per determinare la concentrazione di amino ossidasi di siero bovino nella soluzione madre di partenza utilizzata nell'incubazione con le SAMN.

2.4 Diffrazione a raggi X (XRPD)

La tecnica impiegata per l'analisi delle SAMN è un tipo particolare di diffrazione ai raggi X, nota come XRD ("*X-ray Powder Diffraction*") utilizzato per polveri sottili o nano strutturate. I diffrattometri a raggi X consistono di tre elementi fondamentali: un tubo a raggi X, un porta-campioni e un rivelatore di raggi X. I raggi X sono generati in un tubo catodico attraverso riscaldamento di un filamento, gli elettroni che si liberano sono accelerati verso un bersaglio applicando una tensione. Quando gli elettroni hanno energia sufficiente per staccare gli elettroni guscio interno del materiale bersaglio, si produce un caratteristico spettro. Questi raggi X vengono collimati e diretto sul campione. Mentre il campione e rivelatore sono ruotati, l'intensità dei raggi X diffratti viene registrata. Quando l'angolo dei raggi X incidenti il campione soddisfa l'equazione di Bragg, si verifica l'interferenza costruttiva e si osserva un picco di intensità.

Tale tipo di analisi è stata effettuata in collaborazione con il Prof. Radek Zboril del Centre for Nanomaterial Research dell'università Palacky, Olomouc, Repubblica Ceca e con la Prof.ssa Gabriella Salviulo del Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova. Lo strumento usato è un PANalytical X'Pert PRO.

2.5 Microscopia a trasmissione elettronica

La microscopia elettronica usa gli elettroni al posto dei fotoni, poiché i primi hanno una lunghezza d'onda idealmente molto minore dei secondi: questo permette di osservare la materia a una risoluzione molto elevata.

Le tecniche di microscopia elettronica si possono suddividere in due grandi gruppi (figura 18): la microscopia elettronica a scansione (“*Scanning Electron Microscopy*”, SEM) e la microscopia elettronica a trasmissione (“*Transmission Electron Microscopy*”, TEM). La prima scansiona la superficie del campione e misura quanti elettroni sono riflessi dal campione stesso, la seconda misura l'attenuazione degli elettroni da parte delle strutture del campione mentre essi lo attraversano (Niemantsverdriet J.W., 2007). L'utilizzo di fasci di elettroni richiede che l'analisi venga svolta sotto vuoto per evitare che gli elettroni interagiscano con le molecole già presenti nel gas prima di raggiungere il campione: questo rende gli strumenti relativamente ingombranti e costosi.

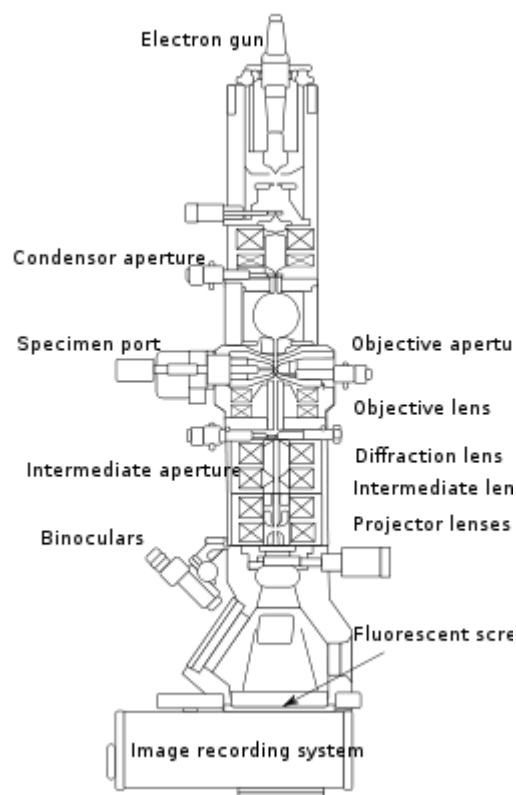


Figura 18: Schema di un microscopio a trasmissione elettronica (TEM).

Per ottenere immagini di oggetti nanometrici, la microscopia ottica presenta una risoluzione limitata poiché le dimensioni di tali oggetti sono più piccole della lunghezza d'onda della luce. I microscopi ottici riescono a raggiungere una risoluzione di 200 μm , insufficiente per distinguere strutture di dimensioni nanometriche. La risoluzione può essere notevolmente migliorata con microscopi elettronici, in cui il fascio di elettroni usato ha una lunghezza d'onda, che è minore di quella della luce visibile. La traiettoria di un elettrone che penetra la materia di un solido è complessa poiché è modificata da eventi di collisione elastica ed anelastica. Non appena il primo fascio di elettroni (*“primary electron”, PE*) entra all'interno del materiale esso gradualmente cambia direzione e perde energia nelle collisioni. La lunghezza del percorso medio del primo elettrone dipenderà dal numero atomico del materiale e dall'energia dell'elettrone stesso. Per campioni più sottili del percorso medio dell'elettrone, la maggior parte del fascio di elettroni primari passa attraverso il campione senza cambiare la sua direzione: questo è ciò che accade nel TEM (Niemantsverdriet J.W., 2007). Gli elettroni che fuoriescono dal campione in una nuova direzione rispetto al fascio di elettroni primari a causa di collisioni elastiche sono chiamati elettroni retrodiffusi (*“backscattered electrons”, BSE*; figura 19).

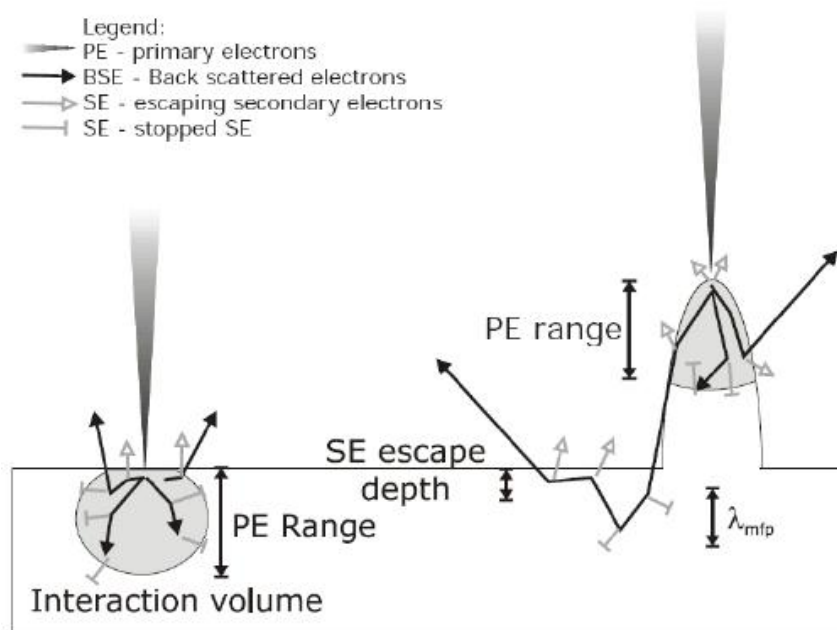


Figura 19: Processo di “scattering” degli elettroni in due materiali di differente spessore.

Le immagini sono state acquisite con un microscopio FEI Tecnai 12 operante a 120 kV con un potere risolutivo di 1,9 Å presso il laboratorio di Microscopia Elettronica del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

2.6 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier

Il termine indica un tipo di spettroscopia eseguita a lunghezze d'onda compresa tra 700 nm e 1 mm. Affinchè una molecola sia in grado di assorbire radiazione infrarossa essa deve possedere una particolare caratteristica: il suo momento dipolare elettrico deve variare durante la vibrazione. Si definisce il momento di dipolo elettrico (μ) come una grandezza vettoriale che ha direzione e verso dalla carica negativa a quella positiva e modulo pari al prodotto tra la quantità di carica (q) e la distanza (r) tra le cariche secondo la formula $\mu = qr$. La figura 20 mostra la struttura di una molecola attiva all'infrarosso: essa è una molecola diatomica eteronucleare, in cui il momento dipolare cambia mentre il legame tra i due atomi si espande e si contrae. Maggiore è la variazione del momento dipolare, maggiore è l'intensità della banda di assorbimento. Al contrario, in una molecola omonucleare, il suo momento dipolare non varia, pur in presenza di vibrazioni di legame (Barbara H. Stuart, 2004).

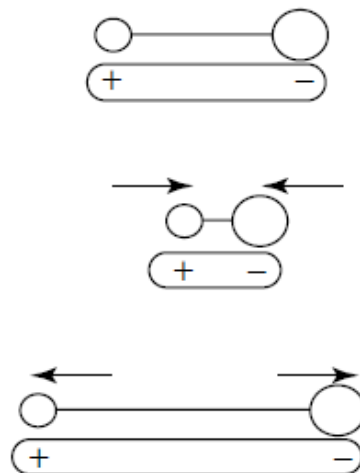


Figura 20: Variazione del momento dipolare elettrico di una molecola biatomica eteronucleare.

Per molecole che contengono più di due atomi, le vibrazioni possono riguardare sia un cambiamento nella lunghezza del legame (“*stretching*”), sia una variazione dell'angolo di legame (“*bending*”), come mostrato in figura 21.

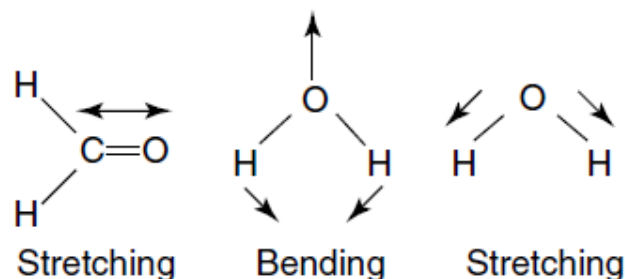


Figura 21: Vibrazioni di “*stretching*” e di “*bending*”.

Una molecola composta da n atomi ha un totale di $3n$ gradi di libertà, corrispondenti alle coordinate cartesiane di ogni atomo nella molecola. In una molecola non lineare, 3 di questi gradi sono ruotati e 3 sono traslazionali e i rimanenti corrispondono alle vibrazioni fondamentali. In una molecola lineare, 2 gradi sono rotazionali e 3 traslazionali. Il numero netto di vibrazioni fondamentali per le molecole non lineari e lineari è riportato nella seguente tabella:

<i>molecole</i>	<i>degrees of freedom</i>
nonlinear	$3n - 6$
linear	$3n - 5$

Come si può vedere, le molecole simmetriche presentano un minore numero di modi vibrazionali attivi nell’infrarosso rispetto a quelle asimmetriche. L’acqua, per esempio, che è una molecola non lineare, ha 3 modi vibrazionali fondamentali, come riportato nella figura 22:

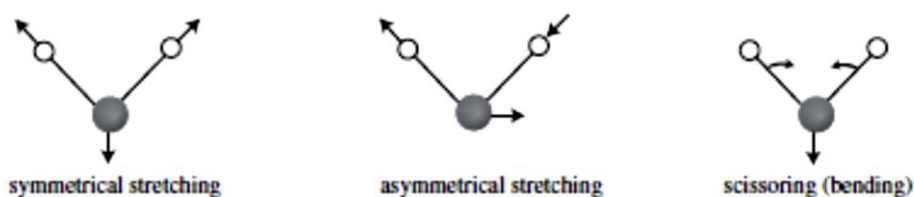


Figura 22: Modi vibrazionali per la molecola di acqua.

Una molecola può assorbire radiazioni solo quando la radiazione infrarossa utilizzata ha la stessa frequenza di uno dei modi fondamentali di vibrazione della molecola ed è in grado quindi, di causare una variazione del suo momento dipolare elettrico. In generale, maggiore è la variazione del momento dipolare elettrico, più forte è l'intensità della banda di assorbimento all'infrarosso. In generale, uno spettro infrarosso è formato dai diversi contributi delle singole vibrazioni lungo l'intera molecola e si può considerare quindi come una vera e propria "impronta digitale" di una molecola diversa a seconda degli atomi che concorrono a comporla (Barbara H. Stuart, 2004).

La spettroscopia infrarosso basata sulla trasformata di Fourier è realizzata tramite l'uso di un interferometro che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione infrarossa generata dalla sorgente. La scansione viene effettuata tramite uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza di cammino ottico, originando una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso. In questo modo, si ottiene un interferogramma che rappresenta l'intensità del dominio nel tempo. Applicando la trasformata di Fourier un calcolatore permette di ottenere lo spettro infrarosso.

I componenti di base di uno spettrometro FTIR sono schematizzati in figura 23. La radiazione emergente dalla sorgente viene fatta passare attraverso un interferometro verso il campione prima di raggiungere un rivelatore. Dopo l'amplificazione del segnale, in cui i contributi ad alta frequenza sono stati eliminati da un filtro, i dati sono convertiti in forma digitale da un convertitore analogico-digitale e trasferiti ad un computer per il calcolo della trasformata di Fourier.

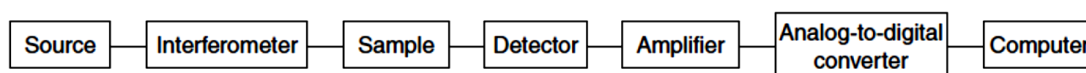


Figura 23: Componenti di base di uno spettrometro FTIR.

L'interferometro più comunemente utilizzato in spettrometria FTIR è un interferometro Michelson, che consiste di due specchi piani perpendicolari, uno dei quali mobile (figura 24). Un film semiriflettente ("beamsplitter") separa il fascio in due semipiani. I materiali che costituiscono il "beamsplitter" devono essere scelti in base alla regione dell'infrarosso da esaminare.

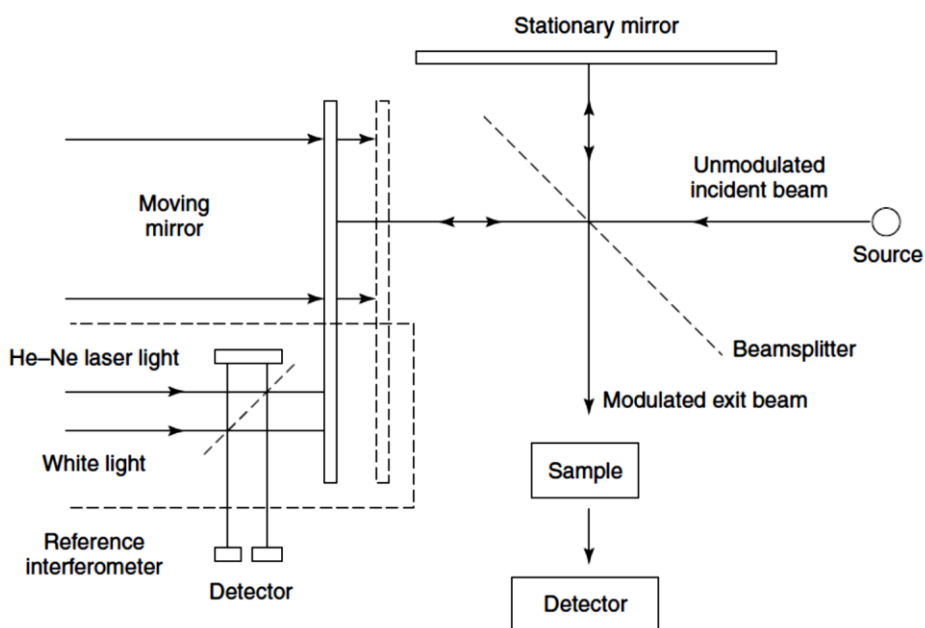


Figura 24: Schema di un interferometro Michelson.

Se un fascio collimato di radiazione monocromatica di lunghezza d'onda λ (cm) viene fatto passare attraverso un "beamsplitter" ideale, il 50% della radiazione incidente si rifletterà a uno dei specchi mentre il 50% sarà trasmesso all'altro specchio. I due fasci vengono riflessi da questi specchi, tornando al "beamsplitter" dove si ricombinano e producono interferenza. Il cinquanta per cento del fascio riflesso dallo specchio fisso è trasmesso attraverso il "beamsplitter" mentre il 50% viene riflesso indietro in direzione della sorgente. Il fascio che emerge dall'interferometro a 90 gradi rispetto al fascio di ingresso è chiamato fascio trasmesso e questo è il segnale rilevato dalla spettrometria FTIR. Lo specchio in movimento produce una differenza di cammino ottico tra i due bracci dell'interferometro. Il modello di interferenza che ne risulta è illustrato nella figura 25a per una sorgente di radiazione monocromatica e 25b per una fonte di radiazione policroma. La prima è una semplice funzione coseno, la seconda ha una forma più complessa perché contiene tutte le informazioni dello spettro della radiazione che raggiunge il rivelatore (Barbara H. Stuart, 2004).

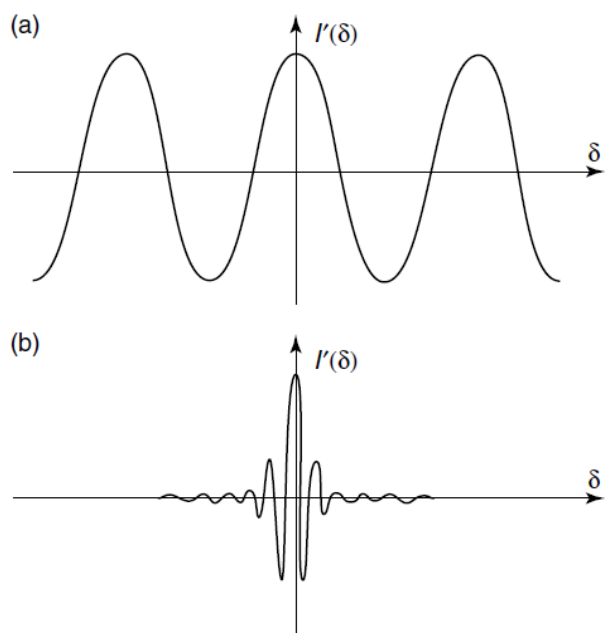


Figura 25: Interferogrammi ottenuti (a) per una radiazione monocromatica, (b) per una radiazione policromatica.

Lo spettro infrarosso può essere suddiviso in tre regioni principali: il lontano infrarosso (a λ inferiori a 400 cm^{-1}), il medio infrarosso (λ compresa tra $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) e il vicino infrarosso (λ compresa tra $4000 - 13000 \text{ cm}^{-1}$). Molte applicazioni utilizzano raggi infrarossi della regione del medio infrarosso, ma le regioni del vicino e lontano infrarosso possono fornire importanti informazioni per alcuni materiali. In ordinata la scala può essere presentata come trasmittanza percentuale ma l'intensità delle bande può anche essere espressa in termini di assorbanza. Una volta ottenuto lo spettro infrarosso, si passa all'interpretazione. Fortunatamente, l'interpretazione dello spettro è semplificata dal fatto che le bande che appaiono di solito possono essere assegnate a particolari legami di una molecola, producendo quelle che sono note come le frequenze di gruppo.

Le misurazioni effettuate in questo lavoro sono state effettuate nello spettro del medio infrarosso ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$). Questo intervallo di numeri d'onda può essere approssimativamente suddiviso in quattro regioni e la natura di una frequenza di gruppo può essere generalmente determinata dalla regione in cui si trova. Le regioni sono divise come segue: la regione degli stretching X-H stretching ($2500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), la regione del triplo legame ($2000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$), la regione del doppio legame ($1500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$) e la regione delle cosiddette "impronte digitali" ($600 -$

1500 cm^{-1}). È stato ipotizzato finora che ad ogni banda di uno spettro infrarosso possa essere assegnata a una particolare deformazione della molecola. Questo è possibile per molte bande. Tuttavia, molte vibrazioni non sono così ben definibili e possono variare di centinaia di numeri d'onda, anche per molecole simili. Ciò si applica alla maggior parte delle vibrazioni che assorbono nella regione 650 - 1500 cm^{-1} . In questo intervallo di numeri d'onda si possono avere un centinaio o più bande di assorbimento, ma non è possibile assegnare per ciascuna banda un particolare movimento vibrazionale. In questi casi lo spettro può essere considerato come un "impronta digitale" della molecola e quindi questa regione è denominata regione delle impronte digitali (Barbara H. Stuart, 2004).

Lo spettro infrarosso delle proteine mostra delle bande di assorbimento associate ai legami peptidici. Esistono nove bande, chiamate ammidi A, ammidi B, ammidi I - VII, da un numero d'onda maggiore ad uno minore. Le bande più usate per le analisi infrarosso sono la ammidi I e la ammidi II. Anche le singole catene laterali possono contribuire allo spettro infrarosso di una proteina, ma la loro identificazione può essere difficile poiché i numeri d'onda dei loro picchi sono spesso sovrapponibili alle bande delle ammidi. L'arginina è l'unico amminoacido che dà un chiaro contributo ad un numero d'onda compreso tra 1600 - 1700 cm^{-1} (Barbara H. Stuart, 2004).

La tecnica FTIR ha permesso in questo lavoro di confermare la presenza di diverse macromolecole sulla superficie delle nanoparticelle, quali albumina di siero bovino ed avidina, della molecola biotina, degli enzimi perossidasi di rafano, glucosio ossidasi e l'amino ossidasi di siero bovino. Per tutti i campioni per cui è stato necessario acquisirne lo spettro nel medio infrarosso, si è utilizzato come strumento un Thermo Nicolet Nexus 670, prodotto da Thermo Fischer Scientific Inc. I campioni sono stati omogenati e diluiti 1:200, con polvere di potassio bromuro, e pellettizzati tramite applicazione di una pressione di 8 tonnellate mediante una pressa idraulica.

2.7 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa è uno dei metodi fisici più usati per lo studio di composti organici e organometallici, o più in generale, di tutte quelle sostanze che possono

essere portate allo stato gassoso, senza decomposizione, in condizioni di alto vuoto.

Il metodo è basato sulla trasformazione delle molecole in ioni, che vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, e registrati. Lo spettrometro di massa, di cui è riportato uno schema a blocchi in figura 26 , è costituito dalla sorgente ionica in cui le molecole neutre sono trasformate in ioni, dall'analizzatore in cui gli ioni vengono raccolti ed i segnali inviati, dopo amplificazione, al registratore.

Un efficiente sistema di pompe rotative e pompe a diffusione o pompe turbo molecolari mantiene lo strumento sotto alto vuoto (10^{-6} - 10^{-7} torr). In tali condizioni le molecole di gas residuo nello strumento hanno un libero cammino medio dell'ordine del metro e perciò la probabilità di collisioni con le specie ioniche sono estremamente basse. Alla sorgente ionica, infine, sono collegati i sistemi di introduzione dei campioni da analizzare (Vaglio A., 1981).

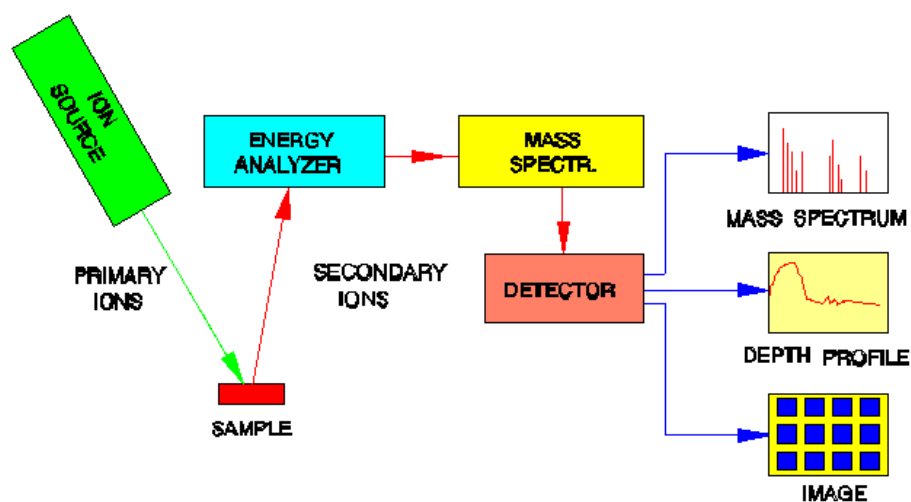


Figura 26 : Schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

Lo spettrometro di massa utilizzato per determinare la quantità di enzima aminossidasi di siero bovino (BSAO) immobilizzato sulla superficie del complesso SAMN@RITC-BSAO è basato sull'analisi LC-MS/MS. Lo spettrometro è un 6520 Q-TOF collegato online con un sistema HPLC 1200 mediante Chip Cube Interface (Agilent Technologies, CA, USA). Tale tipo di analisi combina la capacità di separazione fisica della cromatografia liquida all'analisi di massa della

spettrometria di massa. Tale tecnica ha il vantaggio di essere altamente sensibile e selettiva.

2.8 Spettroscopia Mossbauer

La spettroscopia Mossbauer fornisce informazioni sull'interazione di un materiale con la radiazione elettromagnetica alla frequenza dei raggi γ ed è ampiamente usata in mineralogia per determinare lo stato di valenza del ferro oltre che per identificare la composizione dei materiali contenenti ferro. In particolare, si sfrutta la risonanza dei nuclei degli atomi di alcuni materiali che, in determinate condizioni assorbono raggi γ misurabili dando informazioni sul reticolo cristallino, l'intorno e gli elementi che lo compongono a partire dall'energia delle transizioni nucleari, fenomeno conosciuto come effetto Mossbauer (vedi figura 27). Tale fenomeno fu scoperto nel 1957 da Rudolph Mossbauer, premio Nobel nel 1961 (Mossbauer R.L., 1961).

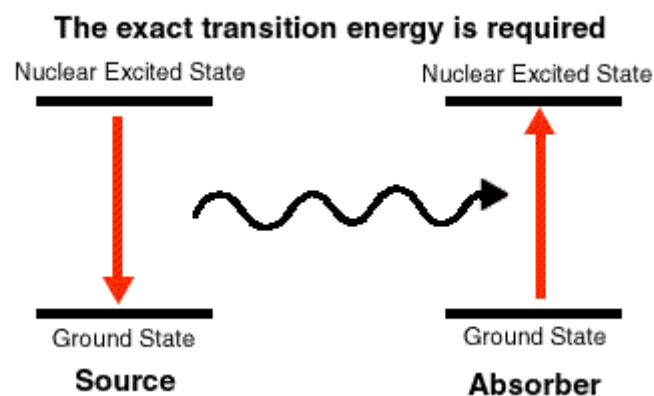


Figura 27: Emissione ed assorbimento di raggi gamma (Effetto Mossbauer).

Solo alcuni isotopi possono essere utilizzati come risonatori nella spettroscopia Mossbauer a causa delle energie associate alle transizioni nucleari e ai tempi di decadimento associati, e uno di questi è il ^{57}Fe . Analogamente al monocromatore di uno spettrofotometro, l'energia del raggio gamma emesso viene modulata ponendo la sorgente in movimento in un intervallo di velocità nell'ordine di grandezza di pochi mm/s e, sfruttando l'effetto Doppler, si ottengono le piccole

variazioni di lunghezza d'onda necessarie a far coincidere l'energia dell'emettitore all'energia delle transizioni nucleari del campione (vedi figura 28). Siccome le transizioni nucleari, e quindi l'effetto Mossbauer, sono influenzati dalla temperatura e dal campo magnetico, per ottenere spettri più informativi si rilevano gli spettri a diverse temperature e in presenza o meno di un campo magnetico esterno. Come nella risonanza magnetica nucleare la presenza di un campo magnetico esterno, sufficientemente potente, crea una differenza energetica tra gli allineamenti parallelo e antiparallelo dei momenti magnetici della materia, aumentando così il numero delle transizioni nucleari (in particolare questo fenomeno è tipico di atomi con momento magnetico permanente).

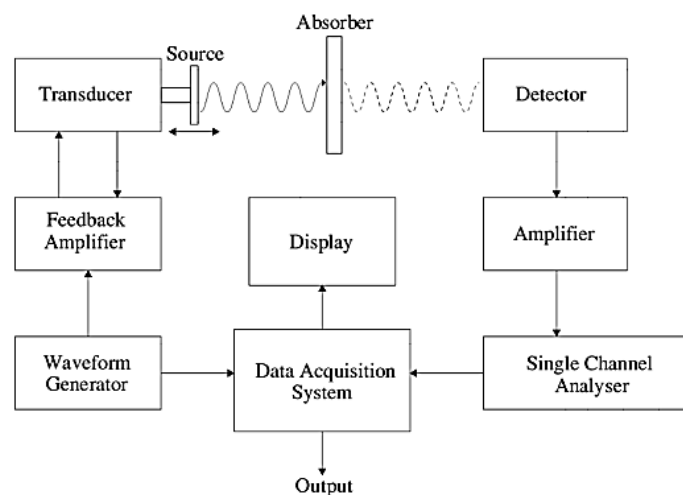


Figura 28: Diagramma di uno spettrofotometro Mossbauer.

I dati sono stati raccolti in collaborazione con il Prof. Umberto Russo e il Dott. Luca Nodari, del dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova e presso il laboratorio del Prof. Radek Zboril del Centre for Nanomaterial Research dell'università Palacky, Olomouc, Repubblica Ceca. Gli spettri a campo magnetico nullo si sono registrati a 5 K e 300 K in accelerazione costante con sorgente ^{57}Co (Rh). Il campione è stato posto in un sistema criomagnetico (Oxford Instruments) ad una temperatura di 5 K ed esposto ad un campo magnetico esterno di 5 T, applicato parallelamente alla direzione di propagazione dei raggi γ . Questo tipo di spettroscopia si è rivelato utile a definire la natura chimica e la struttura delle nanoparticelle utilizzate in questo lavoro.

2.9 Misure di magnetizzazione

Trattandosi di un materiale caratterizzato da proprietà magnetiche, le nanoparticelle sono state analizzate utilizzando misure di magnetizzazione. Essendo il magnetismo degli ossidi di ferro strettamente legato alle dimensioni delle particelle stesse la sua analisi fornisce un'indicazione sul diametro possibile del materiale analizzato fornendone quindi un'ulteriore caratterizzazione. I diversi materiali magnetici mostrano differenti cicli d'isteresi e, nel caso di materiali dalle dimensioni nanometriche, la forma del grafico del ciclo d'isteresi è grandemente influenzata dalla temperatura. Per questi motivi le analisi sono state condotte a diverse temperature.

Si sono ottenuti cicli d'isteresi a 2 K e a 300 K in un intervallo di campo magnetico -7 T, 7 T. Per ogni grafico sono presentati tre loop con sistema di unità di misura emu/cgs (unità elettromagnetica del momento magnetico) in tre diversi intervalli di induzione magnetica H_c . Questo tipo di analisi permette l'indagine delle proprietà magnetiche che, come già accennato, essendo legate alle dimensioni delle nanoparticelle permette un confronto con l'analisi dimensionale al microscopio a trasmissione elettronica.

Il confronto tra i cicli d'isteresi a 2 K e a 300 K permette di sfruttare la caratteristica dei materiali superparamagnetici citata nel paragrafo 1.1 e cioè la possibilità di osservare una riduzione del comportamento paramagnetico a temperature vicine allo zero assoluto (temperatura di bloccaggio) e di comparare i dati con valori tabulati di soglie dimensionali del materiale in questione. I dati sono stati raccolti presso il laboratorio del Prof. Radek Zboril del Centre for Nanomaterial Research dell'università Palacky, Olomouc, Repubblica Ceca. Per le misure è stato utilizzato uno strumento SQUID (superconducting quantum interference device, MPMS XL-7, Quantum Design).

2.10 Protocolli

2.10.1 Sintesi di nanoparticelle di maghemite

Il metodo di sintesi prevede i seguenti passaggi: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10.0 g, 37 mmol) sono disciolti in acqua milliQ (800 ml) sotto agitazione continua a temperatura ambiente. Una soluzione di NaBH_4 (2 g, 53 mmol) in ammoniaca (3.5 %, 100 mL, 4.86 mol/mol Fe) è poi aggiunta rapidamente alla miscela. Il sistema diventa immediatamente di un colore nero. In breve tempo dopo che è avvenuta la reazione di riduzione, la temperatura del sistema è portata a 100 °C e mantenuta a tale temperatura per 2 ore. Ciò perché se la procedura è effettuata a temperatura ambiente, il prodotto ottenuto è instabile all'aria e tende ad ossidarsi dando un materiale marrone non magnetico nel giro di poche ore. Al contrario, il prodotto ottenuto usando un'elevata temperatura (100 °C) è caratterizzato da un'alta stabilità e da un comportamento fortemente magnetico. Dopo aver raffreddato il materiale a temperatura ambiente per circa 2 ore, il prodotto magnetico è separato mediante applicazione di un campo magnetico esterno e lavato diverse volte con acqua distillata. Nel passaggio finale, la componente magnetica è trattata termicamente a 400 °C per 2 ore. La quantità di prodotto finale ottenuta è pari a 2.0 g (12.5 nmol) di Fe_2O_3 con una resa pari al 68%. Le nanoparticelle ottenute, SAMN (Surface Active Maghemite Nanoparticle) sono poi risospese in acqua milliQ (3.5 L) mediante bagnetto ad ultrasuoni a 48 KHz, 50 W (Bransonic, mod. 221), per 3 ore, dando una sospensione colloidale stabile nell'arco del periodo monitorato (6 mesi).

Il metodo di sintesi è coperto da brevetto internazionale supportato dall'Università di Padova (Magro M., 2010).

2.10.2 Cinetica di risospensione delle SAMN in mezzi diversi

Per poter caratterizzare la superficie delle nanoparticelle è importante lavorare con sospensioni di particelle stabili. A tal scopo le nanoparticelle, in un intervallo di concentrazioni tra 10 e 100 mg/L, sono state rispese in mezzi diversi, quali tampone fosfato 0.1 M pH 7, tampone carbonato 0.1 M pH 10, tetrametilammonio perclorato 50 mM pH 7 ed acqua distillata mediante bagno ad ultrasuoni a 48 kHz,

50 W (Bransonic, mod. 221). La cinetica di risospensione è stata seguita per 9 ore e uno spettro ottico da 300 nm a 800 nm è stato acquisito ogni 30 minuti.

2.10.3 Effetto del pH sulla cinetica di risospensione delle SAMN

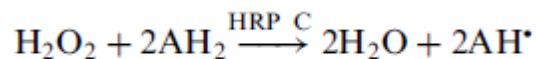
Per studiare l'effetto del pH sulla superficie delle nanoparticelle, una concentrazione nota di nanoparticelle (100 mg/L) è stata sonicata per 9 ore a 48 KHz, 50 W (Bransonic, mod. 221) in 50 mM di tetrametilammonio perclorato in un intervallo di pH compreso tra 3 e 11. Ad intervalli di 30 minuti uno spettro ottico da 300 nm- 800 nm è stato acquisito.

2.10.4 Immobilizzazione di proteine direttamente sulla superficie delle SAMN

Nanoparticelle alla concentrazione di 50 mg/L, risospese in tetrametilammonio perclorato 50 mM pH 7, sono state incubate in presenza delle proteine, albumina di siero bovino (BSA), alla concentrazione di 100 mg/L e di avidina, alla concentrazione di 50 mg/L. Le stesse nanoparticelle, alla concentrazione finale sempre di 50 mg/L, sono state invece risospese in acqua distillata ed incubate con l'enzima perossidasi di rafano (HRP), alla concentrazione finale di 100 mg/L. Questo per preservare l'attività catalitica dell'enzima. L'incubazione si è protratta per 14 ore a 4°C mantenendo il tutto in agitazione. Una volta terminata l'incubazione le nanoparticelle sono state separate tramite impiego di un campo magnetico esterno e i surnatanti ottenuti controllati spettrofotometricamente a 280 nm. I complessi SAMN@BSA, SAMN@avidina e SAMN@HRP sono stati lavati per tre volte sino a quando lo spettro ottico non ha più evidenziato presenza di proteina libera nei surnatanti.

2.10.5 Determinazione dei parametri cinetici enzimatici della perossidasi di rafano

La perossidasi di rafano catalizza la reazione di ossidazione dell'idrochinone a benzochinone, mediante utilizzo di acqua ossigenata, H₂O₂, come agente ossidante, secondo la reazione:



dove AH₂ rappresenta il substrato riducente, in questo caso l'idrochinone, e AH· il radicale prodotto.

Lo studio della cinetica enzimatica è stato condotto in tampone fosfato 20 mM, pH 6.5 in presenza di EDTA (0.1 mM) e H₂O₂ (0.1 mM). Nel corso della misurazione si aggiungono al tampone concentrazioni variabili di idrochinone (da 0 a 3 mM) e si mantiene costante la concentrazione di enzima (0.2 nM), di modo da poter individuare la condizione di saturazione (corrispondente alla V_{max}) e il valore della costante di Michaelis-Menten (K_m). Il progredire nel tempo della reazione enzimatica è seguito a 245 nm per 5 minuti: ciò che si misura è la variazione dell'assorbanza nel tempo (ΔA/min). Questo valore può essere convertito a unità di attività enzimatica usando il coefficiente di estinzione molare del benzochinone, pari a 2.2 x 10⁴ M⁻¹cm⁻¹.

2.10.6 Determinazione dei siti biotinilabili dei complessi SAMN@avidina

Per determinare il numero di siti biotinilabili disponibili nel complesso SAMN@avidina, si utilizza una sonda fluorescente che porta legata una molecola di biotina, la fluoresceina-4-biotina. Il protocollo consiste nel preparare dei campioni del volume finale di 1 mL, della sospensione di SAMN@avidina, diluiti in acqua. Ad essi viene aggiunta la fluoresceina-4-biotina (90 μL ad una concentrazione 10 μM) e il tutto incubato a 4 °C in agitazione per 5 ore al buio. Terminata l'incubazione i campioni vengono sottoposti a separazione magnetica, per 30-40 minuti tramite l'impiego di campo magnetico esterno e i surnatanti ottenuti si analizzano allo

spettrofluorimetro impostando come lunghezza d'onda di eccitazione 492 nm. Le misure sono state effettuate aggiungendo ai surnatanti tampone carbonato alla concentrazione finale di 0.2 M pH 10. Si provvede poi a raccogliere lo spettro di emissione a 524 nm, lunghezza d'onda a cui la sonda utilizzata emette.

2.10.7 Caratterizzazione della superficie delle SAMN tramite impiego della sonda fluorescente rodamina B isotiocianato

Per caratterizzare la superficie delle nanoparticelle si sono risospese quest'ultime in acqua distillata alla concentrazione di 100 mg/L, sonicate ed incubate in presenza di sonda fluorescente rodamina B isotiocianato (RITC) alla concentrazione di 10 μ M. L'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente, al buio e si è protratta per un'ora. La quantità di sonda legata è stata calcolata valutando la diminuzione dell'assorbanza massima a 554 nm nel surnatante dopo separazione magnetica (ϵ RITC = 6.6×10^4 M⁻¹cm⁻¹). Il complesso SAMN@RITC è stato poi lavato diverse volte sino a completa scomparsa del segnale a tale lunghezza d'onda.

2.10.8 Analisi della cinetica di binding tra SAMN e RITC

Al fine di determinare la migliore condizione sperimentale di incubazione tra le nanoparticelle e la sonda RITC si sono usati due approcci. Un primo approccio è stato quello di valutare la velocità di formazione del legame tra la superficie delle nanoparticelle e la sonda RITC. Nanoparticelle risospese in TMA perclorato 50 mM pH 7 ad una concentrazione finale di 100 mg/L sono state quindi incubate in presenza della sonda a concentrazione costante (50 μ M) ma a tempo variabile di incubazione. Il tutto a temperatura ambiente al riparo dalla luce. L'incubazione si è protratta da un minimo di un minuto a un massimo di 24 ore.

Il secondo approccio è stato invece quello di usare un tempo costante di incubazione ma variandone la concentrazione di sonda. Nanoparticelle risospese in TMA perclorato 50 mM pH 7 sono state quindi incubate a concentrazioni

variabili di RITC. Concentrazioni esplorate 10 μM , 50 μM , 100 μM , 300 μM . Terminata l'incubazione le varie sospensioni sono state separate magneticamente e il complesso SAMN@RITC è stato lavato sino a scomparsa del segnale della sonda libera a 554 nm.

2.10.4 Studio dell'isoterma di Langmuir per il complesso SAMN@RITC

Per lo studio del complesso SAMN@RITC si è utilizzato il modello dell'isoterma di Langmuir (Langmuir I., 1918) al fine di determinare alcuni parametri di adsorbimento della sonda sulla superficie delle nanoparticelle. In particolare, si vuole considerare la capacità di adsorbimento, ossia la quantità massima di molecole di RITC adsorbite sulla superficie delle SAMN, tramite interazioni chimiche e fisiche. Il modello di Langmuir è descritto dalla seguente relazione

$$q = \frac{q_m C_e}{K + C_e}$$

Dove, q è la massa specifica della RITC legata sulla superficie delle SAMN (g di RITC per g di SAMN), q_m è la capacità massima di adsorbimento espresso in g/g, C_e è la concentrazione all'equilibrio di RITC in sospensione espresso in g/L e K è la costante di adsorbimento di langmuir in L/g.

Al nostro scopo si è utilizzato una linearizzazione espressa dalla seguente relazione:

$$\frac{C_e}{q} = \frac{1}{K q_m} + \frac{C_e}{q_m}$$

Si è utilizzato tale modello allo scopo di determinare la costante di Langmuir dei complessi SAMN@avidina e SAMN@RITC, la capacità massima di adsorbimento ed il numero di molecole di avidina e RITC per particella.

2.10.10 Modificazione della sonda RITC con gruppi amminici

Al fine di valutare la natura dell'interazione tra la sonda RITC e la superficie delle nanoparticelle si è provveduto a modificare la sonda legando ad essa tre diversi gruppi amminici primari tramite il gruppo isotiocianato, il cui schema della reazione è stato precedentemente descritto nel paragrafo 2.3 (schema 1). Si è quindi incubato la RITC alla concentrazione di 1 mM in acqua distillata con glicina ed etanolamina alla medesima concentrazione mentre l'etilendiammina è stata incubata alla concentrazione di 20 mM. Il tutto è stato lasciato in agitazione per 14 ore a temperatura ambiente. La parte di ammina che non ha reagito con il gruppo isotiocianato è stata rimossa tramite liofilizzazione.

La sonda così modificata alla concentrazione di 50 μM è stata incubata in presenza di nanoparticelle (100 mg/ml) in TMA perclorato 50 mM in un intervallo di pH compreso tra 7 e 10 a temperatura ambiente per un'ora. Il complesso formatosi è stato separato magneticamente e la quantità di sonda modificata legata è stata determinata spettrofotometricamente valutando la diminuzione di assorbanza a 554 nm. L'esperimento di controllo è stato condotto con la sonda libera RITC al fine di valutare eventuali differenze sulla capacità di interagire con la superficie delle nanoparticelle.

2.10.11 Determinazione della resa quantica del complesso SAMN@RITC

SAMN alla concentrazione di 100 mg/L in acqua distillata sono state incubate in presenza di concentrazioni diverse di RITC, rispettivamente 10 μM , 30 μM e 100 μM per un ora in agitazione a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione il complesso SAMN@RITC è stato poi separato tramite applicazione di campo magnetico esterno e si è provveduto ad effettuare una serie di lavaggi, controllati allo spettrofotometro, sino ad assenza di segnale da parte della sonda a 554 nm. Il complesso così ottenuto, risospeso in acqua distillata, è stato poi controllato al fluorimetro impostando come lunghezza d'onda di eccitazione 554 nm e come intervallo di raccolta dello spettro di emissione 560 nm - 800 nm. Allo stesso

tempo si è verificata l'intensità di fluorescenza emessa dalla sonda libera (1 μM) nelle stesse condizioni. Al fine di determinare la concentrazione di sonda immobilizzata sul complesso SAMN@RITC si è provveduto a trattare quest'ultimo con etanolo al 96% per 30 minuti in agitazione a temperatura ambiente per staccare dalla superficie delle SAMN la sonda legata. Le nanoparticelle nude quindi sono state separate dal surnatante, contenente la sonda libera, tramite campo magnetico e il surnatante letto al fluorimetro impostando le stesse condizioni sperimentali effettuate per il complesso SAMN@RITC. Conoscendo l'intensità di fluorescenza emessa dalla sonda libera a concentrazione nota e quella emessa dalla sonda legata si è calcolato la resa quantica del complesso SAMN@RITC.

2.10.12 Uso della sonda RITC per immobilizzare proteine sulla superficie delle SAMN

Legame dell'enzima glucosio ossidasi (GOx) al complesso SAMN@RITC

Si sciolgono 80 mg di polvere di glucosio ossidasi (E.C. 1.1.3.4; Sigma) in 20 ml di H₂O milliQ, tenuta alla temperatura di 4°C. Essendo la purezza dell'enzima pari al 75%, si è provveduto a calcolarne la concentrazione reale tramite spettrofotometro. Utilizzando la legge di Lambert-Beer e sapendo che l'enzima presenta due picchi massimi di assorbimento, uno a 450 nm e l'altro a 280 nm, caratterizzati da un coefficiente di estinzione molare rispettivamente di $2.82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e di $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ si ne è determinata la concentrazione (Swoboda B. E. P. et al. 1965).

Alla soluzione di enzima si aggiungono poi 30 ml di nanoparticelle risospese, ottenendo un volume finale pari a 50 ml, la cui concentrazione finale per le nanoparticelle è di 1 mg/ml mentre per l'enzima di 1.1 mg/ml. Il tutto viene lasciato poi in agitazione continua per almeno sei ore a 4°C. Infine, si procede con la separazione magnetica al fine di separare i complessi SAMN@RITC-GOx dal surnatante, contenente la parte di enzima che non ha interagito con la superficie del complesso SAMN@RITC e il complesso SAMN@RITC-GOx viene lavato più volte. Ciascun surnatante, ottenuto dalle fasi di lavaggio, viene sottoposto a lettura spettrofotometrica per controllarne l'eventuale presenza di attività enzimatica. L'assenza di attività indica che l'enzima non legato è stato rimosso.

Determinazione della concentrazione dell'enzima GOx immobilizzato sul complesso SAMN@RITC

La quantificazione delle molecole di enzima immobilizzate sulla superficie delle nanoparticelle viene eseguita attraverso metodo fluorimetrico mediante quantificazione del flavin adenin dinucleotide (FAD), cofattore enzimatico. Questo metodo è basato sul rilascio delle molecole del FAD dall'enzima mediante incubazione in ambiente acido (Vianello F. et al. 2002). Il procedimento prevede l'aggiunta di acido cloridrico 0.1 M a pH 1. Il tutto viene tenuto in agitazione tramite end-over-end per 30 minuti a 4°C. La soluzione contenente il FAD rilasciato in seguito al trattamento viene pulita dalle nanoparticelle tramite impiego di campo magnetico esterno. Il surnatante recuperato viene riportato a pH neutro e successivamente sottoposto ad analisi spettrofotometrica e fluorimetrica. Una curva di calibrazione del FAD rilasciato dall'enzima nativo è stata altresì preparata. La curva di calibrazione dell'enzima libero è ottenuta trattando l'enzima allo stesso modo di quello immobilizzato sulle nanoparticelle. Viene solo centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti dopo trattamento in ambiente acido al fine di rimuovere la parte proteica degradata dal FAD presente in soluzione. Il FAD viene poi quantificato fluorimetricamente eccitando a 445 nm e raccogliendone lo spettro a 550 nm.

Legame dell'enzima ammino ossidasi di siero bovino (BSAO) al complesso SAMN@RITC

Nanoparticelle rivestite con la sonda Rodamina B Isotiocianato alla concentrazione di 5 g/L risospese in KCl 0.1 M a pH 7.2, sono state incubate in presenza dell'enzima BSAO a una concentrazione finale di 11 μ M a 4°C in agitazione per 14 ore. La parte di enzima non legato è stata rimossa tramite ripetuti lavaggi. Ciascun surnatante ottenuto dalle fasi di lavaggio è stato controllato spettrofotometricamente per verificare l'eventuale presenza di enzima e per la misura dell'attività enzimatica. I lavaggi sono proseguiti sino ad assenza di attività nel surnatante.

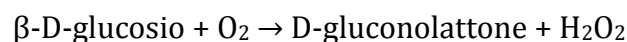
Determinazione della concentrazione dell'enzima BSAO immobilizzato sul complesso SAMN@RITC

La natura e le proprietà di scattering ottico delle nanoparticelle interferiscono con la determinazione delle proteine immobilizzate sulla superficie del complesso SAMN@RITC con l'impiego dei classici metodi di determinazione proteica. Per ovviare a questa limitazione un approccio alternativo per quantificare la quantità di proteine è l'impiego della spettrometria di massa. Un campione di BSAO e uno di SAMN@RITC-BSAO, sono stati dializzati in 40 mM di bicarbonato di ammonio (3 lavaggi per 2 ore ciascuno con un rapporto in volume di 1000:1), portati a secco sotto vuoto e risospesi in 100 µl di ammonio bicarbonato 40 mM. I campioni contenenti l'enzima nativo e quello immobilizzato sulla superficie delle nanoparticelle sono stati normalizzati sulla base della loro attività enzimatica e incubati per 14 ore a 37°C con tripsina con un rapporto enzima/substrato di 120 (w/w, basato sull'attività specifica dell'enzima nativo). Dopo digestione, i campioni sono stati centrifugati a 14000 g per 10 minuti ed esposti a un campo magnetico esterno per 30 minuti allo scopo di rimuovere eventuali nanoparticelle. Infine, il surnatante è stato essiccato sotto vuoto, risospeso in 20 µl di acido formico allo 0.1% ed analizzato mediante LC-MS/MS con spettrometro di massa 6520 Q-TOF accoppiato online con HPLC serie 1200 mediante Chip Cube Interface (Agilent Technologies, CA, USA). I peptidi sono stati separati tramite un gradiente lineare da 0 – 50% di acetonitrile/acido formico allo 0.1% e da un flusso di 0.3 µl min⁻¹. Gli spettri MS/MS dei 4 ioni più intensi sono stati acquisiti per ogni scansione di massa nell'intervallo 350 – 3000 Da. I dati ottenuti sono stati convertiti in Mascot Generic Format (MGF) con il software di analisi MassHunter Qualitative (Agilent Technologies). I file MGF sono stati poi analizzati usando Mascot Search Engine server version 2.3 (Matrix Science, London, UK). Gli spettri sono stati confrontati contro il database SwissProt (versione Maggio 2011, Tassonomia Mammalia, 65453 voci); solo i peptidi identificati con un grado di confidenza ≥ 99% sono stati usati per quantificare la quantità di enzima immobilizzato sulle nanoparticelle. L'ossidazione della metionina come di possibili falsi positivi sono stati inoltre considerati.

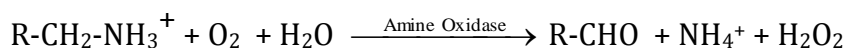
Determinazione dei parametri cinetici enzimatici

Come è stato in precedenza sottolineato (paragrafo 1.3), il legame dell'enzima alle nanoparticelle può causare una denaturazione dello stesso, con una contemporanea perdita dell'attività catalitica in seguito a modificazioni del sito attivo o a causa dell'orientazione dell'enzima rispetto alla nanoparticella. E' necessario dunque valutare i parametri cinetici dell'enzima, quali velocità massima (V_{max}), la costante di Michaelis-Menten (k_m) e la costante catalitica (k_{cat}).

Il protocollo utilizzato è applicabile sia all'enzima nella sua forma libera, sia all'enzima legato alle nanoparticelle. Per quantificare i parametri cinetici della glucosio ossidasi si determina la quantità di perossido di idrogeno prodotto dall'enzima che catalizza la reazione:



mentre nel caso dell'ammino ossidasi il perossido d'idrogeno è prodotto per effetto dell'ossidazione di ammine primarie alifatiche ed aromatiche, secondo la reazione seguente:



Il perossido d'idrogeno diventa poi substrato di un altro enzima, la perossidasi di rafano (HRP), che utilizza altre due molecole, N,N - dimetilanilina e la 4 - amminoantipirina per generare un composto colorato avente picco di assorbimento massimo a 555 nm (Stevanato R. et al. 1990; figura 29).

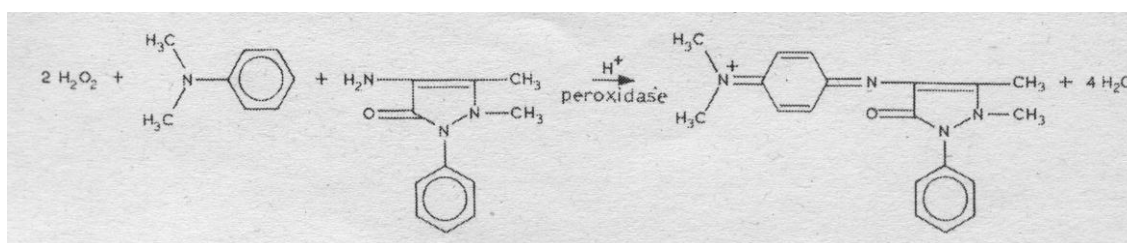


Figura 29: Schema della reazione catalizzata dalla perossidasi in presenza dei substrati H_2O_2 , N,N - dimetilanilina e 4-amminoantipirina. Il prodotto della reazione ha un picco di assorbimento massimo a 555 nm.

Lo studio della cinetica enzimatica è condotto a 25 °C in HEPES 20 mM, pH 7.5 a cui sono aggiunti N,N-dimetilanilina (concentrazione finale pari a 4×10^{-3} M) e 4-amminoantipirina (concentrazione finale di 3×10^{-3} M).

Nel corso della misurazione si aggiungono al tampone HRP a una concentrazione finale di 0.4 μ M, i substrati dei rispettivi enzimi a concentrazione variabile, (glucosio per la GOx, spermina per la BSAO) e gli enzimi stessi. Nell'esperimento la quantità di enzima aggiunto viene mantenuta costante e la concentrazione di substrato viene variata in maniera tale da poter individuare la condizione di saturazione (corrispondente alla V_{max}) e il valore della K_m . Il progredire nel tempo della reazione enzimatica è seguito a 555 nm: ciò che si misura è la variazione dell'assorbanza nel tempo ($\Delta A/min$). Questo valore può essere convertito a unità di attività enzimatica usando il coefficiente di estinzione molare del prodotto colorato, pari a $1.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Capitolo 3

RISULTATI

Le nanoparticelle utilizzate in questo lavoro di tesi sono sintetizzate presso il laboratorio del Prof. Vianello mediante un metodo innovativo e protetto da brevetto internazionale. Il metodo di sintesi è rapido, economico e avviene totalmente in acqua senza impiego di solventi organici, si può quindi definirlo una “green chemistry reaction”. Queste nanoparticelle sono state chiamate SAMN (Surface Active Maghemite Nanoparticle).

Il materiale ottenuto è stato analizzato mediante diverse tecniche strumentali, quali, spettroscopia Mossbauer, effettuata in assenza e in presenza di campo magnetico esterno (7 T) nell’intervallo di temperatura tra 5 e 300 Kelvin (K), da misure di magnetizzazione nell’intervallo di temperatura tra 2 K e 300 K in presenza di un campo magnetico esterno a -7 T e +7 T, dall’analisi di diffrazione a raggi x (XRPD), dalla spettroscopia a infrarosso in trasformata di Fourier e dall’analisi al microscopio elettronico a trasmissione. I risultati ottenuti hanno evidenziato che le nanoparticelle sono costituite da maghemite stechiometrica, sono superparamagnetiche e sono caratterizzate da una peculiare chimica di superficie.

Ulteriore aspetto fondamentale è stata la caratterizzazione in soluzione e la funzionalizzazione superficiale di tali nanoparticelle. Poiché le caratteristiche superficiali delle SAMN sono responsabili del loro comportamento in un mezzo solvente, si è provveduto a studiarne la cinetica di risospensione in mezzi diversi al fine di individuare quello che maggiormente ne stabilizza la superficie. La funzionalizzazione delle SAMN è stata condotta con il duplice scopo di studiarne, da un lato la superficie tramite l’impiego di varie sonde fluorescenti, dall’altro con l’obiettivo di valutare la possibilità di legami diretti tra macromolecole e particella con lo scopo di utilizzarle per applicazioni biotecnologiche quali biosensori

diagnostici di tipo gravimetrico, purificazione proteiche e immobilizzazione di enzimi. Legare direttamente alla superficie delle nanoparticelle molecole organiche offre la possibilità di ridurre costi e tempo necessari per ottenere nanoparticelle idonee a un loro utilizzo. Inoltre, il materiale offre il vantaggio di non necessitare di alcuna modificazione superficiale, essendo già stabile in sospensione, al contrario degli esempi presenti attualmente in letteratura che invece richiedono un rivestimento superficiale.

3.1 Caratterizzazione delle nanoparticelle

3.1.1 Analisi Mossbauer e in spettroscopia infrarosso

L'analisi Mossbauer viene ampiamente usata per identificare la natura degli ossidi di ferro, quali la maghemite e la magnetite. La maghemite è una forma allotropica della magnetite e questi due ossidi di ferro sono cristallograficamente isomorfi: la principale differenza è dovuta alla presenza esclusiva di ioni Fe^{3+} nella maghemite, mentre nella magnetite compaiono sia ioni Fe^{3+} , che ioni Fe^{2+} . In particolare la tecnica individua le transizioni nucleari del ^{57}Fe , presente come frazione isotopica stabile nel 2.2 % del ferro totale, che, nel caso della maghemite sono rappresentati dai nuclei degli atomi Fe^{3+} . Nella maghemite gli atomi Fe^{3+} si trovano distribuiti in due diverse posizioni del reticolo cristallino indicati rispettivamente con le lettere A e B (figura 30). Nella magnetite questi ioni si distribuiscono uniformemente tra i siti A e i siti B mentre nella maghemite compaiono lacune nei siti B.

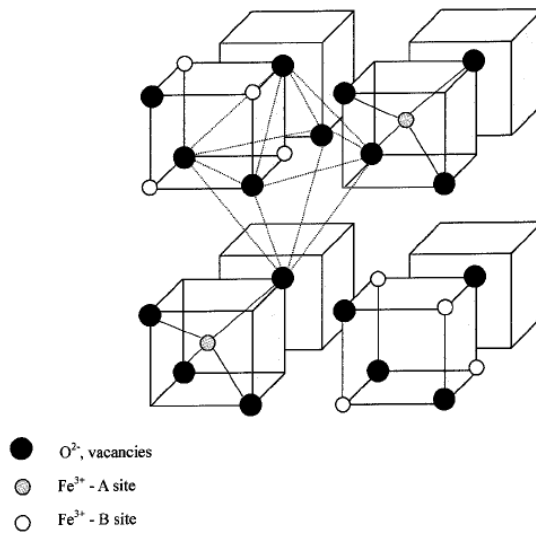


Figura 30: Rappresentazione schematica dei siti non equivalenti dello ione ferro nella struttura della maghemite (Zboril R., 2002).

Gli spettri Mossbauer ottenuti hanno permesso di determinare il tipo di ossido di ferro di cui sono composte le nanoparticelle utilizzate in questo lavoro. Gli spettri risultanti sono mostrati nelle figure 31 e 32. Spettri che sono stati eseguiti sia in presenza sia in assenza di campo magnetico esterno al variare delle temperatura per i motivi citati nel paragrafo 2.9 dei Materiali e Metodi.

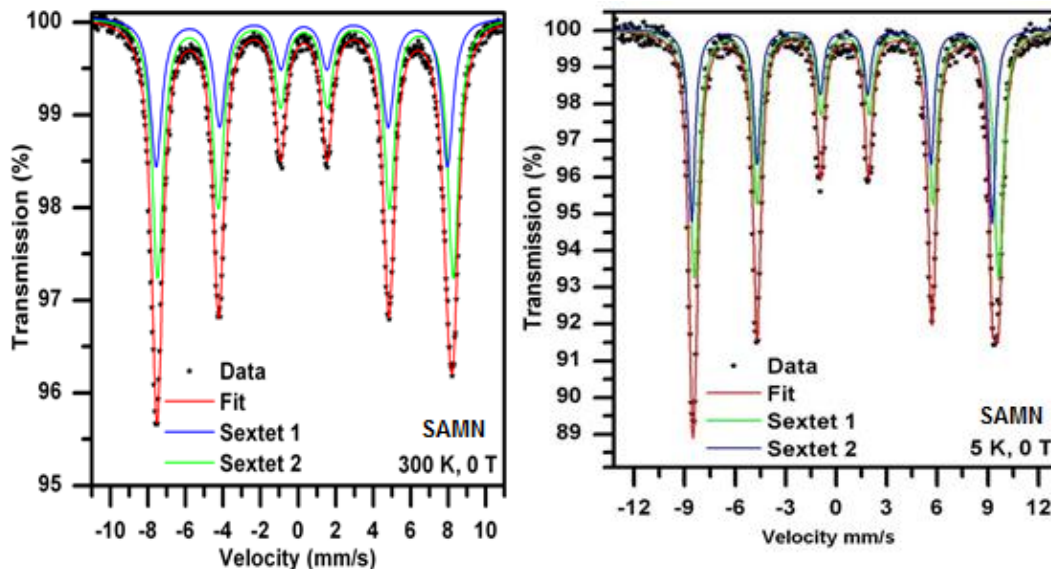


Figura 31: Spettro Mossbauer di nanoparticelle in assenza di campo magnetico a 300 K e 5 K di temperatura.

Analizzando gli spettri si ottiene che il rapporto tra le aree spettrali è pari a 5:3 riconducibile alla formula stechiometrica della maghemite $(\text{Fe}^{3+})^T(\text{Fe}^{3+}_{5/3}\text{O}_{1/3})^{\text{O}}\text{O}_4$ dove la prima parentesi indica la composizione del sito A, mentre la seconda quella del sito B e o indica una lacuna. In altre parole la maghemite che compone le nanoparticelle è stechiometricamente pura.

Tale studio è stato effettuato in collaborazione con il Prof. Umberto Russo e il Dott. Luca Nodari del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova e il Prof. Radek Zboril del Centre for Nanomaterial Research dell'università Palacky, Olomouc, Repubblica Ceca.

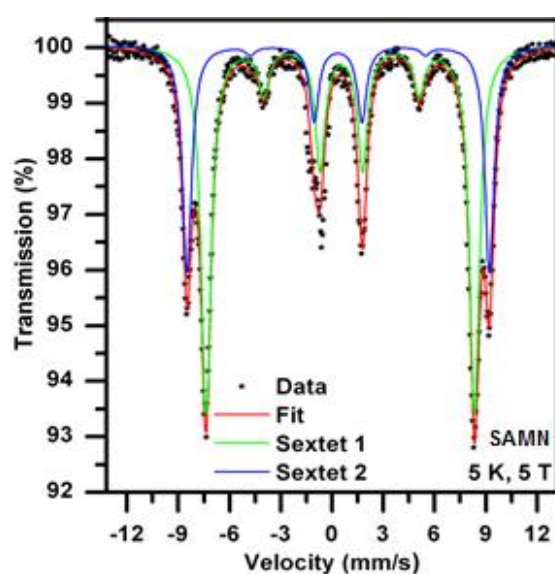


Figura 32: Spettro Mossbauer di nanoparticelle in campo magnetico di intensità 5 T, $T = 5$ K.

Ulteriore conferma viene dall'analisi mediante spettroscopia infrarossa effettuato nel medio infrarosso (figura 33). Negli spettri si nota la regione di intenso assorbimento del legame Fe-O tra 400 e 800 cm^{-1} , in particolare le bande spettrali trovano riscontro con i valori riportati in letteratura per la maghemite: 700 cm^{-1} , 640-660 cm^{-1} , 580 cm^{-1} , 560 cm^{-1} , 460 cm^{-1} , 430 cm^{-1} , 390 cm^{-1} e 305 cm^{-1} (Cornell R.M., 2003; Roca A.G., 2007; Daou T.J., 2008). Tali misure sono state effettuate in collaborazione con il Prof. Umberto Russo del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

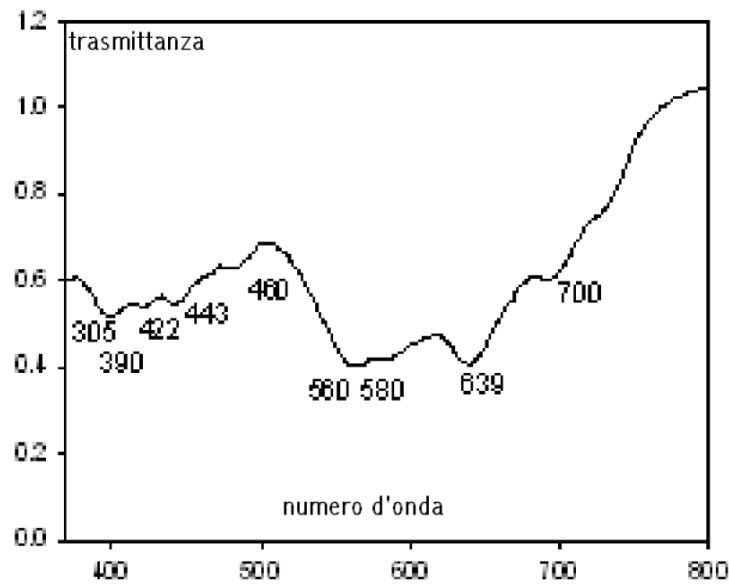


Figura 33: Spettro FTIR delle nanoparticelle nel medio infrarosso.

3.1.2 Misure di magnetizzazione

L'analisi delle proprietà magnetiche delle nanoparticelle, legata alle dimensioni delle stesse, è uno strumento utile a fornire indicazioni sul loro diametro che va tuttavia confrontato con quello ottenuto al microscopio elettronico a trasmissione. Il confronto tra i cicli d'isteresi a 2 K e 300 K permette di sfruttare la caratteristica dei materiali superparamagnetici basata sull'osservazione della riduzione del comportamento paramagnetico a temperature vicine allo zero assoluto. Le analisi del ciclo d'isteresi effettuate a 2 K e a 300 K, riportate in figura 34, mostrano come a 2 K l'isteresi sia effettivamente presente, come ci si aspetta da un materiale superparamagnetico alla temperatura di bloccaggio, temperatura al di sotto della quale i momenti magnetici rimangono fissi all'ultima configurazione assunta, mentre a 300 K l'isteresi è presente ma in misura minore.

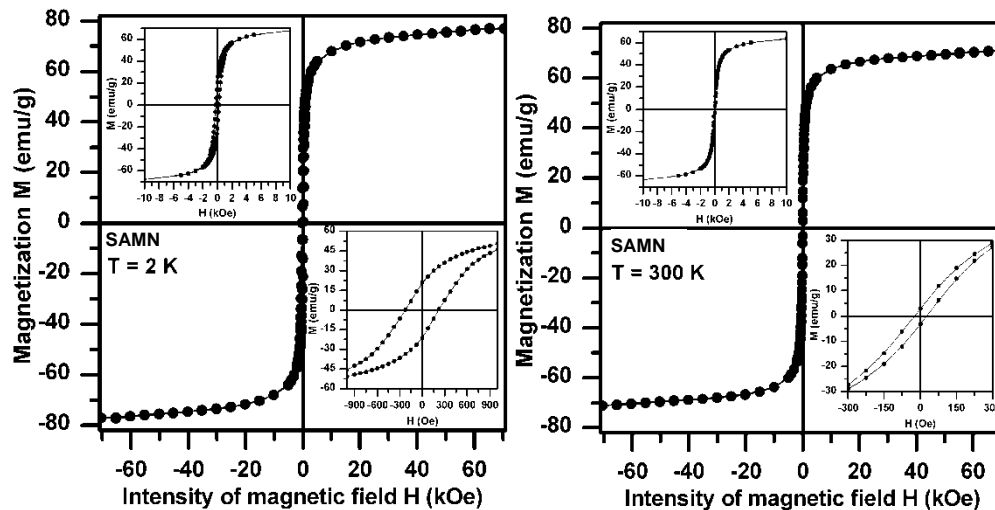


Figura 34: Ciclo d'isteresi a 2K e 300K.

La diminuzione dell'entità dell'isteresi è in linea con il comportamento tipico di materiali superparamagnetici, ossia a temperature superiori alla temperatura di bloccaggio il materiale non conserva magnetizzazione. Tuttavia, in minor misura, l'isteresi è presente anche a 300K, e questo è imputabile alla presenza di particelle di dimensioni maggiori che, probabilmente, superano la soglia dei 10 nm, al di sotto dei quali il materiale può essere considerato superparamagnetico (Coe J.M.D., 1972). In sospensione perciò, ci troviamo nella condizione di polidispersività, essendo però tale popolazione rappresentata da una piccola frazione di nanoparticelle la loro presenza non viene considerata significativa al fine della determinazione delle proprietà superparamagnetiche del materiale, governato invece dalle particelle con diametro uguale o inferiore a 10 nm rappresentante della maggioranza del campione.

3.1.3 Diffrazione a raggi x (XRPD)

L'analisi ai raggi x ha evidenziato il tipico profilo della maghemite e/o magnetite. I due ossidi di ferro sulla base dell'analisi XRPD non possono essere distinti fra loro poiché entrambi possiedono la stessa struttura cristallografica. Non sono state altresì evidenziate tracce di ossido di ferro amorfo, né di ematite (figura 35).

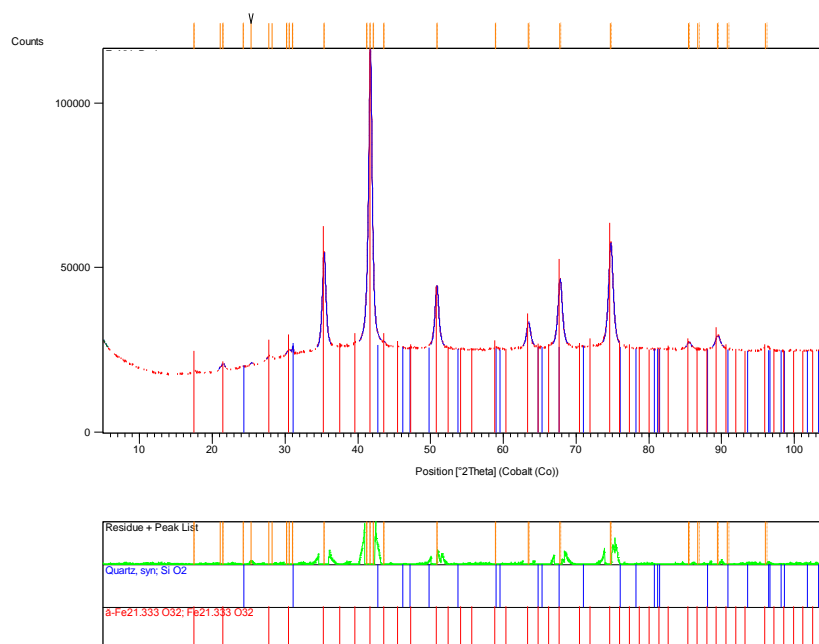


Figura 35: Profilo di diffrazione ai raggi X delle nanoparticelle.

3.1.4 Analisi mediante microscopio a trasmissione e scansione elettronica

Al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) le nanoparticelle risultano essere di forma sferica con un diametro medio di 10 ± 2 nm come riportato nell'istogramma di polidispersività (figura 36), in perfetto accordo con quanto ottenuto dalle misure di magnetizzazione. Si notano altresì ammassi di nanoparticelle imputabili alla sottrazione del mezzo di sospensione durante il processo di deposizione sul retino. Spostandosi lungo i bordi si possono invece notare singole nanoparticelle, non sovrapposte delle quali è possibile misurare il diametro (figura 37a). Dall'analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM) si può invece notare come le nanoparticelle abbiano una forma pressoché sferica ben definita (figura 37b).

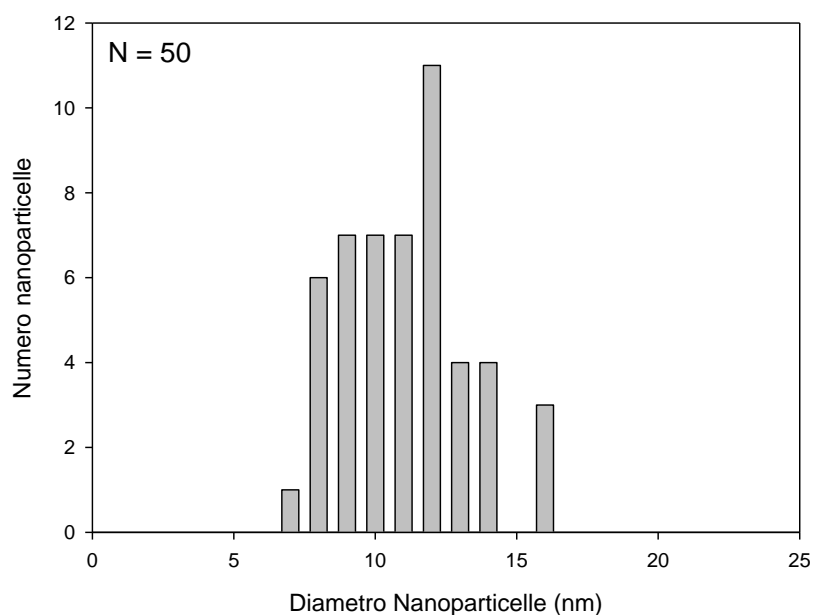


Figura 36: Diametro medio delle nanoparticelle di maghemite.

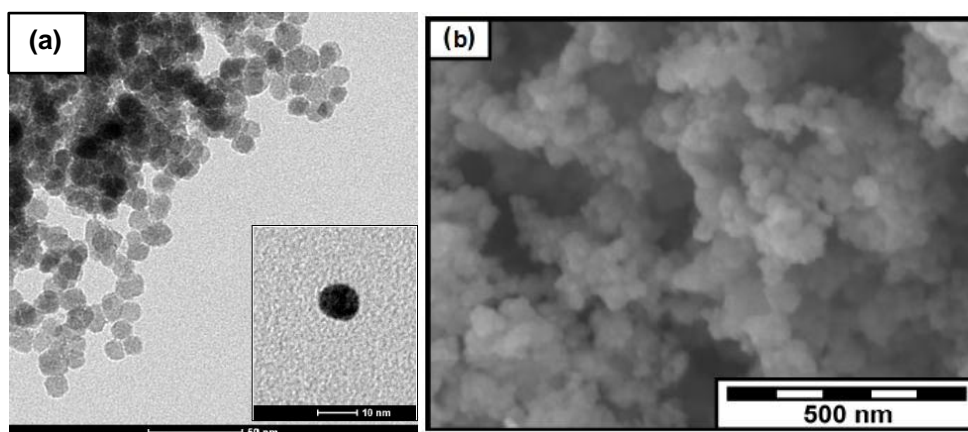


Figura 37: (a) Immagine al TEM di nanoparticelle di maghemite. Nel riquadro è riportata l'immagine di una nanoparticella singola (b) immagine delle stesse nanoparticelle al SEM.

3.1.5 Cinetiche di risospensione delle nanoparticelle in mezzi diversi

Allo scopo di caratterizzare la superficie delle nanoparticelle è importante lavorare con sospensioni stabili. Con l'obiettivo di individuare il mezzo acquoso più idoneo in cui risospenderle si è provveduto a determinarne la cinetica di risospensione in funzione della loro concentrazione e del mezzo utilizzato. Le nanoparticelle, in un intervallo di concentrazione compreso tra 10 mg/L e 100 mg/L, sono state quindi

risospese, tramite bagno a ultrasuoni, in tampone fosfato a pH 7, tampone carbonato a pH 10, tetrametilammonio perclorato 50 mM a pH 7 ed acqua distillata. Ogni 30 minuti la sospensione è stata controllata allo spettrofotometro acquisendo l'intero spettro tra 200 nm ed 800 nm. L'assorbanza massima rilevata in funzione del tempo di sonicazione ha permesso di determinare la costante di risospensione nei rispettivi mezzi (tabella 3).

Condizioni sperimentali	Costante cinetica di dispersione k (h⁻¹)	Concentrazione massima al termine della cinetica di dispersione mg/L
Tampone Fosfato 0.1 M, pH 7.0	0.71 ± 0.15	41
Tampone Carbonato 0.1 M, pH 10.0	1.30 ± 0.64	14
Tetrametilammonio Perclorato 50 mM, pH 7.0	1.49 ± 0.30	45
Acqua Distillata	0.85 ± 0.055	100

Tabella 3: Calcolo della costante cinetica e concentrazione massima di nanoparticelle di maghemite disperse mediante sonicazione in mezzi diversi. Concentrazione di nanoparticelle utilizzate 100 mg/L.

Dall'analisi dei valori ottenuti dalla costante di risospensione si deduce che la costante è indipendente dalla concentrazione di nanoparticelle utilizzate ma che la presenza di determinati ioni, come riportato in letteratura (Lucas T., 2008), è in grado di influenzare la stabilità della sospensione stessa. Infatti in acqua le nanoparticelle sono completamente risospese e stabili per mesi, cosa che invece non accade in presenza di alcuni sali. In particolare i mezzi meno idonei alla loro risospensione si sono dimostrati essere il tampone carbonato e quello fosfato mentre il tetrametilammonio perclorato si è dimostrato essere il mezzo acquoso nel quale la sospensione è stabile per lunghi periodi.

Secondo quanto riportato in letteratura (Lucas T., 2008) lo ione perclorato e lo ione tetrametilammonio esercitano un'azione stabilizzante sia a pH acido che basico. Lo ione sodio, come il potassio, esercitano invece un'azione destabilizzante sulla superficie delle nanoparticelle portando alla formazione di aggregati e precipitati entro poche ore. Sulla base di tali considerazioni si è andati a valutare l'effetto del pH sulla cinetica di risospensione delle nanoparticelle. Si sono quindi risospese le nanoparticelle alla concentrazione di 100 mg/L, mediante sonicazione, in tetrametilammonio perclorato 50 mM in un intervallo di pH compreso tra 3.5 e 11 e si è provveduto ad acquisirne lo spettro nell'intervallo 200 – 800 nm ogni 30 minuti. In figura 38 sono riportati i valori ottenuti della costante cinetica di risospensione in funzione del pH.

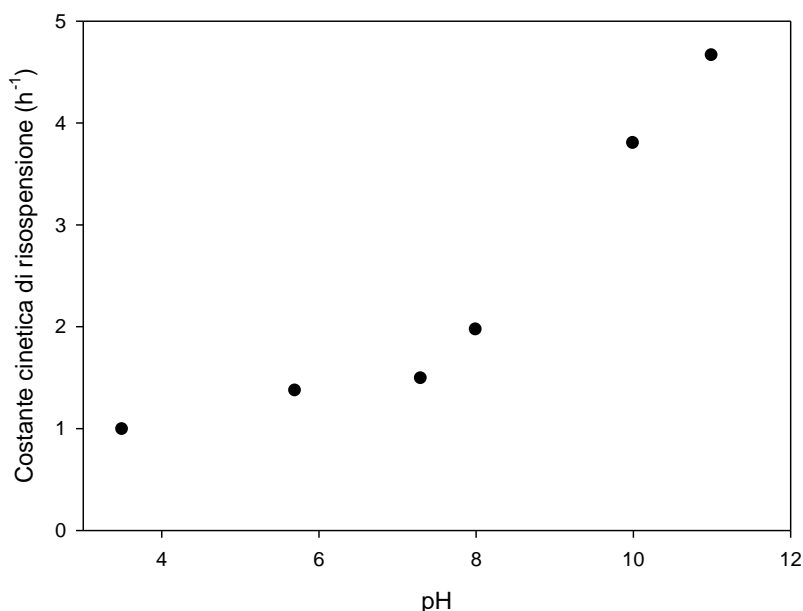


Figura 38: Calcolo della costante cinetica in funzione del pH. Concentrazione di nanoparticelle utilizzate 100 mg/L in tetrametilammonio perclorato 50 mM. La costante è stata calcolata alla lunghezza d'onda di 430 nm.

Si può osservare come la costante cinetica di risospensione aumenti in funzione del pH variando da 1.0 h⁻¹ a pH 3.5 a 4.8 h⁻¹ a pH 11. Una possibile spiegazione può essere imputata al coinvolgimento degli OH⁻ presenti in soluzione che esercitano un'azione di controllo sul comportamento colloidale della sospensione particellare. Infatti lo spettro FTIR del preparato fresco di SAMN trattato per 14 ore a 110 °C (figura 39), allo scopo di eliminare eventuali tracce di umidità, conferma la

presenza di gruppi OH⁻ sulla superficie, mostrando un picco centrato a 869 cm⁻¹ attribuibile allo stretching del legame Fe-OH, come riportato in letteratura (Mornet S., 2005). La presenza di gruppi OH⁻ sulla superficie delle nanoparticelle spiegherebbe la loro affinità per i solventi acquosi rispetto a quelli organici.

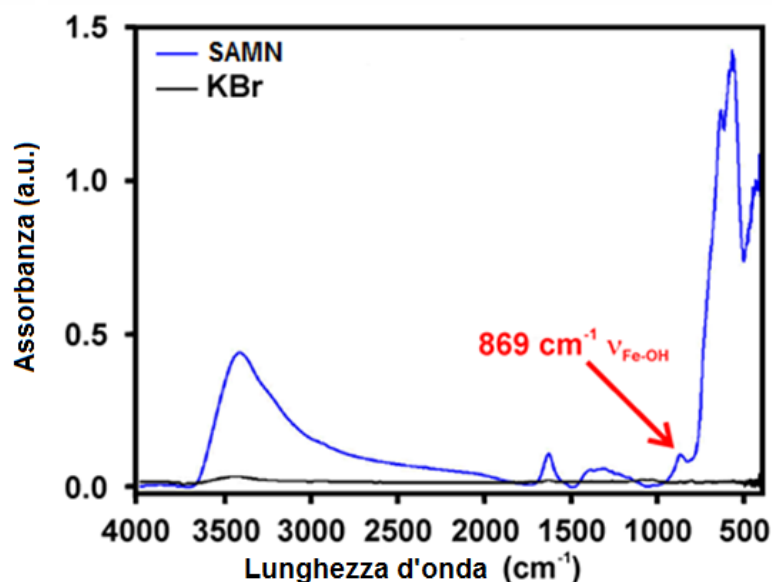


Figura 39: Spettro FTIR delle nanoparticelle liofilizzate e trattate a 110°C per 14 ore. A 869 cm⁻¹ si può osservare lo stretching vibrazionale del legame Fe-OH.

3.1.6 Analisi tramite spettroscopia UV-VIS

L'utilizzo della spettroscopia UV-VIS oltre ad essere molto semplice e di largo utilizzo, fornisce informazioni sulle transizioni elettroniche degli atomi presenti in superficie e quindi sulle proprietà di scattering delle particelle. Avendo quest'ultime un diametro dell'ordine dei nanometri il comportamento riscontrato è quello tipico di una sospensione.

In figura 40 è riportato uno spettro di nanoparticelle in tampone fosfato 0.1 M pH 7 dove, si può notare, un elevato scattering della radiazione, tipico di sospensioni come quelle in oggetto.

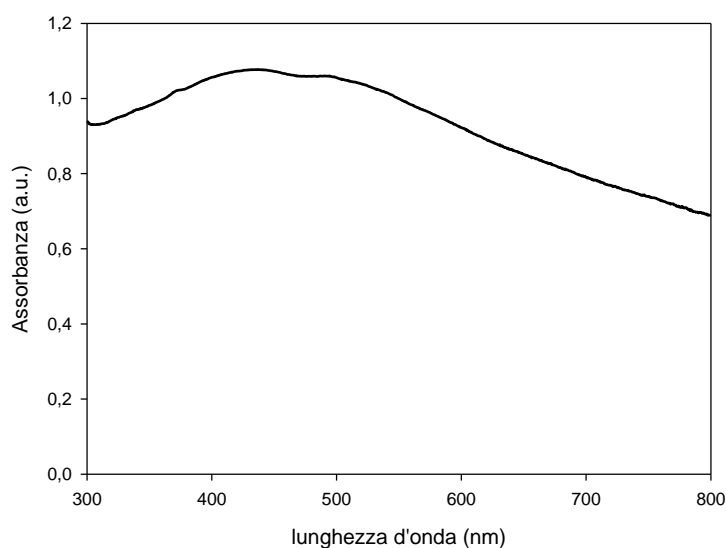


Figura 40: Spettro ottico delle nanoparticelle (100 mg/L) in sospensione in tampone fosfato 0.1 M pH 7.

Lo spettro UV-Visibile delle nanoparticelle è caratterizzato da un ampio massimo di assorbimento a 430 nm ed, una volta sottratto il contributo dovuto allo scattering, da un coefficiente di estinzione molare di $1520 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ calcolato come Fe_2O_3 , al quale si sovrappone una spalla a 492 nm. Tale massimo di assorbimento si sposta a 397 nm in acqua distillata lasciando invariata la spalla a 492 nm. Ulteriori variazioni dello spettro ottico si osservano in funzione del pH di nanoparticelle risospese in tetrametilammonio perclorato 50 mM dove si registra, infatti, in funzione del pH, uno spostamento della lunghezza d'onda di massimo assorbimento da 430 nm nell'intervallo di pH 3.5 – 8.8 a 380 nm per valori di pH compresi tra 10 e 11 (figura 41). Ciò conferma come la superficie sia coinvolta nel determinare le caratteristiche chimico – fisiche del materiale, caratteristiche che ne determinano sia la stabilità che la capacità d'interagire con altre molecole da parte delle nanoparticelle. Si può quindi affermare che il pH non influenza soltanto la lunghezza d'onda di massimo assorbimento, ma da esso dipende anche la stabilità in sospensione delle nanoparticelle evidenziando una correlazione con fenomeni superficiali quali protonazione, deprotonazione e adsorbimento di ioni.

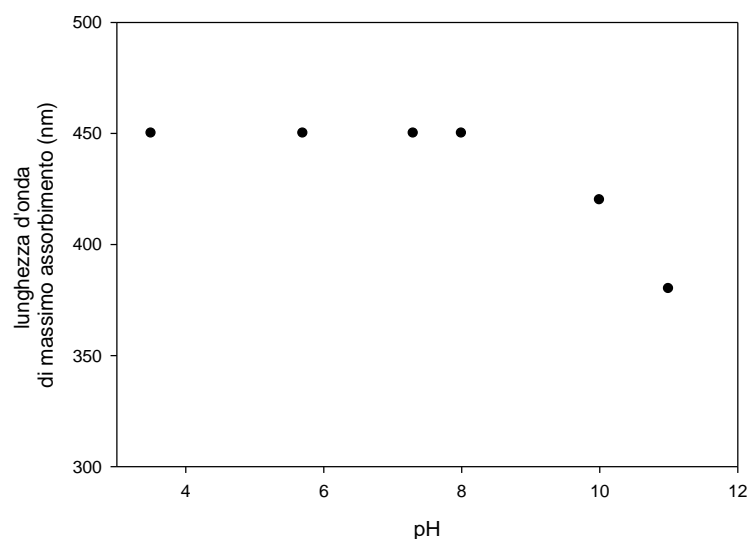


Figura 41: *Variazione della lunghezza d'onda di massimo assorbimento della sospensione colloidale delle nanoparticelle in funzione del pH. Concentrazione nanoparticelle utilizzate 100 mg/L risospese in TMA perclorato 50 mM. Il pH è stato controllato tramite piccole aggiunte di acido perclorico e tetrametilammonio idrossido.*

3.1.7 Interazione diretta tra proteine e la superficie delle nanoparticelle

L'immobilizzazione di proteine, quali enzimi, anticorpi e altri composti biologicamente attivi, su un supporto solido ed inerte ha trovato negli ultimi anni numerose applicazioni nel campo biotecnologico e biomedico, poiché un supporto solido conferisce il vantaggio di una maggiore resistenza chimica e riduce la possibilità di attacco da parte di agenti microbici. In particolare, le particelle magnetiche vengono in questo senso largamente impiegate grazie alle loro proprietà magnetiche: questo consente di attuare procedure di separazione magnetica atte all'identificazione e purificazione di diverse specie di interesse chimico e biologico. I vantaggi sono molteplici tra cui la semplicità della tecnica, la velocità con cui avviene la separazione e l'estrema specificità con cui una molecola può essere separata da una miscela complessa (Koneracká M., 2006).

A tal scopo proteine diverse, quali l'avidina, la biotina, l'albumina di siero bovino (BSA) e la perossidasi di rafano (HRP), che presentano un largo impiego in campo biotecnologico (analisi immunoistochimica, saggio ELISA, chemiluminescenti),

sono state studiate in presenza di SAMN, per ottenere informazioni sulle interazioni.

Preparazione e caratterizzazione del complesso SAMN@BSA

L'albumina è una delle proteine sieriche più abbondanti, con funzione di mantenere la pressione colloidale osmotica del sangue, di trasportatore di acidi grassi a catena lunga e viene ampiamente usata in campo biotecnologico in numerose applicazioni quali saggi ELISA, analisi immunocitochimiche e per stabilizzare gli enzimi durante saggi di digestione enzimatica (Steinitz M., 2000). Viene sintetizzata a partire dal fegato sotto forma di precursore inattivo, proalbumina, ed è costituita da una singola catena di 607 aminoacidi con un peso molecolare di 66 kDa (Peters T., 1977). La sua struttura tridimensionale è stata determinata tramite diffrazione ai raggi x e presenta una dimensione di $1.7 \times 4.2 \times 4.2$ nm³ (Bloomfield V., 1966). È costituita prevalentemente da α -eliche, circa il 67%, e il rimanente da regioni random coil mentre non contiene foglietti- β (figura 6) (Carter D.C., 1994).

SAMN alla concentrazione di 50 mg/L risospeso in tetrametilammonio perclorato 50 mM pH 7 sono state incubate in presenza di albumina di siero bovino (100 mg/L) in agitazione per 14 ore a 4 °C. Terminata l'incubazione le nanoparticelle sono state separate tramite impiego di un campo magnetico esterno e i surnatanti ottenuti sono stati controllati spettrofotometricamente. Il complesso SAMN@BSA è stato poi lavato diverse volte sino a quando lo spettro ottico non ha più evidenziato presenza di biomolecole libere. Analisi FTIR e al TEM sono state poi impiegate per verificare l'avvenuta immobilizzazione della proteina sulla superficie delle SAMN.

L'analisi all'infrarosso del complesso SAMN@BSA paragonato a quello della proteina libera, ha evidenziato la presenza di bande attribuibili alla proteina nell'intervallo 1000 - 1700 cm⁻¹ e di una piccola banda a 2900 cm⁻¹ (figura 42). In modo particolare sono presenti un picco a 1650 cm⁻¹ e 1500 cm⁻¹ attribuibili rispettivamente alla banda dell'ammide I e dell'ammide II. La banda dell'ammide I è attribuita alla combinazione del legame C=O e dello stretching del legame C-N del gruppo ammidico. La banda dell'ammide II invece è attribuita alla combinazione dello stretching del legame C-N e al bending del legame N-H del gruppo ammidico.

La banda a 2900 cm^{-1} rappresenta la vibrazione di legami esterei e C-H (Militello V., 2003).

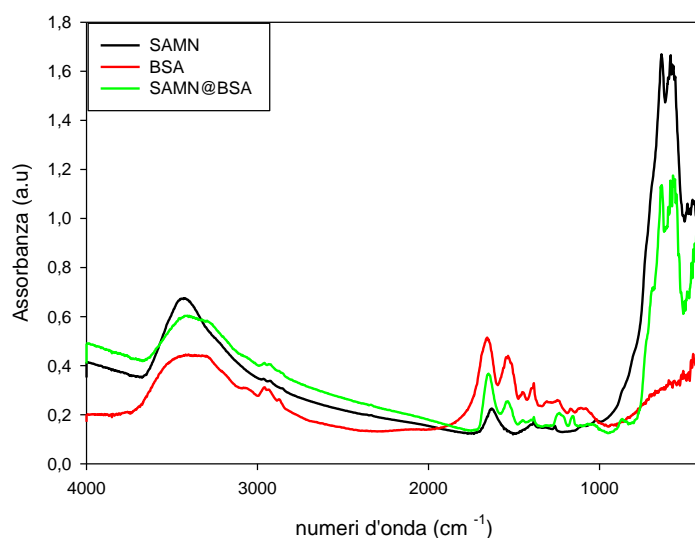


Figura 42: Spettro FTIR delle nanoparticelle di maghemite, dell'albumina di siero bovino e del complesso SAMN@BSA.

Il complesso SAMN@BSA, analizzato al microscopio a trasmissione elettronica mostra la presenza di un rivestimento organico caratterizzato da uno spessore compreso in un intervallo di 4 – 7 nm che circonda le nanoparticelle (figura 43). Il rivestimento è in accordo con la dimensioni della proteina riportata in letteratura, $1.7 \times 4.2 \times 4.2\text{ nm}^3$ (Bloomfield V., 1966).

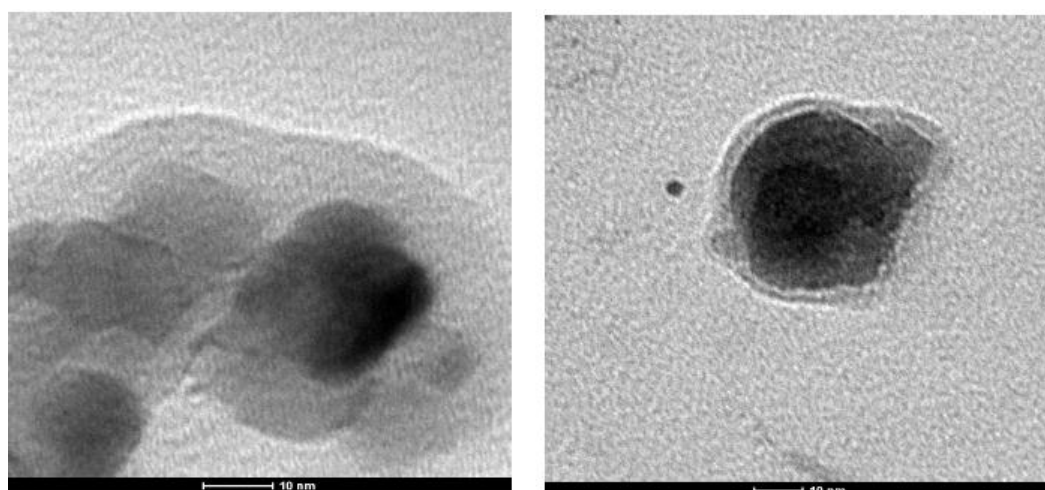
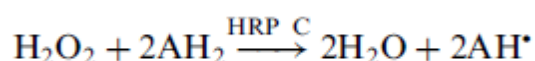


Figura 43: Immagini al TEM del complesso SAMN@BSA.

Preparazione e caratterizzazione del complesso SAMN@HRP

La perossidasi di rafano (HRP) è un enzima contenente eme, estratto dal rafano, pianta erbacea perenne coltivata nella zone temperate. E' costituita principalmente dall'isoenzima di tipo C costituito da una singola catena polipeptidica di 308 aminoacidi e un peso molecolare di 44 kDa. La molecola è composta dal gruppo eme e due atomi di calcio. I siti di legame per il calcio sono collocati in posizione distale e l'altro prossimale rispetto al piano dell'eme e sono collegati a questa regione tramite un sistema di legami idrogeno (figura 7). Gli ioni calcio sono essenziali per l'integrità strutturale e funzionale dell'enzima, difatti la perdita di questi ioni porta ad una diminuzione dell'attività e della stabilità dell'enzima oltre che a un cambiamento dell'intorno del gruppo eme. La struttura secondaria è costituita prevalentemente da α -eliche, da una piccola parte di foglietti- β e le dimensioni del cristallo sono di $6.2 \times 3.5 \times 7.5 \text{ nm}^3$.

La perossidasi catalizza la seguente reazione usando come agente ossidante il perossido di idrogeno (H_2O_2):



dove AH_2 rappresenta il substrato riducente e AH^\bullet il radicale prodotto. Tipici substrati sono fenoli aromatici, fenoli acidi, indoli, ammine e composti solfonati.

Viene utilizzata in applicazioni biotecnologiche, quale componente di kit diagnostici basati su test immunologici, chemiluminescenti e per il trattamento delle acque industriali di scarico (Veitch N.C., 2004).

SAMN alla concentrazione di 50 mg/L risospese in acqua distillata sono state incubate in presenza di perossidasi di rafano (100 mg/L) in agitazione a 4 °C. Terminata l'incubazione le nanoparticelle sono state separate tramite impiego di un campo magnetico esterno e i surnatanti ottenuti controllati spettrofotometricamente. Il complesso SAMN@HRP è stato poi lavato diverse volte sino a quando non è stata più rilevata attività enzimatica, dovuta alla presenza di enzima libero, nel surnatante. Analisi FTIR e al TEM sono state poi impiegate per verificare l'avvenuta immobilizzazione della proteina sulla superficie delle SAMN.

L'analisi all'infrarosso del complesso SAMN@HRP paragonato a quello della proteina libera, ha evidenziato la presenza di bande attribuibili alla proteina nell'intervallo $1000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ e di una piccola banda a 2900 cm^{-1} (figura 44). In

modo particolare sono presenti un picco a 1660 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} attribuibili rispettivamente alla banda dell'ammide I e dell'ammide II. I piccoli picchi intorno a 1400 cm^{-1} si trovano nell'intervallo vibrazionale corrispondente allo stretching del gruppo carbossilato (Kaposi A.D., 1999; Maeda Y., 2002).

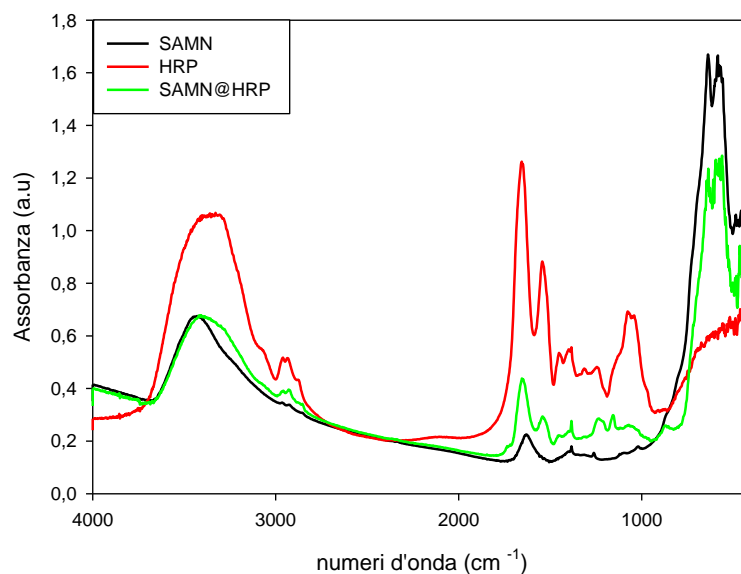


Figura 44: Spettro FTIR delle nanoparticelle di maghemite, della perossidasi di rafano e del complesso SAMN@HRP.

A ulteriore conferma dell'analisi infrarosso vi sono le immagini al microscopio a trasmissione elettronica del complesso SAMN@HRP dove si evidenzia la presenza di un rivestimento organico di circa 7 nm che circonda le nanoparticelle (figura 45). Il rivestimento è in accordo con la dimensioni della proteina riportata in letteratura, $6.2 \times 3.5 \times 7.5\text{ nm}^3$ (Vianello F., 2000).

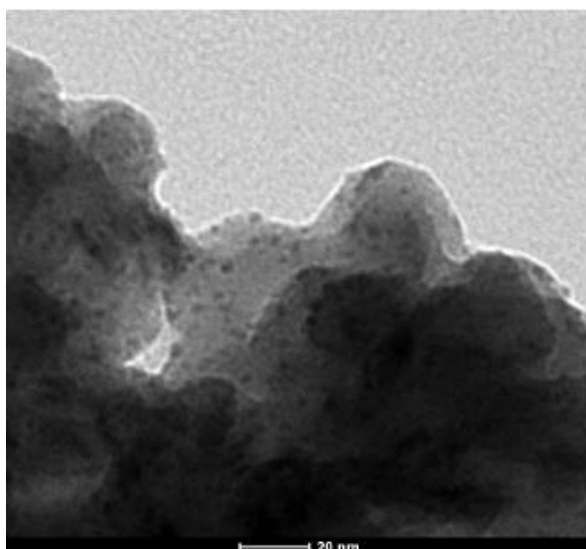


Figura 45: Immagine al TEM del complesso SAMN@HRP dove si può osservare la presenza di una matrice organica meno elettrondensa che circonda le nanoparticelle invece più elettrondense.

La costante catalitica dell'enzima immobilizzato calcolata secondo il metodo descritto nel paragrafo 2.10.5 è risultata ridotta del 50% ($6,6 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$) rispetto a quello nativo. Come riportato nel paragrafo 1.3, questo è imputato a cambi conformazionali nella struttura enzimatica in seguito all'immobilizzazione o alla parziale denaturazione dell'enzima nelle condizioni usate per immobilizzarlo sulla superficie delle nanoparticelle e ad effetti sterici che diminuiscono l'accessibilità del sito attivo al substrato.

Preparazione e caratterizzazione dei complessi SAMN@avidina e SAMN@biotina

L'avidina è una proteina estratta dall'albume di uova di origine aviaria, di rettili ed anfibi, e viene impiegata in campo biotecnologico nelle applicazioni di tipo diagnostico (Zerega B., 2001). E' una proteina basica tetramerica di 67 kDa formata da quattro subunità identiche ciascuna delle quali contiene 128 aminoacidi (figura 46). Le dimensioni del tetramero ottenute tramite analisi di cristallografia sono di $5,6 \times 5 \times 4 \text{ nm}^3$ (Zsila F., 2009). Ciascun monomero può essere descritto come un barile- β antiparallelo a otto filamenti: la cavità centrale che viene a formarsi è il luogo dove avviene il legame con la biotina, molecola per la quale presenta un elevata costante di affinità ($K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$).

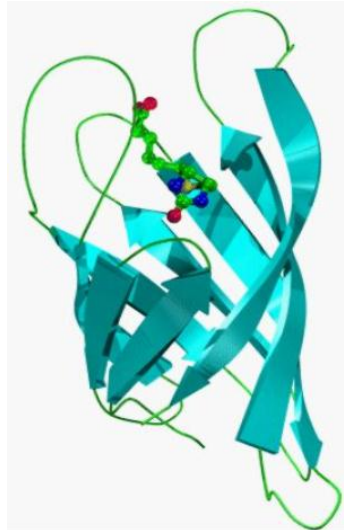


Figura 46: *Struttura tridimensionale di uno dei quattro monomeri dell'avidina. In azzurro sono visibili gli otto foglietti antiparalleli e in verde le regioni di loop che li collegano. Nella cavità del barile è rappresentata la biotina.*

Il sito di legame per la biotina contiene una serie di residui polari e aromatici (quattro triptofani in particolare) dove i residui polari formano legami idrogeno ed interazioni di Van der Waals con la biotina stessa, mentre quelli aromatici formano una tasca idrofobica dentro la quale risiede stabilmente la molecola. Durante la formazione del legame, la biotina sostituisce le molecole di solvente presente nella tasca e uno dei loop si ordina e blocca la biotina all'interno della cavità: questo assicura un legame forte e stabile (Livnah O., 1993).

La biotina conosciuta come vitamina H o B7, è una vitamina idrosolubile dal peso molecolare di 244 Da. E' contenuta nel fegato, nelle uova, nei cereali, oltre ad essere prodotta dalla flora batterica intestinale. Una sua carenza causa dermatiti ed alterazioni della crescita. Strutturalmente è costituita da un anello imidazolico e uno tiofenico a cui è poi legata una catena laterale di acido valerianico (figura 47).

Svolge funzione di cofattore di varie carbossilasi ATP-dipendenti; è legata al sito attivo dell'enzima tramite legame amidico che coinvolge l'acido valerianico ed un residuo di lisina del sito. Le principali carbossilasi umane alle quali la biotina partecipa sono: la piruvato carbossilasi, la propionil-CoA carbossilasi, la metilcrotonil carbossilasi e l'acetil-CoA carbossilasi. Viene utilizzata in applicazioni cliniche e biomediche per derivatizzare, utilizzando il suo gruppo carbossilico, molecole di varia natura, tra cui anticorpi e proteine.

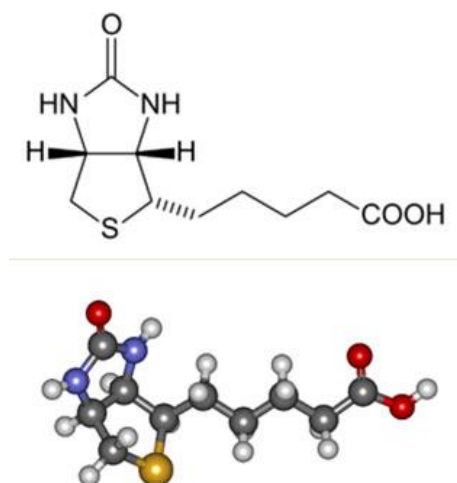


Figura 47: Struttura della biotina. I colori indicano: il carbonio (nero), l'ossigeno (rosso), l'azoto (blu), lo zolfo (giallo) e l'idrogeno (grigio).

Nel corso dello studio, le SAMNs alla concentrazione di 50 mg/L, risospese in tetrametilammonio perclorato 50 mM pH 7, sono state incubate in presenza di avidina (50 mg/L) e di biotina (100 μ M) in agitazione per 14 ore a 4 °C. Terminata l'incubazione le nanoparticelle sono state separate tramite impiego di un campo magnetico esterno e i surnatanti ottenuti controllati spettrofotometricamente. I complessi SAMN@avidina e SAMN@biotina sono stati poi lavati diverse volte sino a quando lo spettro ottico non ha più evidenziato presenza di avidina e biotina libere. Si è proceduto quindi a verificare la presenza di tali biomolecole sulla superficie della SAMN tramite analisi FTIR, spettrometria UV-Vis e TEM.

Nel caso del complesso SAMN@biotina l'analisi dello spettro FTIR, paragonato con quello della biotina libera, evidenzia la presenza di una banda a 1650 cm^{-1} e di una spalla a 2900 cm^{-1} , corrispondenti rispettivamente al gruppo carbonilico del legame ammidico e alla vibrazione di legami esterei e C-H (figura 48). Dallo stesso spettro si può notare la scomparsa di due bande rispettivamente a 1700 cm^{-1} e a 3300 cm^{-1} corrispondenti allo stretching del gruppo ureido - carbonilico e a quello del legame N-H (Lapin N.A., 2009).

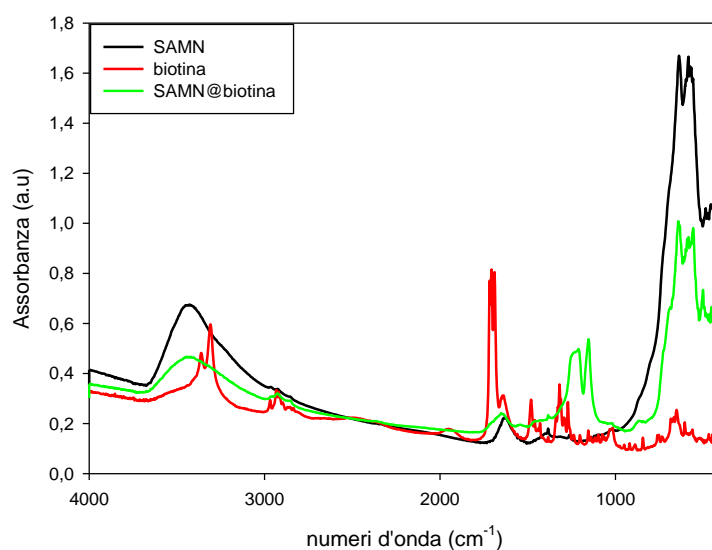


Figura 48: Spettro FTIR delle nanoparticelle di maghemite, della biotina e del complesso SAMN@biotina.

Tali risultati ottenuti suggeriscono che la biotina interagisca con la superficie delle SAMN mediante il gruppo carbossilico terminale e il doppio anello condensato, probabilmente coordinando gli atomi di ferro superficiali senza coinvolgere i gruppi OH, come suggerito da Chen (Chen L.X., 2002). Inoltre l'interazione della biotina con la superficie delle SAMN ne modifica lo spettro ottico, il quale presenta una variazione della lunghezza d'onda di massimo assorbimento che si sposta da 430 nm a 556 nm in tetrametilammonio perclorato a pH 7 (figura 49).

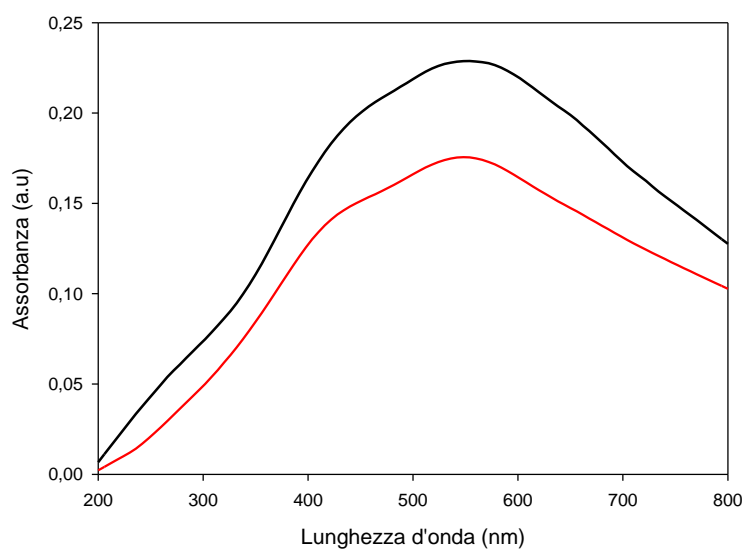


Figura 49: Spettro ottico in tetrametilammonio perclorato 50 mM pH 7 delle SAMN nude in nero e del complesso SAMN@biotina in rosso.

Immagini al TEM del complesso SAMN@biotina evidenziano la presenza di una matrice organica che avvolge la superficie delle SAMN come mostrato in figura 50. Lo spessore del rivestimento è di circa 2 nm, paragonabile con le dimensioni della biotina ($0.52 \times 1.0 \times 2.1 \text{ nm}^3$) (Hu P., 2007).

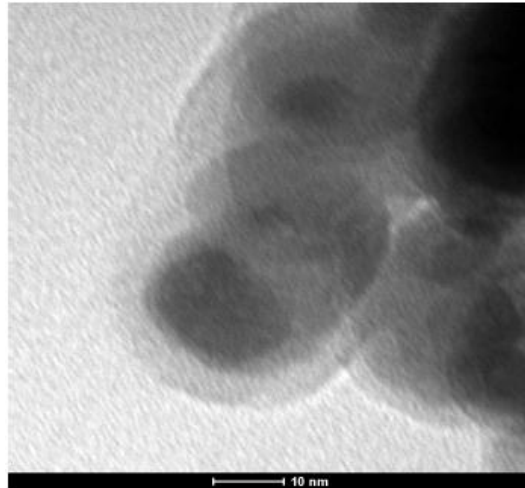


Figura 50: Immagine al TEM del complesso SAMN@biotina dove è evidente lo strato di rivestimento organico meno elettron denso.

Essendo però coinvolti gli atomi di azoto del doppio anello condensato nel legame con la superficie delle SAMN, la biotina perde la sua capacità di riconoscimento con l'avidina, a causa della modificazione a carico dell'anello condensato, sistema riconosciuto dall'avidina per l'interazione con la biotina, non consentendo quindi un suo possibile utilizzo come sistema di purificazione di proteine avidinate (Livnah O., 1993). Si è quindi proceduto con l'analisi del complesso SAMN@avidina.

L'analisi dello spettro FTIR del complesso SAMN@avidina paragonato a quello della proteina libera, evidenzia la presenza di bande a 1530 cm^{-1} , nell'intervallo $1630 - 1690 \text{ cm}^{-1}$ attribuibili al legame della proteina con la superficie delle SAMN (figura 51). In particolare, la banda a 1640 cm^{-1} corrisponde ai legami peptidici coinvolti nella formazione dei foglietti β dell'avidina, che rappresenta il 70% della struttura secondaria proteica (Swamy M.J., 1996).

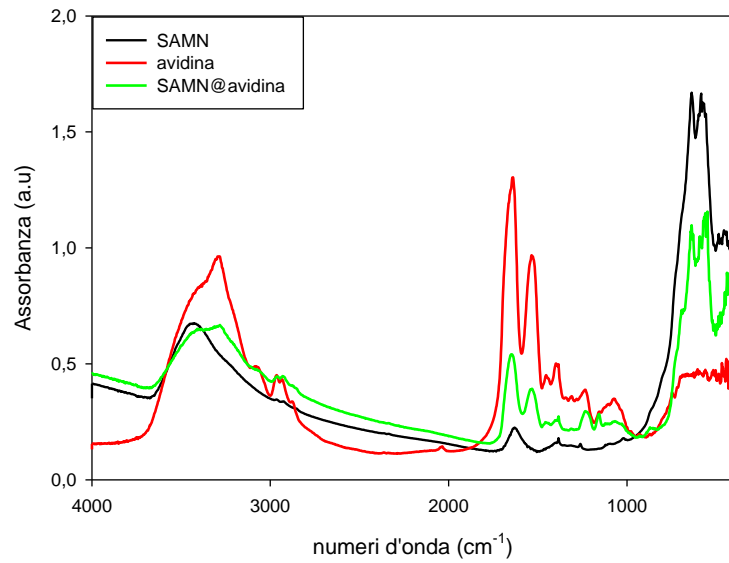


Figura 51: Spettro FTIR delle nanoparticelle di maghemite, dell'avidina e del complesso SAMN@avidina.

Inoltre dopo il legame della proteina con la superficie delle SAMN le proprietà ottiche delle SAMN vengono modificate sia rispetto lo spettro ottico delle singole nanoparticelle (vedi figura 41) sia rispetto al complesso SAMN@biotina. In particolare, la banda massima di assorbimento in TMA perclorato 50 mM pH 7 passa da 430 nm a 450 nm e la spalla da 490 nm a 500 nm (figura 52).

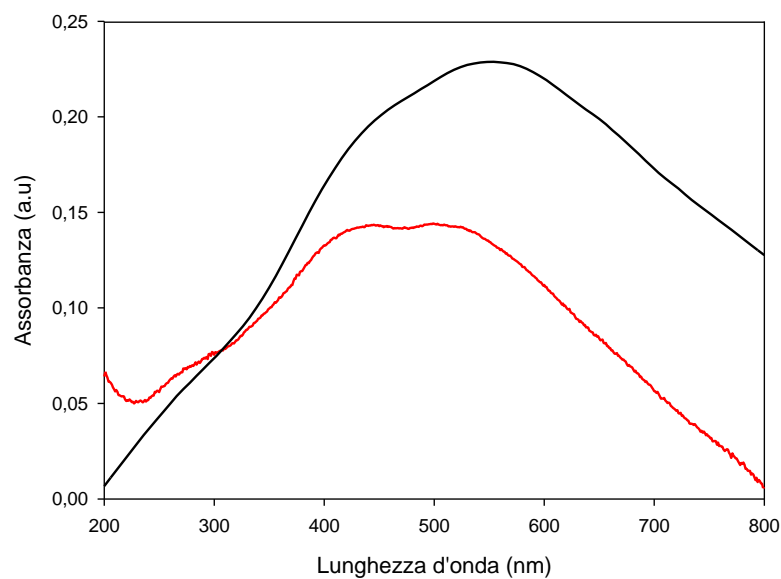


Figura 52: Spettro ottico in TMA perclorato 50 mM pH 7 delle SAMN nude in nero e del complesso SAMN@avidina in rosso.

Immagini al TEM del complesso SAMN@avidina mostrano la presenza di un rivestimento organico caratterizzato da uno spessore di 5 – 8 nm che circonda le nanoparticelle (figura 53). Il rivestimento è in accordo con la dimensioni della proteina riportata in letteratura, $5.6 \times 5 \times 4 \text{ nm}^3$ (Livnah O., 1993).

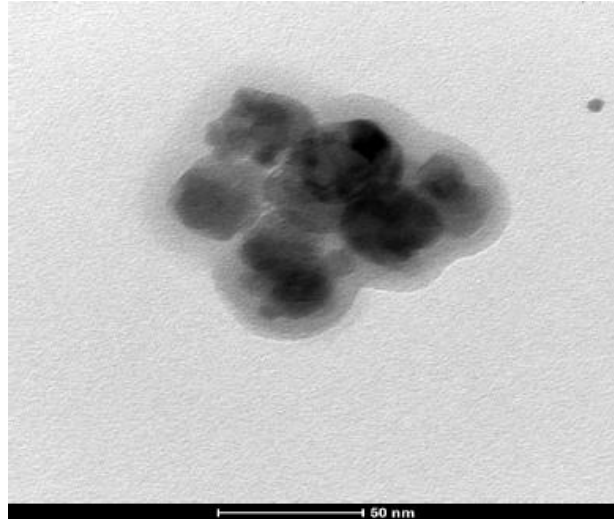


Figura 53: Immagine al TEM del complesso SAMN@avidina.

Il legame dell'avidina sulla superficie delle SAMN è stato determinato in funzione della concentrazione nell'intervallo 100 – 3000 mg/L in TMA perclorato 50 mM a pH 7. L'avidina legata è stata determinata misurando la scomparsa dell'assorbanza della proteina a 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} = 6.99 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), in seguito all'applicazione di un campo magnetico esterno. I dati ottenuti hanno permesso di determinare il numero di molecole di avidina per particella che è risultato essere 10 ± 3 ($n = 5$) (figura 54) mentre quello teorico, calcolato considerando l'avidina come una sfera di 5.5 nm di diametro, è risultato pari a 16 molecole per particella.

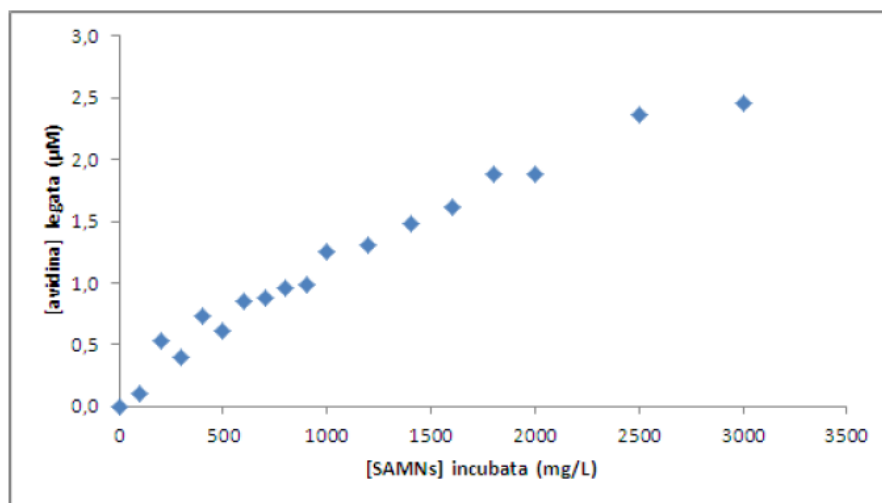


Figura 54: Andamento della concentrazione di avidina legata in funzione della concentrazione di SAMN incubate, in TMA 50 mM a pH 7.

Inoltre i dati sul legame dell'avidina con la superficie delle SAMN è stato analizzato usando come modello l'isoterma di Langmuir (Langmuir I., 1918). La frazione superficiale rivestita di proteina è stata calcolata usando la seguente equazione:

$$q = \frac{q_m C_e}{K + C_e} \quad (4.1)$$

dove q è la massa specifica di proteina legata sulla superficie delle nanoparticelle, q_m è la capacità massima di adsorbimento, C_e è la concentrazione di proteina libera in soluzione all'equilibrio e K rappresenta la costante di Langmuir. Nel caso del complesso SAMN@avidina q_m è risultato essere di $100 \mu\text{g mg}^{-1}$ mentre K di $45.18 \mu\text{L } \mu\text{g}^{-1}$.

Il numero di siti disponibili per il legame con la biotina sono stati inoltre determinati spettrofluorimetricamente, usando come sonda la fluoresceina biotinilata e seguendo la calibrazione della fluorescenza emessa dalla sonda nelle stesse condizioni sperimentali. Dai dati sperimentali ogni molecola di avidina immobilizzata sulla superficie delle SAMN è in grado di legare 3.0 ± 0.9 molecole di biotina (figura 55), confermando la buona capacità di legame del complesso

SAMN@avidina e indicando che l'orientamento delle molecole di avidina non comporta ingombro sterico al legame con la biotina.

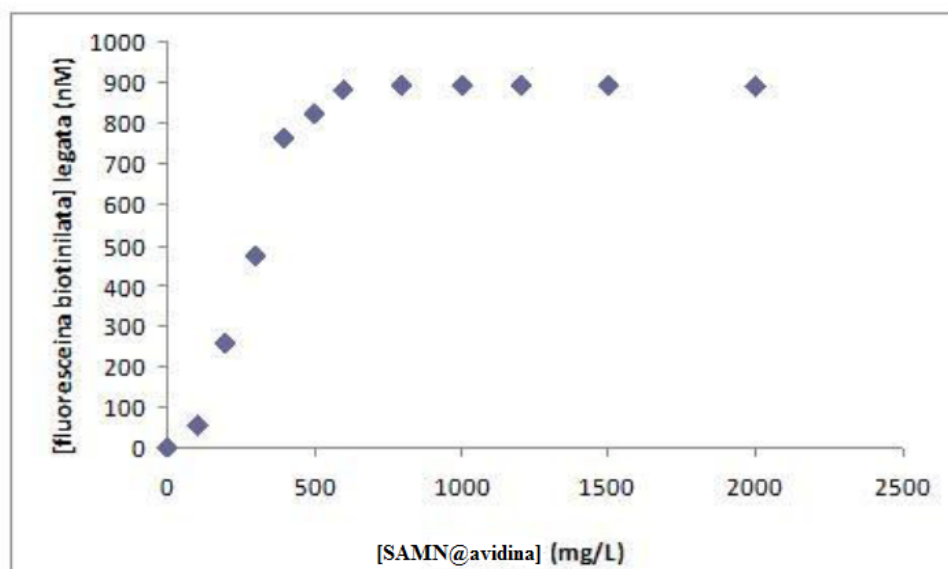


Figura 55: Andamento della concentrazione di sonda biotinilata legata (nM), in funzione della concentrazione del complesso SAMN@avidina incubate (mg/L).

Il modello ben si presta a un eventuale sistema di purificazione di biomolecole biotinilate da una miscela proteica.

3.1.8 Legame della sonda fluorescente rodamina B isotiocianato alla superficie delle nanoparticelle

Le nanoparticelle sintetizzate nel nostro laboratorio, come già discusso all'inizio di questo capitolo, presentano caratteristiche di superficie uniche. Esperimenti preliminari hanno evidenziato che le nanoparticelle sono in grado di interagire solo con determinate molecole organiche ed enzimatiche. Ad esempio, la superficie delle SAMN è in grado di interagire direttamente con proteine come l'avidina, l'albumina di siero bovino, la perossidasi di rafano ma non con altre proteine come l'ammino ossidasi di siero bovino e la glucosio ossidasi, suggerendo che le caratteristiche superficiali giocano un ruolo essenziale sulla capacità di riconoscimento. Al fine quindi di migliorare la nostra conoscenza sulle proprietà superficiali delle SAMN, diverse sonde fluorescenti, caratterizzate da struttura

simile ma con diversi gruppi funzionali, sono state testate con le nanoparticelle stesse (figura 56).

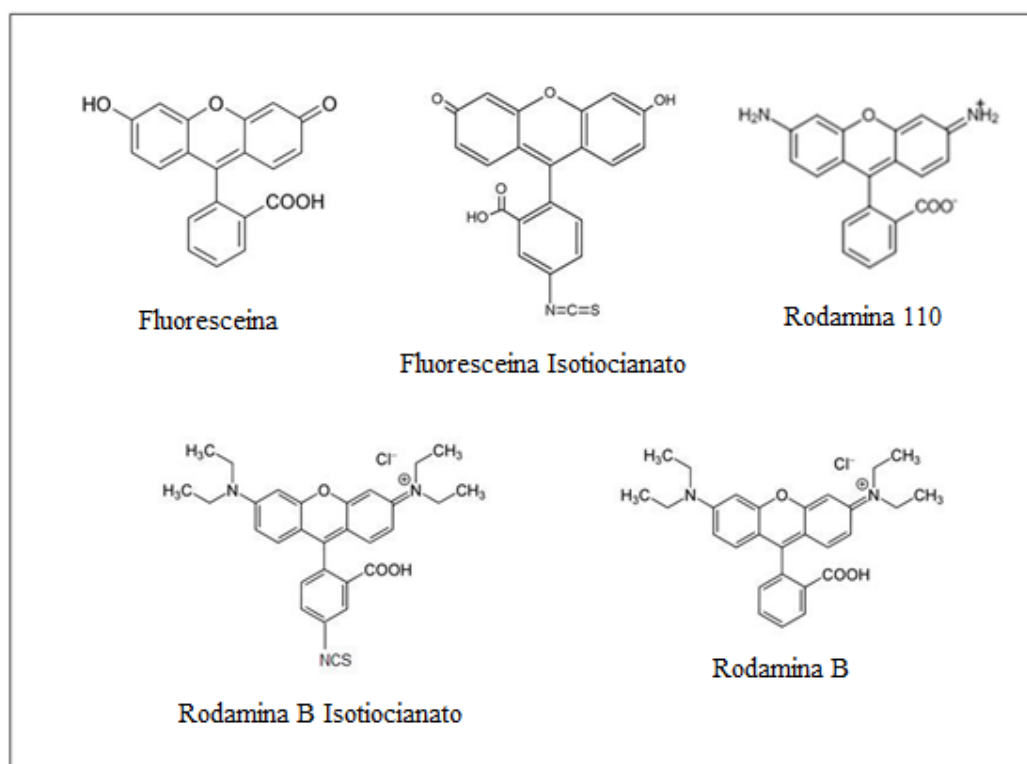


Figura 56: Struttura delle sonde fluorescenti utilizzate per testare le proprietà superficiali delle SAMN.

SAMN alla concentrazione di 100 mg/L risospese in TMA perclorato 50 mM a pH 7 sono state incubate con le varie sonde fluorescenti a una concentrazione finale di 10 μ M e lasciate in agitazione per un ora a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, le nanoparticelle sono state separate mediante applicazione di un campo magnetico e il surnatante è stato controllato alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento, come riportato in tabella 4.

Sonda fluorescente	Coefficiente di estinzione molare ($M^{-1}cm^{-1}$)	Lunghezza d'onda di eccitazione (nm)	Lunghezza d'onda di emissione (nm)	Resa quantica ^a
Fluoresceina	65000	494	520	0.79
Fluoresceina Isotiocianato	65000	494	520	0.79
Rodamina B	106000	554	580	0.54
Rodamina B Isotiocianato	106000	554	580	0.54
Rodamina 110	90000	498	520	0.9

^a La resa quantica è stata determinata in etanolo (Valeur B., 2002).

Tabella 4: Caratteristiche ottiche delle sonde fluorescenti testate con la superficie delle SAMN.

Una diminuzione significativa dell'assorbanza del surnatante è stata rilevata solo nel campione incubato in presenza di RITC come riportato in figura 57. Nessuna riduzione dell'assorbanza dei surnatanti è stata invece registrata con le altre sonde utilizzate, indicando che solo la RITC è in grado di interagire con la superficie delle SAMN.

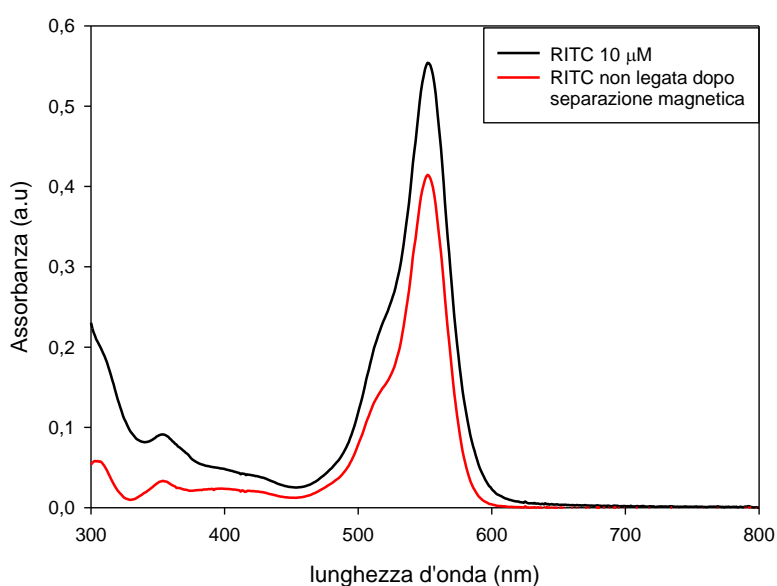


Figura 57: Spettro ottico della RITC in TMA 50 mM pH 7 incubata in presenza delle SAMN (100 mg/L).

Al fine di quantificare la sonda immobilizzata sulla superficie delle SAMN, il complesso SAMN@RITC lavato è stato poi trattato con etanolo al 96% per 30 minuti a temperatura ambiente al fine di staccare la sonda dalla superficie e il surnatante è stato letto alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento. La quantità di sonda immobilizzata sulle SAMN è risultata pari a $29.1 \pm 3.8 \mu\text{mol RITC per g di SAMN}$.

Osservando la struttura delle sonde analizzate si deduce che la condizione necessaria al fine del legame con la superficie delle SAMN sia la presenza in simultanea del gruppo isotiocianato e del gruppo amminico. Il legame tra la sonda e la superficie delle SAMN è molto veloce ed avviene entro pochi minuti originando una sospensione stabile del complesso magnetico fluorescente (SAMN@RITC).

Ciò è stato confermato da misure di spettroscopia FTIR. Il complesso SAMN@RITC, lavato, congelato e liofilizzato, allo scopo di individuare i gruppi coinvolti nella formazione del legame con la superficie delle SAMN è stato analizzato tramite spettroscopia infrarossa. In figura 58 è riportato lo spettro FTIR del complesso SAMN@RITC, della sonda libera e delle nanoparticelle nude. Dalla comparazione dello spettro tra la sonda libera e quello immobilizzata si nota un significativo allargamento della banda FTIR a 1412 cm^{-1} , attribuibile al bending del gruppo CH_2 appartenente ai gruppi $-\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ dell'anello xantenico (Liu X., 2005), e la scomparsa della banda a $2030 - 2150 \text{ cm}^{-1}$ attribuibile al gruppo isotiocianato (Vieira Ferreira L.F., 1998), suggerendo quindi il coinvolgimento di questi gruppi funzionali nel legame con la superficie delle SAMN. Diverse altre bande di assorbimento si osservano a 1589, 1345, 1274, 1249 e 1180 cm^{-1} attribuibili rispettivamente allo stretching vibrazionale del legame C=C dell'anello benzenico, alla vibrazione del legame C-N dell'anello benzenico, alla vibrazione del legame C-O del gruppo COOH, alla vibrazione del legame C-N nel gruppo $-\text{N}-(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ e allo stretch asimmetrico vibrazionale del legame C-O-C (Liu X., 2005) ma senza cambiamenti.

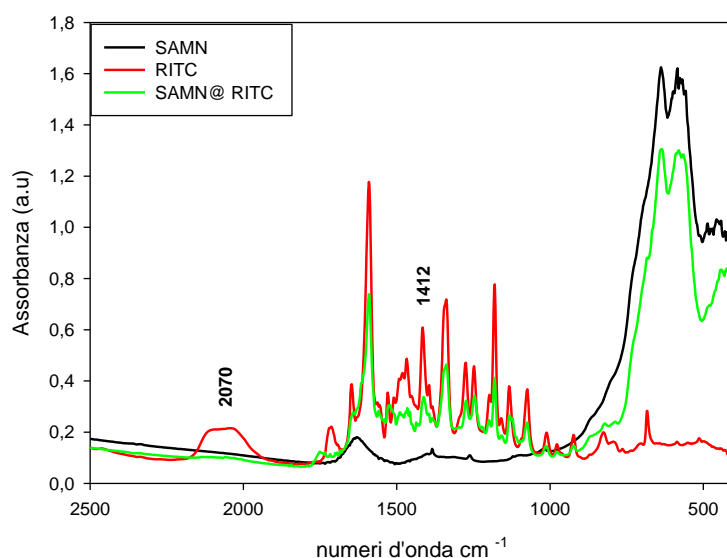


Figura 58: Spettro FTIR delle nanoparticelle di maghemite, della sonda RITC e del complesso SAMN@RITC con, evidenziate in grassetto, le due bande di assorbimento coinvolte nel legame con la superficie delle nanoparticelle.

Al fine di determinare la capacità massima di saturazione del sistema, una quantità nota di SAMN (100 mg/L) è stata incubata in presenza di concentrazioni crescenti di RITC, in un intervallo compreso tra 10 e 100 μM , in TMA perclorato 50 mM pH 7.0. Concentrazioni superiori non sono state analizzate perché la sonda risulta insolubile nel mezzo utilizzato.

Nell'intervallo di concentrazioni esplorate, la quantità di sonda legata sulla superficie delle nanoparticelle dipende dalla concentrazione della sonda in soluzione. I dati ottenuti sono stati analizzati secondo l'isoterma di Langmuir, applicando l'equazione 4.1, al fine di determinare la capacità massima della sonda sulla superficie delle SAMN e la stabilità del complesso SAMN@RITC. Dal grafico dell'isoterma di Langmuir si è ricavato che la capacità massima di legame, q_{max} , è pari a 0.14 mg RITC per mg di SAMN e che la costante di Langmuir, K_L , è di 61.7 mg ml^{-1} (tabella 5) in accordo con i dati sperimentali sopra citati.

Capacità massima di legame (q_m) mg RITC/mg SAMN	Costante di Langmuir (K) mg RITC/ml SAMN
0.14	61.7

Tabella 5: Calcolo della costante di Langmuir per il complesso SAMN@RITC.

Analisi al microscopio a trasmissione elettronica del complesso SAMN@RITC evidenzia la formazione di uno strato di rivestimento meno elettron denso che riveste le SAMN. Il diametro medio del rivestimento è compreso tra 2 e 4 nm come riportato in figura 59.

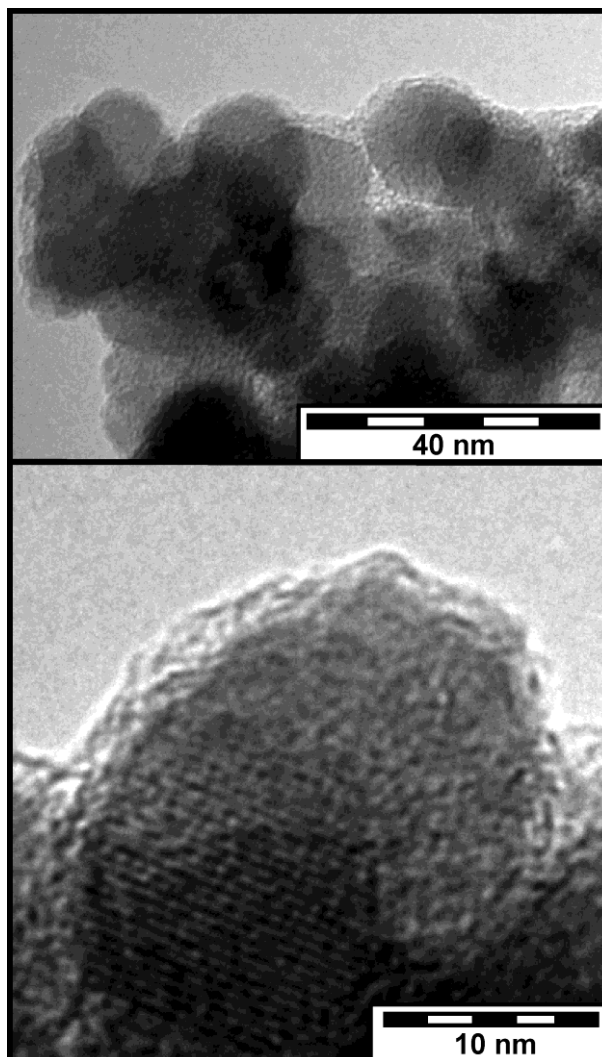


Figura 59: Immagine al TEM del complesso SAMN@RITC che evidenzia il rivestimento da parte della sonda.

E' noto da letteratura (Valeur B., 2002) che metalli di transizione come il ferro, esercitano un'azione di quenching su molecole fluorescenti ad essi adsorbite, determinando quindi una diminuzione dell'intensità della fluorescenza emessa. Si è provveduto quindi a controllare l'intensità di fluorescenza del complesso SAMN@RITC paragonato alla sonda libera. Il complesso SAMN@RITC è stato quindi risospeso in acqua distillata alla concentrazione di 100 mg/L ed eccitato a

554 nm, lunghezza d'onda di eccitazione della sonda libera, e se ne è raccolto lo spettro nell'intervallo 560 – 800 nm. La concentrazione di sonda libera utilizzata, nelle stesse condizioni, è stato di 1 μM . Analizzando i dati si è ricavato una resa quantica del complesso SAMN@RITC pari a $8.9 \pm 1.3 \%$ rispetto alla sonda libera (figura 60), sufficiente ad essere applicato in ambito biotecnologico come sonda fluorescente magnetica.

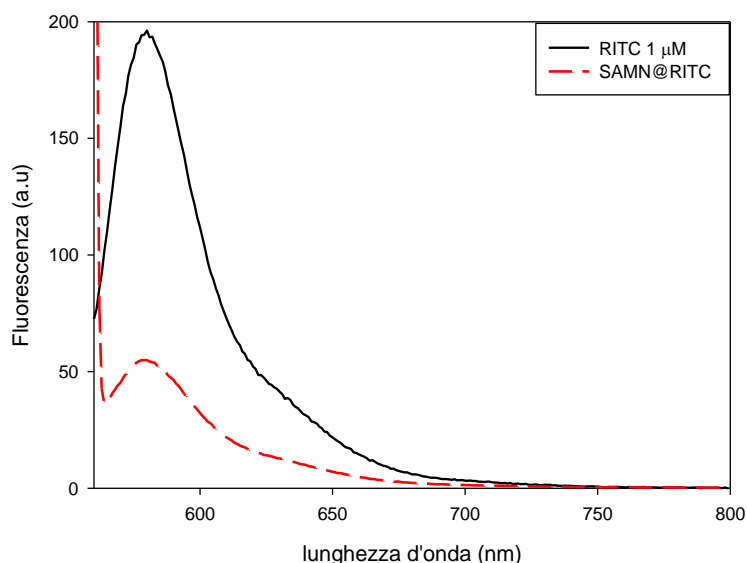


Figura 60: Paragone dello spettro in fluorescenza tra la RITC libera e quella immobilizzata sulla superficie delle SAMN. Le misure di fluorescenza sono state effettuate in acqua distillata alla lunghezza d'onda di eccitazione di 554 nm.

Con lo scopo di migliorare la comprensione sulle proprietà di legame della RITC alla superficie delle SAMN sono stati condotti esperimenti al variare del pH in un intervallo tra 2 e 10, in TMA perclorato 50 mM. Si è osservato che il pH gioca un ruolo chiave nel determinare la quantità di sonda in grado di adsorbirsi sulla superficie delle nanoparticelle. I risultati riportati in figura 61 denotano un andamento di tipo sigmoideale suggerendo l'esistenza di diverse modalità di legame. In particolare, la quantità di sonda in grado di interagire con la superficie aumenta a pH acido diminuendo invece a pH basico. Calcolando il numero di molecole di sonda immobilizzata per nanoparticella in funzione del pH, si passa da 500 molecole a pH 4, a 150 circa a pH 10.

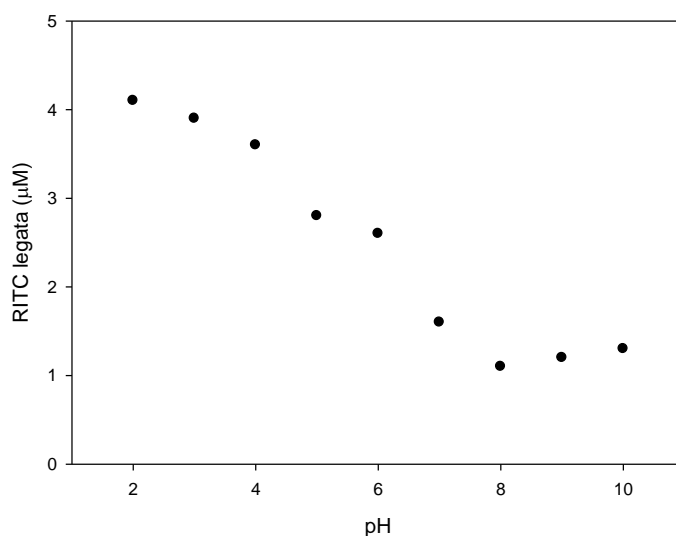


Figura 61: Quantità di RITC immobilizzata sulla superficie delle nanoparticelle in funzione del pH.

Da ciò si evidenzia che non è coinvolta solo un'interazione di tipo elettrostatico tra la sonda e le SAMN, perché, se così fosse, non si sarebbe dovuto osservare un aumento della quantità di sonda immobilizzata a pH acido, a ragione del fatto che a tale pH sia la sonda sia le nanoparticelle sono entrambe protonate, bensì una diminuzione della sonda legata causa repulsione tra le due specie.

Per comprendere meglio come il gruppo isotiocianato influenzi la capacità di legame della sonda alle SAMN, si è provveduto a modificarlo con tre diverse ammine primarie come descritto nel paragrafo 2.10.10 dei materiali e metodi quali, la glicina, l'etanolamina e l'entilendiammina, caratterizzate da tre diversi gruppi funzionali terminali, come si può vedere in tabella 6. Le capacità di legame dei tre derivati sono state poi analizzate a due valori di pH. I dati ottenuti evidenziano che le migliori condizioni di legame si sono ottenute con il derivato della RITC modificato con l'etanolamina sia a pH neutro sia a pH 10. Tutti e tre i derivati, grazie alle proprietà chelanti del gruppo $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$, incrementano la funzione di ancoraggio sulla superficie delle nanoparticelle rispetto alla sonda nativa, grazie a una migliore coordinazione degli ioni Fe superficiali, come riportato in letteratura (Chen L.X., 2002).

	Quantità di sonda immobilizzata sulle SAMN (μM)	
	Condizioni sperimentali	
Derivati RITC	pH 7.0	pH 10.0
nessuno	2.5	1
-NH-CH₂-CH₂-NH₂	2	5
-NH-CH₂-CH₂-COOH	11	7
-NH-CH₂-CH₂-OH	17	12

Tabella 6: *Quantità di sonda derivata immobilizzata sulla superficie delle SAMN in TMA perclorato 50 mM. Concentrazione SAMN 100 mg/L.*

Al fine di escludere eventuali interazioni di tipo idrofobico tra la sonda e la superficie delle SAMN si è trattato il complesso SAMN@RITC con surfattanti, come il sodio dodecil solfato (SDS) allo 0.1%, al fine di valutare l'eventuale distacco della sonda dalla superficie. Nessun distacco della sonda dalla superficie si è evidenziato, escludendo quindi tale tipo di interazione (figura 62).

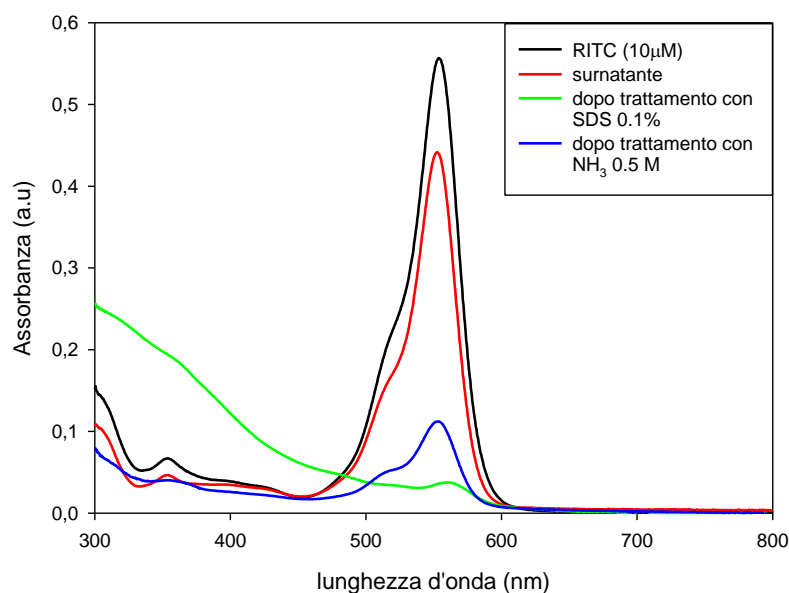


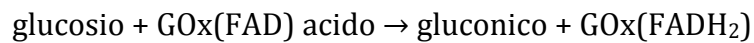
Figura 62: Spettro ottico della sonda RITC che evidenzia l'incapacità dell'SDS di staccare la sonda dalla superficie. Concentrazione SAMN 100 mg/L.

3.1.9 Utilizzo del complesso SAMN@RITC come sistema di immobilizzazione di enzimi

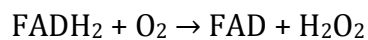
Come accennato nel paragrafo 3.1.8, le SAMN sono in grado di interagire con alcune molecole organiche. Si è voluto quindi sfruttare il complesso SAMN@RITC per immobilizzare enzimi, come la glucosio ossidasi (GOx) e l'ammino ossidasi di siero bovino (BSAO), sulla superficie delle nanoparticelle, enzimi che non sono in grado di legarsi direttamente sulla superficie delle SAMN, come esperimenti precedenti hanno dimostrato. In questo modo si possono combinare i vantaggi derivanti dall'immobilizzazione di proteine direttamente su nanoparticelle alle loro proprietà magnetiche, che ne facilitano l'uso, al fine di sviluppare un nanocatalizzatore fluorescente, vantaggioso dal punto di vista economico e di semplice e rapido utilizzo e preparazione.

La glucosio ossidasi è uno degli enzimi maggiormente usati nella costruzione di biosensori e catalizza la reazione di ossidazione del glucosio a gluconolattone, che viene idrolizzato spontaneamente ad acido gluconico, con produzione di perossido di idrogeno, usando l'ossigeno molecolare come accettore di elettroni. L'enzima

possiede come cofattore, il FAD o flavina-adeninadinucleotide, che svolge il ruolo di accettore di elettroni, riducendosi a FADH₂ secondo la seguente reazione:



Il cofattore si ossida nuovamente, reagendo con l'ossigeno, portando alla formazione di perossido di idrogeno:



Lo sviluppo di biosensori per il glucosio basati su nanoparticelle è considerato molto importante per le applicazioni in diagnostica clinica nella determinazione del glucosio a livello ematico (Wang J., 2008). L'obiettivo, difatti, è di immobilizzare l'enzima sulla superficie delle SAMN, tramite la sonda RITC, al fine di mettere a punto un nanocatalizzatore caratterizzato da una maggior sensibilità al glucosio rispetto a quelli attualmente presenti in commercio.

La BSAO è coinvolta nel metabolismo delle poliamine la cui ossidazione porta alla formazione di aldeide, ammoniaca e perossido di idrogeno (Mondovì B., 1989; Bachrach U., 1989) e in alcuni processi fisio-patologici (Casero R.A., 2010). In particolare, studi recenti hanno evidenziato che i prodotti di ossidazione di poliamine sono in grado di indurre stress ossidativo con attivazione delle vie che portano a morte cellulare per via apoptotica o non apoptotica in diverse linee tumorali (Lindsay G.S., 1999; Calcabrini A., 2002). Si può quindi utilizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno come potenziale cura contro il cancro, in analogia agli altri processi di formazione di radicali liberi (Agostinelli E., 2006d).

Preparazione e caratterizzazione del complesso SAMN@RITC-GOx

L'enzima glucosio ossidasi, classificato come EC 1.1.3.4, appartiene alla famiglia delle ossidoreduttasi, gruppo di enzimi che presentano una molecola di flavin adenin dinucleotide (FAD) nel loro sito attivo e per questo definiti flavoproteine.

Il ruolo biologico di questo enzima è centrato sulla produzione di acqua ossigenata, composto tossico che danneggia le strutture cellulari. In natura difatti questo

enzima è presente in molte specie di funghi, dove svolge un ruolo di protezione di questi organismi da infezioni batteriche.

L'enzima è una glicoproteina dimerica (figura 12), costituita da due subunità identiche tenute legate da ponti disolfuro. Ciascuna subunità contiene una molecola di FAD, legata in modo non covalente: questa molecola è un componente comune nelle reazioni biologiche di ossido-riduzione e nell'enzima agisce come accettore di elettroni riducendosi a FADH₂. Le subunità si strutturano in due domini, uno di essi lega il FAD, l'altro il substrato (Kalisz H.M., 1991). L'enzima ha un peso molecolare di 160 kDa, una dimensione pari a 7 x 5.5 x 8 nm³, presenta un'elevata specificità per il glucosio ed è molto stabile in un ampio intervallo di temperatura e pH (Bankar S.B., 2009).

L'enzima è largamente impiegato nell'industria alimentare, farmaceutica e chimica, con un'ampia varietà di applicazioni, dai biosensori per il glucosio alle celle a combustibile, dalla conservazione dei cibi e delle bevande alla produzione del vino, dai prodotti per l'igiene orale alla produzione di acido gluconico (Wong C.M., 2008).

Il complesso SAMN@RITC quindi, alla concentrazione di 200 mg/L e presentante un rivestimento in sonda pari a 29.1 ± 3.8 μ mol RITC per g di SAMN, è stato incubato in presenza di glucosio ossidasi alla concentrazione di 10 μ M in acqua distillata in agitazione a 4°C. Sono eseguiti una serie di lavaggi per rimuovere l'enzima in eccesso sino ad assenza di attività enzimatica nel surnatante. La presenza di attività è stata poi verificata sulla sospensione contenente il complesso SAMN@RITC-GOx secondo il metodo riportato nel paragrafo 2.10.12 e si è visto essere legata strettamente alle nanoparticelle indicando che l'enzima è stato immobilizzato (tabella 7).

Tramite il dosaggio del cofattore FAD (paragrafo 2.10.12) si è potuto quantificare la concentrazione di enzima immobilizzato pari a 10.6 ± 2.0 nmol (n = 3) di GOx su 14.6 mg del complesso SAMN@RITC-GOx corrispondente a 10 ± 2 molecole per nanoparticella. Questo suggerisce la formazione di un monostrato di enzima legato alla superficie delle nanoparticelle.

L'attività catalitica dell'enzima immobilizzato è risultata ridotta del 25% rispetto a quello nativo. Come già riportato precedentemente nel paragrafo 1.3 e già accennato per l'enzima perossidasi, questo è attribuibile a cambi conformazionali

nella struttura enzimatica in seguito all'immobilizzazione o alla parziale denaturazione dell'enzima nelle condizioni usate per immobilizzarlo sulla superficie delle nanoparticelle e ad effetti sterici che diminuiscono l'accessibilità del sito attivo al substrato.

Forma enzimatica	Parametri cinetici		
	K_M (mM)	k_c (s ⁻¹)	k_c/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)
GOx libera	1.5	142.8	95.2
SAMN@RITC-GOx	30	32.7	1.1

Tabella 7: Parametri cinetici dell'enzima glucosio ossidasi libero ed immobilizzato sulla superficie di nanoparticelle di maghemite.

Per verificare la stabilità del complesso SAMN@RITC-GOx e il suo possibile riutilizzo nel tempo, si è provveduto a controllare l'attività catalitica del complesso nel tempo. Il complesso è stato quindi rimosso dalla soluzione tramite applicazione di campo magnetico esterno e il surnatante ottenuto controllato per via fluorimetrica al fine di verificare l'assenza di fluorescenza da parte della sonda, indice che tutto il complesso era stato rimosso dalla soluzione. Il complesso così separato è stato nuovamente risospeso in tampone contenente HEPES e la sua attività catalitica controllata a concentrazioni crescenti di glucosio. Dopo vari cicli, l'enzima immobilizzato mantiene la sua attività dimostrando il possibile riutilizzo del complesso SAMN@RITC-GOx (figura 63).

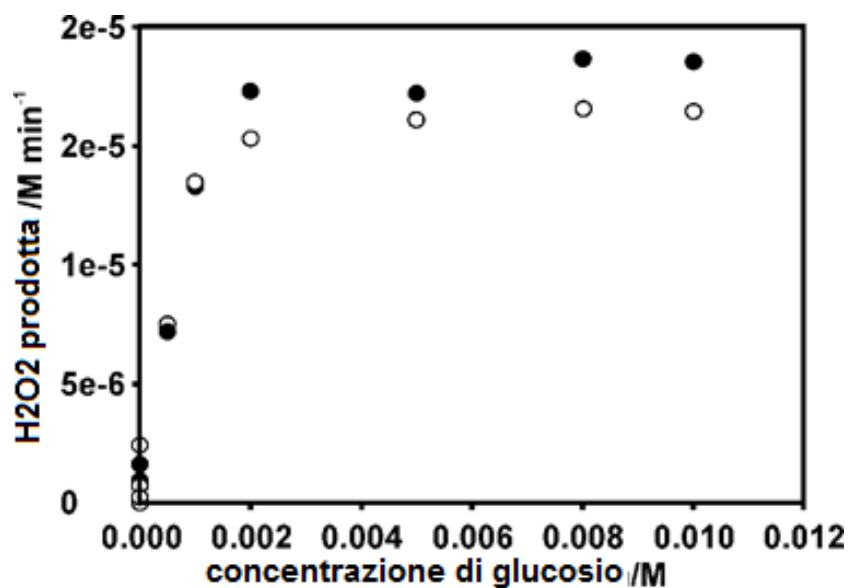


Figura 63: Verifica dell'attività catalitica del complesso SAMN@RITC-GOx nel tempo. I puntini neri corrispondono al complesso fresco, ossia usato per la prima volta, mentre quelli vuoti al complesso dopo separazione magnetica e successivo riutilizzo.

Osservazioni al TEM del complesso SAMN@RITC-GOx hanno evidenziato una variazione dello strato che le riveste, rispetto al complesso SAMN@RITC. Ciò si riflette in un aumento dello spessore di rivestimento (5 - 8 nm) ed anche in un minor contrasto delle particelle stesse, come conseguenza dell'inglobamento nella matrice organica (figura 64). Lo strato di rivestimento è in accordo con le dimensioni della glucosio ossidasi (7 x 5.5 x 8 nm³) come riportato in letteratura (Hecht H.R., 1993).

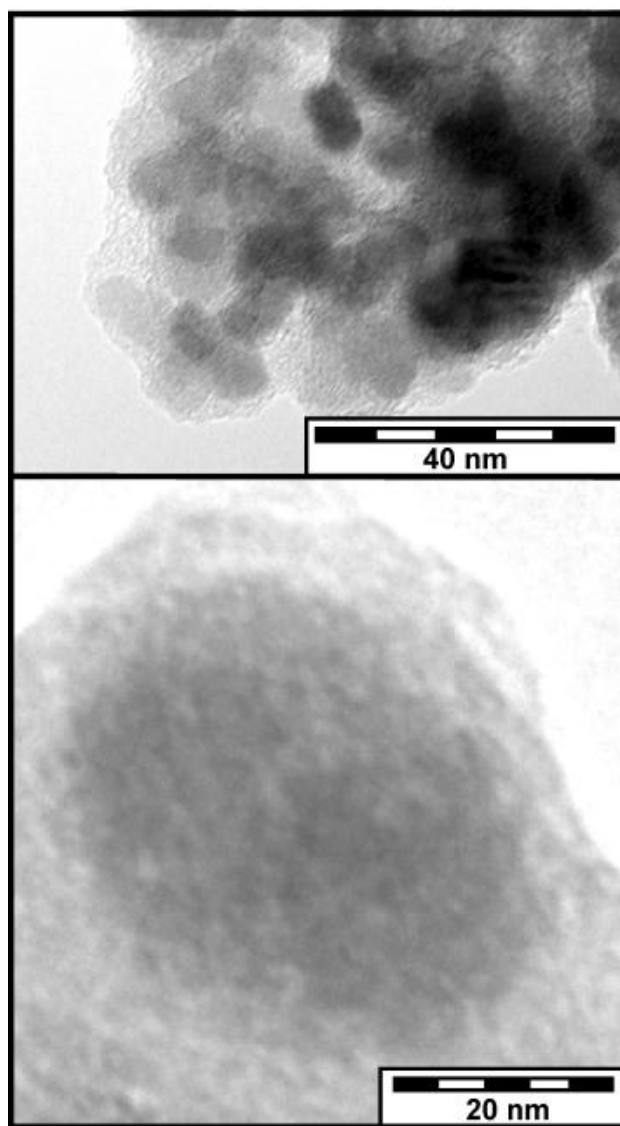


Figura 64: Immagine al TEM del complesso SAMN@RITC-GOx dove si può notare la presenza dello strato organico di rivestimento meno elettrondenso rispetto alle nanoparticelle.

A ulteriore conferma dell'avvenuta immobilizzazione dell'enzima sul complesso SAMN@RITC è la comparsa di bande caratteristiche delle ammidi ai numeri d'onda di circa 1654 cm^{-1} (banda ammide I) e di 1544 cm^{-1} (banda ammide II) come da letteratura (Barbara H. Stuart., 2004) all'analisi FTIR, il cui spettro è riportato in figura 65.

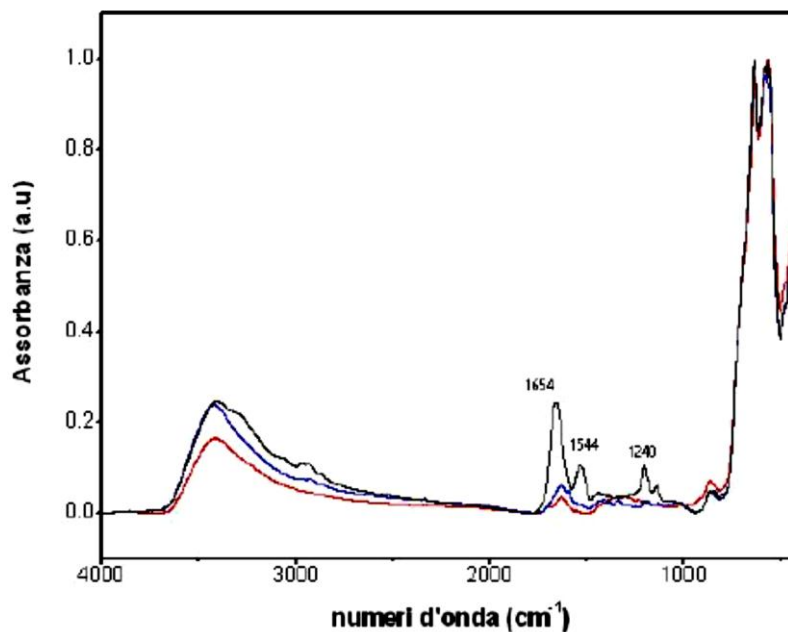


Figura 65: Spettri FTIR delle nanoparticelle di maghemite (linea rossa), del complesso SAMN@RITC (linea blu) e del complesso SAMN@RITC-GOx (linea nera).

Anche le proprietà magnetiche del complesso SAMN@RITC-GOx a 300K sono diverse, se paragonate alle nanoparticelle di maghemite (figura 66). In particolare, si osserva una diminuzione della magnetizzazione massima da 71.4 Am²/kg a circa 60.2 Am²/kg per il complesso SAMN@RITC-GOx. Da questi dati è stato possibile calcolare la quantità di fase organica, composta dalla sonda e dall'enzima, legata alla superficie delle SAMN. Tale quantità è risultata pari al 15 %_{p/p} in accordo con quanto determinato tramite via spettrofluorimetrica nella quantificazione del FAD dove la quantità media di enzima è risultata pari all' 11.7 %_{p/p}. A questa quantità bisogna sommare il peso dato dalla sonda pari al 2.5 %_{p/p}.

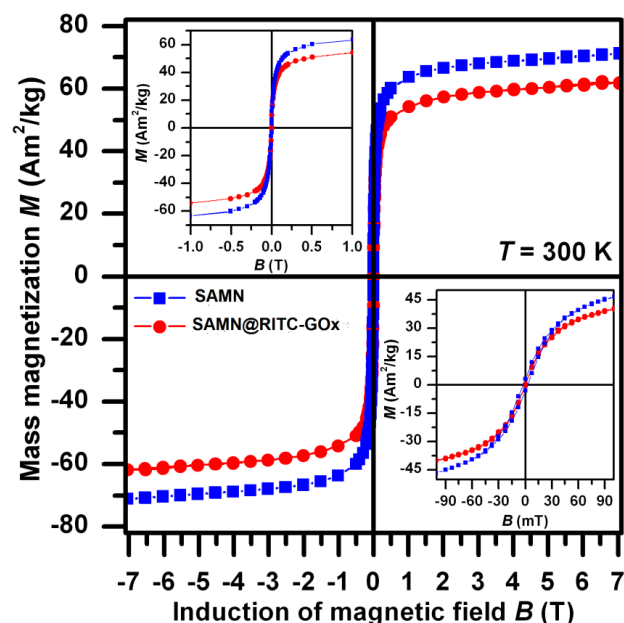


Figura 66: Confronto tra i cicli d'isteresi delle SAMN e del complesso SAMN@RITC-GOx.

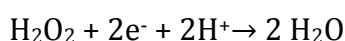
Utilizzo del complesso SAMN@RITC-GOx come sistema di sviluppo di un biosensore per la determinazione del perossido di idrogeno

La determinazione analitica del perossido di idrogeno riveste un'importanza in diverse aree, da quella clinica a quella industriale. L'acqua ossigenata è ampiamente utilizzata come agente ossidante nell'industria alimentare e chimica, ed è coinvolta nei settori ambientale, clinico, farmaceutico e alimentare (Sanderson W.R., 2000). I metodi analitici elettro-chimici sono i più convenienti per la determinazione dell'acqua ossigenata, per la loro semplicità, per il basso costo e per l'opportunità di determinazione in tempo reale.

Numerosi nanomateriali, costituiti da ossidi metallici o metalli nobili, sono impiegati per sviluppare sensori atti alla determinazione del perossido di idrogeno, ed alcuni di essi presentano un'elevata attività elettrocatalitica a basso potenziale applicato (Ricci F., 2005; Iost R.M., 2011; Ramgir N.S., 2010). In particolare, dato il loro basso costo e per la facilità di preparazione, molti studi recenti si sono focalizzati sui nanomateriali in ossidi metallici. Tuttavia, in letteratura sono riportati pochi casi di utilizzo di nanoparticelle in ossido di ferro come sensori non enzimatici (Li Z., 2010; Hrbac J., 2007). Ciò è dovuto principalmente alla reattività delle nanoparticelle in ossido di ferro, la quale aumenta al diminuire della dimensione delle nanoparticelle. Inoltre, sono soggette

a rapida degradazione, quando esposte ad ambienti chimici aggressivi (Salgueirino-Maceira V., 2006).

Le SAMN, oltre a presentare proprietà superficiali uniche, come già accennato precedentemente, presentano anche proprietà elettrocatalitiche, che dipendono dalla loro struttura cristallina (Hermanek M., 2007). Proprietà messe in evidenza utilizzando un elettrodo in pasta di grafite, composto da un 55%_{p/p} di grafite, un 30%_{p/p} di silicone e da un 15%_{p/p} di SAMN, applicando potenziale di -0.1 V, al quale l'acqua ossigenata si riduce, secondo la reazione:



A tale potenziale applicato si esclude la riduzione di altre specie, elettrochimicamente attive ed eventualmente interferenti, oltre all'acqua ossigenata. Al potenziale applicato la sensibilità dell'elettrodo nei confronti dell'acqua ossigenata è di 206.51 nA $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, con un limite di rivelazione di 0.8 μM , nell'intervallo di concentrazione 0 – 1.5 mM. Le misure sono state effettuate in tampone acetato 50 mM, pH 5.1, contenente KCl 50 mM come elettrolita di supporto.

Come riportato in precedenza, la glucosio ossidasi produce perossido di idrogeno ossidando il glucosio. Sfruttando le proprietà elettrocatalitiche delle SAMN, si è utilizzato il complesso SAMN@RITC-GOx per sviluppare un biosensore per la determinazione della concentrazione di glucosio. Un biosensore è un dispositivo analitico che accoppia un sistema di riconoscimento molecolare con un trasduttore che converte l'evento in un segnale elettricamente misurabile.

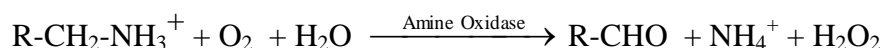
Usando le stesse condizioni sperimentali, l'elettrodo in pasta di grafite, modificato con il 15%_{p/p} del complesso SAMN@RITC-GOx, presenta una risposta lineare nei confronti del glucosio nell'intervallo analizzato 0 – 1.5 mM, caratterizzato da una sensibilità di 45.85 nA $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ e un limite di rivelazione di 0.9 μM . Il sistema è stabile per due mesi, se l'elettrodo è conservato a 4°C in tampone acetato. Tale biosensore è stato poi testato su campioni reali, per determinare la concentrazione di glucosio, ad esempio, nei succhi di frutta confrontando il risultato ottenuto, con quello spettrofotometrico. La concentrazione di glucosio determinata tramite il biosensore è stata di $0.644 \pm 0.018\text{ M}$ (n = 3) nel succo di albicocca e 0.669 ± 0.021

M (n = 3) in quello di pesca, in pieno accordo con quanto determinato per via spettrofotometrica, di 0.646 ± 0.025 M (n = 3) e 0.657 ± 0.017 M (n = 3) per il succo di albicocca e quello di pesca, rispettivamente. Tali risultati dimostrano come le SAMN rappresentano un efficiente sistema elettrocatalitico per la determinazione del perossido di idrogeno, che può essere facilmente accoppiato a sistemi enzimatici produttori acqua ossigenata per svilupparne biosensori.

Preparazione e caratterizzazione del complesso SAMN@RITC-BSAO

L'ammino ossidasi di siero bovino è un enzima contenente rame e rappresenta una classe eterogenea di enzimi classificati come EC 1.4.3.6, ampiamente distribuiti in mammiferi, piante e microrganismi (procarioti ed eucarioti) (Knowles P.F., 1994). Sono enzimi costituiti da omodimeri glicosilati le cui subunità hanno una dimensione compresa tra 70 e 95 kDa a seconda della specie da cui sono isolati. La differenza principale consiste nella presenza o nell'assenza del dominio N-terminale (D1), il quale si trova nell'ammino ossidasi a rame in *Escherichia coli* ma non in quelle di *Arthrobacter globiformis*, *Hansenula polymorpha*, semi di pisello e in BSAO (Brazeau B.J., 2004). Il dominio mancante, immaginando la sua struttura come quella di un fungo, è quello che va a comporre lo stelo, mentre i domini 2 e 3 (D2, D3) sono componenti della porzione periferica dell'enzima e con il dominio D4 sono presenti in tutte le ammino ossidasi a rame. Nel dominio 4 avviene il congiungimento tra i due monomeri ed è quello che avvolge la cavità centrale (figura 13). Ogni monomero contiene uno ione rame e un chinone come cofattore che è stato identificato nel composto 2,4,5 triidrossifenilalanina (TPQ) (Cai D.Y., 1994).

L'ossidazione delle ammine primarie alifatiche ed aromatiche da parte dell'ammino ossidasi porta alla formazione di aldeide, ammoniacca e perossido d'idrogeno secondo la seguente reazione:



La reazione avviene in più passaggi, che vede come primo passaggio la formazione di un complesso molecolare tra l'enzima e la poliamina seguito dalla condensazione tra il gruppo ammino terminale della poliamina e il gruppo

carbonilico del cofattore generando una base di Schiff. La base va poi incontro a isomerizzazione e conseguente idrolisi con ossidazione del cofattore da parte dell'ossigeno molecolare (Stevanato R., 1995).

Rispetto la loro ampia distribuzione, il ruolo fisiologico dell'ammino ossidasi è tuttora non chiaro. Ad ogni modo la deaminazione ossidativa della spermina da parte della BSAO origina ammoniaca e metaboliti citotossici, perossido d'idrogeno e aldeide (Mondovì B.,1989; Bachrach U., 1989).

La struttura della BSAO è stata determinata tramite cristallografia a raggi x ed è risultata avere una dimensione pari a $10.5 \times 6 \times 4.5 \text{ nm}^3$ con un peso molecolare di 170 kDa (Lunelli M., 2005).

Il complesso SAMN@RITC alla concentrazione di 5 g/L e riportante la stessa concentrazione in sonda sopra descritta, è stato incubato a 4°C in presenza di BSAO alla concentrazione di 11 μM in KCl 0.1 M, a pH 7. A seguire, si sono eseguiti una serie di lavaggi al fine di rimuovere l'enzima in eccesso sino ad assenza di attività enzimatica nel surnatante.

La natura e le proprietà di scattering ottico delle nanoparticelle come già detto in precedenza, interferiscono con la quantificazione delle proteine immobilizzate sulla superficie delle SAMN@RITC con l'impiego dei classici metodi di determinazione proteica. Per ovviare quindi a questa limitazione, la quantità di enzima immobilizzato sulla superficie del complesso SAMN@RITC è stato determinato tramite spettrometria di massa. I campioni contenenti l'enzima nativo e quello immobilizzato sulla superficie delle nanoparticelle sono stati normalizzati sulla base della loro attività enzimatica e incubati per 14 ore a 37°C con tripsina. Dopo digestione, i campioni sono stati centrifugati a 14000 g per 10 minuti ed esposti a un campo magnetico esterno per 30 minuti allo scopo di rimuovere eventuali nanoparticelle. Infine, il surnatante è stato essiccato sotto vuoto, risospeso in 20 μl di acido formico allo 0.1% ed analizzato mediante LC-MS/MS con spettrometro di massa 6520 Q-TOF accoppiato online con HPLC serie 1200 mediante Chip Cube Interface (Agilent Technologies, CA, USA). Gli spetti MS/MS dei 4 ioni più intensi sono stati acquisiti per ogni scansione di massa nell'intervallo 350 – 3000 Da. I dati ottenuti sono stati convertiti in Mascot Generic Format (MGF) con il software di analisi MassHunter Qualitative (Agilent Technologies). I file MGF sono stati poi analizzati usando Mascot Search Engine server version 2.3 (Matrix

Science, London, UK). Gli spettri sono stati confrontati contro il database SwissProt (versione Maggio 2011, Tassonomia Mammalia, 65453 voci); solo i peptidi identificati con un grado di confidenza $\geq 99\%$ sono stati usati per quantificare la quantità di enzima immobilizzato sulle nanoparticelle.

I 10 peptidi più abbondanti caratterizzati da uno score > 35 ($p < 0.01$) e che rappresentano il 22% circa della sequenza, sono stati quantitativamente paragonati al fine di calcolare l'attività specifica della BSAO immobilizzata (tabella 8). Il segnale dei 10 peptidi immobilizzati sulle SAMN è risultato 2.85 volte maggiore di quello della proteina libera alla medesima attività.

Numero Peptide		Score	BSAO Legato	BSAO Nativo	Legato/Libero
1	YLYLASK	36	747655	132977	
2	ALDPADWTVQK	67	7693036	10761424	
3	GGPYLHPVGGLELLVDHK	55	11988500	17391553	
4	YMDSGFGMGYFATPLIR	101	9442405	4823422	
5	ALDPADWTVQKVFQGR	44	1239335	539496	
6	KQLETEEQAAPLGGASPR	87	13640798	9686214	
7	SQVPPGPTPLQFHPQGR	63	113110365	15533939	
8	IQTVSFAGGPMQNSPME	132	44140030	11272321	
9	LAYEISLQEAGAVYGGNTPAAMLTR	169	3758314	1981715	
10	HHSDFLSHYFGGVAQTVLVFR	41	4856416	1648758	
Somma			210616854	73771819	2.85

Tabella 8: I 10 peptidi più abbondanti ottenuti dopo digestione dell'enzima BSAO nativo ed immobilizzato sulle nanoparticelle.

La resa digestiva copre il 42% della sequenza amminoacidica tra i due campioni (vedi figura 67).

1 MFIFIFLSLW TLLVMGREGG GVGSEEGVGK QCHPSLPPRC PSRSPSDQPW
 51 THPDQSQLFA DLSREELTTV MSFLTQQLGP DLVDAAQARP SDNCVFSVEL
 101 QLPPK**AAALA** **HLD**RGSP**PPA** REALAIVFFG GQPQPNVTEL VVGPLPQPSY
 151 MR**DVT**VERHG **GPL**PYYRRPV **LL**REYLDIDQ **MIF**NRELPGA AGVLHHCCSY
 201 KQGGQKLLTM NSAPR**GVQ**SG DRSTWFGIYY NITK**GGPYLH** PVGLLELLVDH
 251 KALDPADWTV QKVFFQGRYY ENLAQLEEQF EAGQVNVVVI PDDGTGGFWS
 301 LKSQVPPGPT PPLQFHPQGP RFSVQGNRVA **SSL**WTF**SFGL** **GA**FSGPRVFD
 351 **VR**FQGERLAY EISLQEAGAV YGGNTPAAML TRYMDSGFGM GYFATPLIRG
 401 VDCPYLATYM DWHFVVESQT PKTLHDAFCV FEQNKGLPLR **RH**SD**F**LSHY
 451 FGGVAQTVLV FRSVSTMLNY DYVWDMVFYP NGAIEVK**LHA** **TG**YISS**AFL**E
 501 **GA**ARRYGNQV GEHTLGPVHT HSAHYKVDLD VGLENVWVA EDMAFVPTAI
 551 PWSPEHQIQR **LQ**VTR**KOLET** EEQAAFPLGG ASPRYLYLAS KQSNKWGHPR
 601 GYRIQTVSFA GGPMPQNSPM ERAFSWGRYQ **LAI**TQ**R**KETE PSSSSVFNQN
 651 DPWTPTVDFS DFINNETIAG KDLVAWVTAG FLHIPHAEDI PNTVTVGNV
 701 GFFLRPYNFF DQEPSMDSAD SIYFREGQDA GSCEINPLAC LPQAATCAPD
 751 LPVFSHGGYP EY

Figura 67: Confronto tra la sequenza amminoacidica dell'enzima BSAO nativo ed immobilizzato. Le lettere in grassetto indicano la sequenza totale di copertura (42%) ottenuta dopo digestione con tripsina ed analisi mediante spettrometria di massa MS/MS dell'enzima legato alle SAMN. Le lettere in grassetto sottolineate indicano la sequenza amminoacidica usata per la quantificazione dell'enzima immobilizzato.

La presenza di attività è stata poi verificata sulla sospensione contenente il complesso SAMN@RITC-BSAO secondo quanto riportato nel paragrafo 2.10.12 e si è visto essere legata strettamente alle nanoparticelle indicando che l'enzima è stato immobilizzato sulla superficie delle SAMN (tabella 9). L'attività catalitica dell'enzima immobilizzato è risultata ridotta del 30% rispetto a quello nativo, corrispondente a 0.81 IU per grammo di SAMN, mentre la costante di Michaelis-Menten, K_M , è raddoppiata. Corrispondentemente il legame con le nanoparticelle porta a una diminuzione di 6 volte dell'efficienza catalitica dell'enzima, K_c/K_M . Questo può essere spiegato con le stesse motivazioni riportate in precedenza sia per l'enzima perossidasi sia per la glucosio ossidasi.

E' stata inoltre verificata la stabilità del complesso SAMN@RITC-BSAO e il suo possibile riutilizzo nel tempo con la stessa procedura descritta nel caso del complesso SAMN@RITC-GOx. Dopo vari cicli, come ottenuto per la glucosio ossidasi, l'enzima BSAO immobilizzato mantiene la sua attività confermando il suo possibile riutilizzo.

Forma enzimatica	Parametri cinetici		
	K_M (μM)	k_c (min^{-1})	k_c/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)
BSAO libera	7.4	46.8	6.3
SAMN@RITC-BSAO	14.0	14.4	1.0

Tabella 9: Parametri cinetici dell'enzima ammino ossidasi di siero bovino libero ed immobilizzato sulla superficie di nanoparticelle di maghemite.

Analisi al TEM del complesso SAMN@RITC-BSAO evidenzia la presenza di un rivestimento organico che ricopre le nanoparticelle del diametro medio di 6 -8 nm come riportato in figura 68 paragonabile al diametro dell'enzima (Lunelli M., 2005).

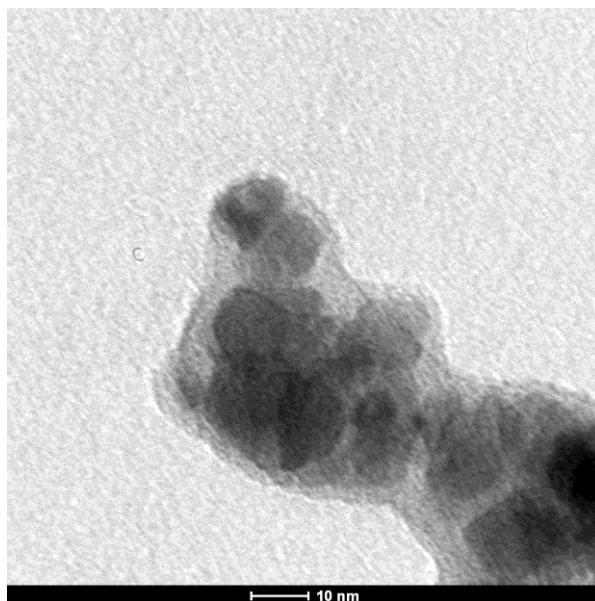


Figura 68: Immagine al TEM del complesso SAMN@RITC-BSAO dove si può osservare la presenza di un rivestimento organico che ricopre le nanoparticelle.

Capitolo 4

DISCUSSIONE

Il lavoro sperimentale svolto nel corso della presente tesi si è basato, in primo luogo, sulla caratterizzazione delle nanoparticelle sintetizzate presso il laboratorio del Prof. Vianello mediante diverse tecniche strumentali, quali, spettroscopia Mossbauer, effettuata in assenza e in presenza di campo magnetico esterno (7 T) nell'intervallo di temperatura tra 5 e 300 Kelvin (K), da misure di magnetizzazione nell'intervallo di temperatura tra 2 K e 300 K in presenza di un campo magnetico esterno a -7 T e +7 T, dall'analisi di diffrazione a raggi x (XRPD), dalla spettroscopia a infrarosso in trasformata di Fourier e dall'analisi al microscopio elettronico a trasmissione. I risultati ottenuti hanno evidenziato che le nanoparticelle hanno un diametro di 10 nm e sono costituite da maghemite stechiometrica, sono superparamagnetiche e sono caratterizzate da una peculiare chimica di superficie. Presentano uno spettro UV-Vis caratteristico caratterizzato da un ampio massimo di assorbimento a 430 nm, al quale si sovrappone una spalla a 492 nm. Il massimo di assorbimento è influenzato dal pH e dal mezzo utilizzato. Infatti, in funzione del pH, si osserva uno spostamento della lunghezza d'onda di massimo assorbimento da 430 nm nell'intervallo di pH 3.5 – 8.8 a 380 nm a valori di pH compresi tra 10 e 11. Questo conferma come la superficie sia coinvolta nel determinare le caratteristiche chimico – fisiche del materiale, in grado di determinarne sia la stabilità che la capacità d'interagire con altre molecole da parte delle nanoparticelle.

Ulteriore aspetto fondamentale è stata la caratterizzazione in soluzione e la funzionalizzazione superficiale di tali nanoparticelle. La caratterizzazione è stata effettuata allo scopo di individuare, mediante studi di cinetica di risospensione in mezzi diversi e in funzione del pH, il mezzo in grado di stabilizzare maggiormente la superficie mentre la funzionalizzazione è stata condotta con il duplice scopo di

studiarne, da un lato la superficie tramite l'impiego di varie sonde fluorescenti, dall'altro valutare la possibilità di legami diretti tra macromolecole e particella per applicazioni biotecnologiche. Nanoparticelle, attualmente presenti in letteratura, per essere stabili in sospensione richiedono, difatti, un rivestimento superficiale a base polimerica o di silice, al contrario delle nanoparticelle utilizzate nel presente lavoro che non necessitano, invece, di alcuna modificazione superficiale. In questo modo si è riusciti a legare direttamente sulla superficie delle SAMN macromolecole quali l'albumina di siero bovino, la perossidasi di rafano, la biotina e l'avidina e molecole fluorescenti, come la rodamina B isotiocianato. Quest'ultima è stata poi usata, tramite il gruppo isotiocianato, come sistema di immobilizzazione sulla superficie delle SAMN di enzimi quali la glucosio ossidasi e l'ammino ossidasi di siero bovino.

4.1. Funzionalizzazione delle nanoparticelle

Diverse sono state le macromolecole utilizzate come sonde sulla superficie delle nanoparticelle, tra cui l'albumina di siero bovino, la perossidasi di rafano, la biotina e l'avidina, macromolecole che già trovano un uso in applicazioni biotecnologiche, quali test ELISA, immunologici e chemi-luminescenti. Tale studio è stato effettuato allo scopo di utilizzare il legame diretto tra proteina e nanoparticella per applicazioni biotecnologiche, quali biosensori in ambito diagnostico, purificazioni proteiche e immobilizzazione di enzimi. L'immobilizzazione diretta sulla superficie delle nanoparticelle di macromolecole offre la possibilità di ridurre costi e tempo necessari per ottenere nanoparticelle idonee a un loro utilizzo. Essendo inoltre il processo di produzione delle nanoparticelle economico e condotto senza l'utilizzo di surfattanti organici, è definibile come una "green chemistry reaction". Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle vengono garantite dall'ottimizzazione del rapporto materiale magnetico/rivestimento organico.

Albumina di siero bovino

Il legame tra le SAMN e l'albumina di siero bovino è stato confermato mediante tecniche strumentali, quali, spettroscopia infrarosso e microscopia elettronica.

- L'analisi all'infrarosso del complesso SAMN@BSA paragonato a quello della proteina libera ha evidenziato la presenza di bande attribuibili alla proteina nell'intervallo 1000 - 1700 cm⁻¹ e di una piccola banda a 2900 cm⁻¹ (figura 42). In modo particolare sono presenti un picco a 1650 cm⁻¹ e 1500 cm⁻¹ attribuibili rispettivamente alla banda dell'ammide I e dell'ammide II. La banda dell'ammide I è attribuita alla combinazione del legame C=O e dello stretching del legame C-N del gruppo ammidico. La banda dell'ammide II invece è attribuita alla combinazione dello stretching del legame C-N e al bending del legame N-H del gruppo ammidico. La banda a 2900 cm⁻¹ rappresenta la vibrazione di legami esterei e C-H (Militello V., 2003).
- L'analisi al microscopio elettronico del complesso SAMN@BSA mostra la presenza di un rivestimento organico caratterizzato da uno spessore compreso in un intervallo di 4 - 7 nm che circonda le nanoparticelle (figura 43). Il rivestimento è in accordo con la dimensioni della proteina riportata in letteratura, 1.7 × 4.2 × 4.2 nm³ (Bloomfield V., 1966).

Perossidasi di rafano

Il legame tra le SAMN e la perossidasi di rafano è stato confermato mediante tecniche strumentali, quali, spettroscopia infrarosso, microscopia elettronica ed analisi di cinetica enzimatica del complesso SAMN@HRP.

- L'analisi all'infrarosso del complesso SAMN@HRP paragonato a quello della proteina libera, ha evidenziato la presenza di bande attribuibili alla proteina nell'intervallo 1000 - 1700 cm⁻¹ e di una piccola banda a 2900 cm⁻¹ (figura 44). In modo particolare sono presenti un picco a 1660 cm⁻¹ e 1550 cm⁻¹ attribuibili rispettivamente alla banda dell'ammide I e dell'ammide II. I piccoli picchi intorno a 1400 cm⁻¹ si trovano nell'intervallo vibrazionale corrispondente allo stretching del gruppo carbossilato (Kaposi A.D., 1999; Maeda Y., 2002).
- Le immagini al microscopio a trasmissione elettronica del complesso SAMN@HRP evidenziano la presenza di un rivestimento organico di circa 7 nm che circonda le nanoparticelle (figura 45). Il rivestimento è in accordo con la dimensioni della proteina riportata in letteratura, 6.2 × 3.5 × 7.5 nm³ (Vianello F., 2000).

- La costante catalitica del complesso SAMN@HRP è risultata ridotta del 50% ($6,6 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$) rispetto a quella dell'enzima nativo.

Biotina

Il legame tra le SAMN e la biotina è stato confermato mediante tecniche strumentali, quali, spettroscopia infrarosso e UV-Vis, e microscopia elettronica.

- L'analisi dallo spettro FTIR, paragonato con quello della biotina libera, evidenzia la presenza di una banda a 1650 cm^{-1} e di una spalla a 2900 cm^{-1} , corrispondenti rispettivamente al gruppo carbonilico del legame ammidico e alla vibrazione di legami esterei e C-H (figura 48). Dallo stesso spettro si può notare la scomparsa di due bande rispettivamente a 1700 cm^{-1} e a 3300 cm^{-1} corrispondenti allo stretching del gruppo ureido - carbonilico e a quello del legame N-H (Lapin N.A., 2009).
- L'interazione della biotina con la superficie delle SAMN ne modifica lo spettro ottico, il quale presenta una variazione della lunghezza d'onda di massimo assorbimento che si sposta da 430 nm a 556 nm in tetrametilammonio perclorato a pH 7 (figura 49).
- Immagini al TEM del complesso SAMN@biotina evidenziano la presenza di una matrice organica che avvolge la superficie delle SAMN come mostrato in figura 50. Lo spessore del rivestimento è di circa 2 nm, paragonabile con le dimensioni della biotina ($0.52 \times 1.0 \times 2.1 \text{ nm}^3$) (Hu P., 2007).

Avidina

Il legame tra le SAMN e l'avidina è stato confermato mediante tecniche strumentali, quali, spettroscopia infrarosso e UV-Vis, e microscopia elettronica.

- L'analisi dello spettro FTIR del complesso SAMN@avidina paragonato a quello della proteina libera, evidenzia la presenza di bande a 1530 cm^{-1} , nell'intervallo $1630 - 1690 \text{ cm}^{-1}$ attribuibili al legame della proteina con la superficie delle SAMN (figura 51). In particolare, la banda a 1640 cm^{-1} corrisponde alla struttura a foglietto β dell'avidina, che ne rappresenta il 70% della struttura secondaria proteica (Swamy M.J., 1996).
- Le proprietà ottiche delle SAMN vengono modificate sia rispetto lo spettro ottico delle singole nanoparticelle (vedi figura 41) sia rispetto al complesso

SAMN@biotina. In particolare, la banda massima di assorbimento in TMA perclorato 50 mM pH 7 passa da 430 nm a 450 nm e la spalla da 490 nm a 500 nm (figura 52).

- Immagini al TEM del complesso SAMN@avidina mostrano la presenza di un rivestimento organico caratterizzato da uno spessore di 5 – 8 nm che circonda le nanoparticelle (figura 53). Il rivestimento è in accordo con la dimensioni della proteina riportata in letteratura, $5.6 \times 5 \times 4 \text{ nm}^3$ (Livnah O., 1993).

È stato possibile legare le proteine analizzate in modo diretto alla superficie delle SAMN, senza necessità di alcun tipo di modificazione superficiale, essendo le SAMN già stabili in sospensione. Al contrario degli esempi presenti attualmente in letteratura che invece richiedono un rivestimento superficiale. La capacità di legare proteine sulla superficie suggerisce che queste nanoparticelle superparamagnetiche possono essere impiegate come sistema di immobilizzazione.

Nel caso dell'immobilizzazione dell'enzima perossidasi di rafano si è registrato una diminuzione dell'attività catalitica dell'enzima immobilizzato sulla superficie delle SAMN, paragonato a quello nativo e questo può essere imputato a cambi conformazionali nella struttura enzimatica in seguito all'immobilizzazione o alla parziale denaturazione dell'enzima nelle condizioni usate per immobilizzarlo sulla superficie delle nanoparticelle e ad effetti sterici che diminuiscono l'accessibilità del sito attivo al substrato.

L'analisi del spettro FTIR della biotina suggerisce che la molecola interagisca con la superficie delle SAMN mediante il gruppo carbossilico terminale e il doppio anello condensato, sistema riconosciuto dall'avidina per l'interazione con la biotina, non consentendo quindi un suo possibile utilizzo come sistema di purificazione di proteine avidinate (Livnah O., 1993). Dall'altra parte però, l'immobilizzazione dell'avidina sulla superficie delle SAMN rende la molecola in grado di mantenere la sua funzione. Analisi spettrofotometriche hanno permesso di determinare il numero di molecole di avidina per particella pari a 10 ± 3 . Il numero di siti disponibili per il legame con la biotina sono stati inoltre determinati spettrofluorimetricamente, usando come sonda la fluoresceina biotinilata e

seguendo la calibrazione della fluorescenza emessa dalla sonda nelle stesse condizioni sperimentali. Dai dati sperimentali ogni molecola di avidina immobilizzata sulla superficie delle SAMN è in grado di legare 3.0 ± 0.9 molecole di biotina (figura 55), confermando la buona capacità di legame del complesso SAMN@avidina e indicando che l'orientamento delle molecole di avidina non comporta ingombro sterico al legame con la biotina. Si può quindi ipotizzare un impiego del complesso SAMN@avidina in metodi di separazione magnetica di composti biotinilati, in saggi immunologici e diagnostici. Il complesso SAMN@avidina si è infatti utilizzato, per purificare la proteina umana ricombinante, SERCA-1A. La SERCA è una proteina di membrana Ca^{2+} -ATPasica abbondante nel muscolo scheletrico la cui funzione è indispensabile nel sistema di accoppiamento eccitazione-contrazione. Viene usata come prototipo di un'intera famiglia di pompe ATP-asiche di tipo P. Purificare in maniera efficiente tale proteina, permette di analizzarla mediante cristallografica a raggi x ed elucidare così importanti aspetti dell'attivazione della pompa e la sua regolazione.

4.2 Nanoparticelle funzionalizzate con la sonda fluorescente Rodamina B Isotiocianato come sistema di immobilizzazione di enzimi

Allo scopo di migliorare le conoscenze sulle proprietà superficiali delle SAMN, che le rendono capaci di interagire direttamente con determinate proteine come l'avidina, l'albumina di siero bovino, la perossidasi di rafano, ma non con altre proteine come la glucosio ossidasi e l'ammino ossidasi di siero bovino, si sono utilizzate diverse sonde fluorescenti, caratterizzate da struttura simile, ma con diversi gruppi funzionali (figura 56). Tra le sonde testate, solo la rodamina B isotiocianato è stata in grado di interagire con la superficie delle SAMN. Paragonando la struttura delle varie molecole fluorescenti, sono stati presi in considerazione i plausibili gruppi funzionali in grado di interagire con la superficie delle nanoparticelle. La possibile interazione con il gruppo carbossilico, già riportato in letteratura (Pirillo S., 2008), è stata analizzata per la fluoresceina. A pH neutro difatti, il gruppo carbossilico è carico negativamente e nessun legame è

stato osservato con la superficie delle SAMN. Da ciò si può dedurre che il gruppo carbossilico non è coinvolto nel legame della RITC con la superficie delle nanoparticelle.

Nessun altro composto fluorescente, oltre alla RITC, ha mostrato interazione con le SAMN. Il complesso SAMN@RITC è stato studiato mediante spettroscopia a infrarosso (figura 58). Dalla letteratura è noto che le principali bande di assorbimento degli ossidi di ferro sono localizzate nella regione 400–800 cm^{-1} (figura 58) che in questo caso sono riconducibili alla maghemite (bande a 445 e 630 cm^{-1}) (Roca A.G., 2007; Daou T.J., 2008). Inoltre, il paragone tra lo spettro della sonda libera e quella immobilizzata sulla superficie delle SAMN mostra bande di assorbimento a 2030-2150, 1589, 1412, 1345, 1274, 1249 and 1180 cm^{-1} (figura 58) attribuibili rispettivamente, al gruppo isotiocianato, allo stretching vibrazionale del legame C=C degli anelli benzenici, al bending vibrazionale del legame CH₂ in -N-(C₂H₅)₂, alla vibrazione del legame C-N dell'anello benzenico, alla vibrazione del legame C-O del gruppo carbossilico, alla vibrazione del legame C-N del gruppo -N-(C₂H₅)₂ e allo stretching vibrazionale asimmetrico del legame C-O-C (Liu X., 2005). Nessuna variazione è stata osservata nelle bande di assorbimento a 1589, 1345, 1274, 1249 and 1180 cm^{-1} , sebbene il rilevante ampliamento della banda a 1412 cm^{-1} , attribuibile al bending del CH₂ nel gruppo -N-(C₂H₅)₂ e la scomparsa della banda FTIR nell'intervallo 2030 - 2150 cm^{-1} , attribuibili al gruppo isotiocianato (figura 58), suggeriscono il coinvolgimento di questi gruppi funzionali nel legame. Questi risultati suggeriscono l'ipotesi di un sito multiplo di legame che interessa, oltre al gruppo isotiocianato, anche gli amino gruppi dell'anello condensato della RITC, in contrapposizione con le altre sonde testate che non contengono contemporaneamente questi due gruppi funzionali. Il gruppo isotiocianato sulla molecola fluorescente ha un effetto positivo sul legame con le nanoparticelle, ma non è sufficiente a garantire la formazione di un addotto stabile, come si è visto per la fluoresceina isotiocianato. D'altra parte, nemmeno gli amino gruppi terziari dell'anello condensato, seppur coinvolti nel legame alle nanoparticelle, come riportato dall'allargamento della banda FTIR a 1412 cm^{-1} , sono in grado di garantire la formazione di un addotto stabile, senza la concomitanza del gruppo isotiocianato, come dimostrato con la sonda fluorescente rodamina B. Per verificare il coinvolgimento e l'importanza del gruppo

isotiocianato nella formazione del legame con la superficie delle SAMN, tre diverse ammine sono state legate alla sonda RITC: glicina, etilendiamina e etanolamina. I risultati indicano che la quantità di molecole di sonda modificata in grado di interagire con la superficie delle nanoparticelle dipende dal tipo di modificazione del gruppo isotiocianato, confermando quindi il ruolo del gruppo isotiocianato nel legame.

Sfruttando le proprietà chimiche del gruppo isotiocianato, e la sua stabilità in un ampio intervallo di pH, si è provveduto ad immobilizzare, sulla superficie delle SAMN, gli enzimi glucosio ossidasi e amino ossidasi di siero bovino, allo scopo di sviluppare un nanocatalizzatore fluorescente controllabile magneticamente.

Complesso SAMN@RITC-GOx

Il dosaggio del cofattore FAD, rilasciato dalla glucosio ossidasi in ambiente acido, (paragrafo 2.10.12) ha consentito di quantificare la concentrazione di enzima immobilizzato sulla superficie delle SAMN. Tale valore è risultato di 10.6 ± 2.0 nmol ($n = 3$) di GOx su 14.6 mg del complesso SAMN@RITC-GOx, corrispondente a 10 ± 2 molecole per nanoparticella. Ciò suggerisce la formazione di un monostrato di enzima legato alla superficie delle nanoparticelle.

L'enzima immobilizzato, come monostrato molecolare, sulla superficie delle nanoparticelle, mantiene attività catalitica nei confronti dell'ossidazione del glucosio, ed il riutilizzo del complesso SAMN@RITC-GOx senza perdita di efficienza catalitica (figura 63). Tuttavia, la procedura di immobilizzazione riduce l'attività catalitica dell'enzima immobilizzato del 25%, rispetto a quello nativo (tabella 7). Come già precedentemente accennato per l'enzima perossidasi, questo è attribuibile a cambi conformazionali nella struttura enzimatica in seguito all'immobilizzazione o alla parziale denaturazione dell'enzima nelle condizioni usate per immobilizzarlo sulla superficie delle nanoparticelle e ad effetti sterici che diminuiscono l'accessibilità del sito attivo al substrato. Il complesso SAMN@RITC-GOx è stato, inoltre, utilizzato per sviluppare un biosensore per la determinazione della concentrazione di glucosio. L'elettrodo in pasta di grafite, modificato con il 15%_{p/p} del complesso SAMN@RITC-GOx, presenta una risposta lineare nei confronti del glucosio nell'intervallo analizzato 0 - 1.5 mM di glucosio, caratterizzato da una sensibilità di $45.85 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ e un limite di rivelazione di

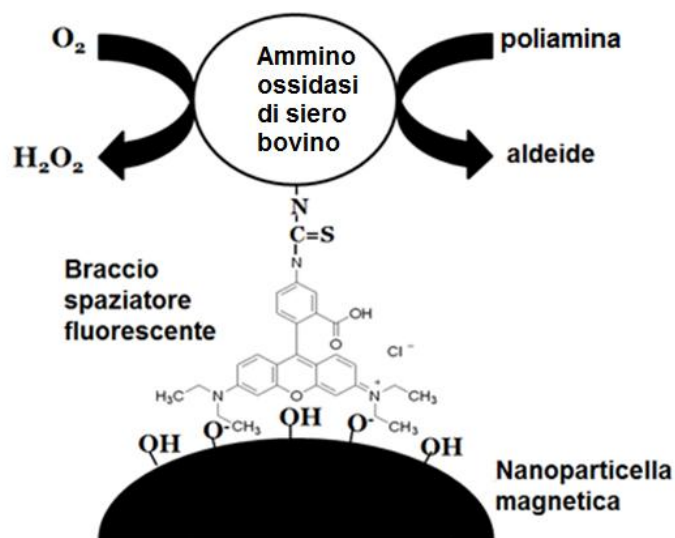
0.9 μM . Tale biosensore è stato utilizzato con successo su campioni reali, come il succo di frutta di albicocca e pesca.

Inoltre, il nanocatalizzatore magnetico fluorescente può essere impiegato per rimuovere l'ossigeno molecolare da soluzioni acquose, in presenza di un eccesso di glucosio. Ulteriore vantaggio del sistema sviluppato consiste nella possibilità di rilevare la presenza e la quantità del nanocatalizzatore mediante fluorescenza. Lo sviluppo di catalizzatori magnetici fluorescenti può trovare impiego in alcune applicazioni chimiche sugli alimenti, come per esempio abbassare la produzione di etanolo nel vino o la produzione di acido gluconico (Wong C.M., 2008; Sandip B.B., 2009).

Complesso SAMN@RITC-BSAO

Nel corso del lavoro sperimentale di tesi è stato inoltre sviluppato un nuovo addotto tra nanoparticelle ed ammino ossidasi di siero bovino (SAMN@RITC-BSAO) utilizzando la RITC come reattivo bifunzionale in grado di legare da un lato la superficie delle SAMN e dall'altro l'enzima. La massima capacità di legame dell'ammino ossidasi sulla superficie delle nanoparticelle, è risultata pari a 6.4 mg g^{-1} di particelle. L'enzima immobilizzato, come monostrato molecolare, sulla superficie delle nanoparticelle, mantiene l'attività catalitica nei confronti dell'ossidazione della spermina, suo substrato, per più di dieci giorni. La procedura di immobilizzazione riduce l'attività catalitica dell'enzima del $30 \pm 10 \%$ rispetto il nativo, corrispondente a 0.81 IU per grammo di SAMN, mentre la costante di Michaelis - Menten risulta raddoppiata (tabella 9). Tali variazioni, rispetto all'enzima nativo, possono essere spiegate con le stesse motivazioni riportate per la perossidasi e la glucosio ossidasi.

Il nanocatalizzatore fluorescente, controllabile magneticamente, e quindi rimovibile mediante applicazione di un campo magnetico esterno, può essere usato per produrre, all'interno di cellule tumorali, prodotti citotossici, quali il perossido di idrogeno, aldeidi e ammoniaca. Ciò in virtù del fatto che le poliammine endogene (spermina o spermidina) sono presenti in concentrazione più elevata in questo tipo di cellule, secondo quanto riportato nello schema 2. I risultati mostrano che l'ammino ossidasi di siero bovino è un buon candidato per sviluppare addotti fluorescenti magnetici.



Schema 2: Schema semplificato del nanocatalizzatore fluorescente magnetico.

I risultati ottenuti dal presente studio potrebbero suggerire nuove strategie per potenziare l'eliminazione selettiva di cellule tumorali, dato che nanoparticelle già sono impiegate in applicazioni terapeutiche come sistema di trasporto di farmaci all'interno delle cellule, come cura del tumore tramite trattamento termico o come agente di contrasto nella risonanza magnetica (Kelkar S.S., 2011; Duncan R., 2011). L'addotto SAMN@RITC-BSAO può essere, inoltre, utilizzato come nanocatalizzatore controllabile magneticamente per ridurre il contenuto di poliammine in comuni alimenti utilizzati in pazienti con il cancro alla prostata. Come riportato da Bardocz (Bardocz S., 1995) alcuni cibi contengono grandi quantitativi di poliammine e studi clinici effettuati in pazienti ormono-refrattari con cancro metastatico alla prostata hanno rivelato la possibilità di una terapia nutrizionale basata su cibi a minor contenuto di poliammine (Cipolla B., 2003; Cipolla B.G., 2007).

In conclusione, nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate innovative nanoparticelle di maghemite superparamagnetiche, che presentano caratteristiche superficiali peculiari, come un'eccellente stabilità colloidale senza alcun rivestimento superficiale, al contrario degli esempi presenti attualmente in letteratura. Presentano inoltre, proprietà spettroscopiche uniche, una ben definita struttura cristallina e sono in grado di legare macromolecole direttamente sulla loro superficie, senza richiedere modificazione alcuna alla loro superficie (Magro M., 2010; Magro M., 2011). La capacità di legare sulla propria superficie

macromolecole, le rende un promettente sistema per immobilizzare proteine ed enzimi, garantendo il mantenimento l'attività catalitica e biologica, le rende utilizzabili per sviluppare biosensori, come dimostrato nel caso dell'enzima glucosio ossidasi, e suggerire nuove strategie per potenziare l'eliminazione selettiva di cellule tumorali, come nel caso dell'ammino ossidasi di siero bovino.

Il presente lavoro di tesi ha prodotto i seguenti manoscritti:

M. Magro, G. Sinigaglia, L. Nodari, J. Tucek, K. Polakova, Z. Marusak, S. Cardillo, G. Salviulo, U. Russo, R. Stevanato, R. Zboril, F. Vianello, 2012. Charge binding of rhodamine derivative to OH⁻ stabilized nanomaghemite – Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. Accepted for publication in *Acta Biomaterialia*, IF. 4.822.

G. Sinigaglia, M. Magro, G. Miotto, S. Cardillo, E. Agostinelli, R. Zboril , E. Bidollari and F. Vianello, 2012. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. Accepted for publication in *International Journal of Nanomedicine*, IF. 4.976.

D. Baratella, M. Magro, G. Sinigaglia, R. Zboril, G. Salviulo and F. Vianello, 2012. A glucose biosensor based on novel maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles. Submitted for publication in *Biosensors and Bioelectronics*, IF. 5.361.

Bibliografia

- Ackerson C.J., Jadzinsky P.D., Jensen G.J., Kornberg R.D. 2006. Rigid, specific and discrete gold nanoparticle/antibody conjugates. *J Am Chem Soc.* 128:2635-2640.
- Agostinelli E., Belli F., Molinari A., Condello M., Palmigiani P., Dalla Vedova L., Marra M., Seiler N., Arancia G. 2006a. Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (M14): sensitization by heat and MDL 72527. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763:1040-1050.
- Agostinelli E., Belli F., Dalla Vedova L., Marra M., Crateri P., Arancia G. 2006b. Hyperthermia enhances cytotoxicity of amine oxidase and spermine on drug-resistant colon adenocarcinoma cells (LoVo). *Int. J. Oncol.* 28:1543-1553.
- Agostinelli E., Dalla Vedova L., Belli F., Condello M., Arancia G., Seiler N. 2006c. Sensitization of human colon adenocarcinoma cells (LoVo) to reactive oxygen species by lysosomotropic compounds. *Int. J. Oncol.* 29:947-955.
- Agostinelli E., Seiler N. 2006d. Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer. Therapeutic implications. *Amino Acids.* 31:341-355.
- Aubin-Tam M.E., Hamad-Schifferli K. 2008. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. *Biomed. Mater.* 3:34001-34018.
- Bachrach U. 1989. Polyamines as indicators of disease activity and response to therapy in cancer patients. In: Bachrach U and Heimer YM (eds) *The Physiology of Polyamines, Vol 2.* CRC Press, Boca Raton, pp 234-249.
- Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. 2009. Glucose oxidase – An overview. *Biotechnology Advances* 27:489 – 501.
- Barbara H. Stuart. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications,* Wiley & Sons LTD, England.
- Bardocz S., Duguid T.J., Brown D.S., Grant G., Pusztai A., White A., Ralph A. 1995. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br J Nutr.* 73:819–828.
- Bloomfield V. 1966. The structure of Bovine Serum Albumin at low pH. *Biochemistry* 5:684-689.

- Brazeau B.J., Johnson B.J., Wilmot C.M. 2004. Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Biochemistry and Biophysics* 428:22-31.
- Cai D.Y., Klinmann J.P. 1994. Evidence for a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in yeast copper amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 269:32039–32042.
- Calcabrini A., Arancia G., Marra M., Crateri P., Befani O., Martone A., Agostinelli E. 2002. Enzymatic oxidation product of spermine induce greater cytotoxic effects on human multidrug-resistant colon carcinoma cells (LoVo) than on their wild-type counterparts. *Int. J. Cancer* 99:43-52.
- Carter D.C., Ho J.X. 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45:153-203.
- Casero R.A., Pegg A.E. 2010. Polyamine catabolism and disease. *Biochem. J.* 421:323–338.
- Chen L.X., Liu T., Thurnauer M.C., Csencsits R., Rajh T. 2002. Fe₂O₃ nanoparticle structures investigated by X-ray absorption near-edge structure, surface modifications, and model calculations. *J. Phys. Chem. B* 106:8539-8546.
- Cipolla B., Guillè F., Moulinoux J.P. 2003. Polyamine-reduced diet in metastatic hormone-refractory prostate cancer patients. *Biochem Soc Trans.* 31:384–387.
- Cipolla B.G., Havouis R., and Moulinoux J.P. 2007. Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids.* 33:203–212.
- Coey J.M.D., Khalafalla D. 1972. Superparamagnetic γ -Fe₂O₃. *Physica Status Solidi Volume*, 11: 229–241.
- Cooper V.A., Nicell J.A. 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research.* 30: 954-964.
- Cornell R.M., Schwertmann U. 2003. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. Wiley VCH.
- Daou T.J., Greneche J.M., Pourroy G., Buathong S., Derory A., Ulhaq-Bouillet C., Donnio B., Guillon D., Begin-Colin S. 2008. Coupling agent effect on magnetic

- properties of functionalized magnetite-based nanoparticles. *Chem. Mater.* 20:5869–5875.
- Duncan R., Gaspar R. Nanomedicine(s) under the Microscope. 2011. *Mol Pharm.* DOI: 10.1021/mp200394t.
- Elo H.A., Raisanen S., Tuohimaa P.J. 1980. Induction of an antimicrobial biotin-binding egg white protein. *Experientia.* 36:312-313.
- Emerson T.E. 1989. Unique features of albumin: a brief review. *Crit. Care. Med.* 17:690-694.
- Fan J., Lu J., Xu, R., Jiang R., Gao Y. 2003. Use of Water-Soluble Fe₂O₃ Nanoparticles with Narrow Size Distributions in Isolating Avidin. *J. Colloid Interface Sci.* 266:215-218.
- Figuerola A., Di Corato R., Manna L., Pellegrino T. 2010. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological research.* 62:126–143.
- Green N.M. 1990. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 184:51-67.
- Gruber H.J., Kada G., Marek M., Kaiser K. 1998. Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids. *Biochim Biophys Acta* 1381:203-212.
- Gupta A.K., Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 26:3995–4021.
- Halliday D., Resnick R., Kenneth S.K. 1996. Physics. Volume 1. John Wiley & Sons.
- Hecht H.R., Kalisz H.M., Hendle J., Schmid R.D., Schomburg D. 1993. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å. *J. Mol. Biol.* 229:153-172.
- Hermanek M., Zboril R., Medrik I., Pechousek J., Gregor C. 2007. Catalytic Efficiency of Iron(III) Oxides in Decomposition of Hydrogen Peroxide: Competition between the Surface Area and Crystallinity of Nanoparticles. *J.Am.Chem.Soc.* 129:10929-10936.
- Holmberg A., Blomstergren A., Nord O., Lukacs M., Lundeberg J., Uhl'en M. 2005. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis.* 26:501–510.
- Hrbac J., Halouzka V., Zboril R., Papadopoulos K., Triantis T. 2007. Carbon Electrodes Modified by Nanoscopic Iron(III) Oxides to Assemble Chemical

- Sensors for the Hydrogen Peroxide Amperometric Detection. *Electroanal.* 19:1850-1854.
- Hu P., Tanii T., Zhang G.J., Hosaka T., Ohdomari I. 2007. Ultrasensitive detection of biomolecules using functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Sens. Act. B: Chemical.* 124:161-166.
- Iost R.M., Da Silva W.C., Madurro J.M., Madurro A.G., Ferreira L.F., Crespilho F.N. 2011. Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases. *Front. Biosci.* 3:663-689.
- Jun Y.W., Lee J.S., Cheon J. 2008. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47:5122-5135.
- Kalisz H.M., Hecht H.J., Schomburg D., Schmid R.D. 1991. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et biophysica acta* 1080:138-142.
- Kang Y.S., Risbud S., Rabolt J.F., Stroeve P. 1996. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and gamma-Fe₂O₃ particles. *Chem. Mater.* 8:2209-2211.
- Kaposi A.D., Fidy J., Manas E.S., Vanderkooi J.M., Wright W.W. 1999. Horseradish peroxidase monitored by infrared spectroscopy: effect of temperature, substrate and calcium. *Biochimica et biophysica acta* 1435:41-50.
- Kelkar S.S., Reineke T.M. 2011. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem.* 22:1879-1903.
- Knowles P.F., Dooley D.M. 1994. Amine Oxidases. In: Sigel H and Sigel A (eds) *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York, pp 361-403.
- Koneracká M., Kopčanský P., Timko M., Ramchand C.N., Saiyed Z.M., Trevan M., De Sequeira A. 2006. Immobilization of enzymes on magnetic nanoparticles. *Methods in Biotechnology* 22:217-228.
- Lakowicz J.R. 2010. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Third edition, vol.1. University of Maryland School of Medicine, USA.
- Langmuir I. 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, 40:1361-1403.

- Lapin N.A., Chabal Y.J. 2009. Infrared characterization of biotinylated silicon oxide surfaces, surface stability and specific attachment of streptavidin. *J. Phys. Chem. B* 113:8776-8783.
- Li Z., Ni Y., Wang X., Zhao G. 2010. Direct electrocatalytic oxidation of nitric oxide and reduction of hydrogen peroxide based on alpha-Fe₂O₃ nanoparticles-chitosan composite. *Talanta*. 82:196-201.
- Lindsay G.S., Wallace H.M. 1999. Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis. *Biochem. J.* 337:83-87.
- Liu X., Cui D., Wang Q., Xu H., Li M. 2005. Photoluminescence enhancement of ZrO₂/rhodamine B nanocomposite. *J. Mat. Sci.* 40:1111-1114.
- Livnah O., Bayer E.A., Wilchek M., Sussman J.L. 1993. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5076-5080.
- Llandro J., Palfreyman J.J., Ionescu A., Barnes C.H.W. 2010. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Med Biol Eng Comput.* 48:977-998.
- Lucas I.T., Dubois E., Chevalet J., Durand-Vidal S., Joiret S. 2008. Reactivity of nanocolloidal particles γ -Fe₂O₃ at charged interfaces. Part 2. Electrochemical conversion. Role of the electrode material. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10:3274-3286.
- Lunelli M., Di Paolo M.L., Biadene M., Calderone V., Battistutta R., Scarpa M., Rigo A., Zanotti G. 2005. Crystal structure of amine oxidase from bovine serum. *Journal of Molecular Biology* 346:991-1004.
- Maeda Y, Fujihara M, Ikeda I. 2002. Spectroscopic study on structure of horseradish peroxidase in water and dimethyl sulfoxide mixture. *Biopolymers* 67:107-112.
- Magro M., Sinigaglia G., Nodari L., Tucek J., Polakova K., Marusak Z., Cardillo S., Salviulo G., Russo U., Stevanato R., Zboril R., Vianello F. 2012. Charge binding of rhodamine derivative to OH⁻ stabilized nanomaghemite - Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. In press in *Acta Biomaterialia*.

- Magro M., Valle G., Russo U., Nodari L., Vianello F. 2010. Maghemite nanoparticles and method for preparing thereof. Patent n. PCT/EP2010/060486.
- Militello V., Casarino C., Emanuele A., Giostra A., Pullara F., Leone M. 2003. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. *Biophysical Chemistry* 107:175–187.
- Mondovì B., Riccio P., Agostinelli E., Marcozzi G. 1989. Oxidation of diamines and polyamines. In: Bachrach U and Heimer YM (eds) *The Physiology of Polyamines*, Vol 1. CRC Press, Boca Raton, pp 177-201.
- Mornet S., Portier J., Duguet E. 2005. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J. Magn. Magn. Mater.* 293:127–134.
- Mossbauer R.L. 1961. Recoilless nuclear resonance absorption of gamma radiation. *Nobel Lecture*: 584 – 601.
- Niemantsverdriet J.W. 2007. *Spectroscopy in Catalysis*, Wiley-VCH.
- Park J., An K.J., Hwang Y.S., Park J.G., Noh H.J., Kim J.Y. 2004. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* 3:891-895.
- Parsons M.R., Convery M.A., Wilmot C.M., Yadav K.D.S., Blakeley V., Corner A.S., Phillips S.E.V., McPherson M.J., Knowles P.F. 1995. Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure*. 3:1171-1184.
- Peters T. 1977. Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem.* 23: 5-12.
- Pirillo S., Cornaglia L., Ferreira M.L., Rueda E.H. 2008. Removal of fluorescein using different oxides as adsorbents: effect of pH. *Spectrochim Acta A*. 71:636-643.
- Ramgir N.S., Yang Y., Zacharias M. 2010. Nanowire-Based Sensors. *Small*. 6:1705-1722.
- Ricci F., Palleschi G. 2005. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 21:389-407.
- Roca A.G., Marco J.F., Morales M.P., Serna C.J. 2007. Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 111:18577–18584.

- Salgueiriño-Maceira V., Correa-Duarte M.A., Spasova M., Liz-Marzán L.M., Farle M. 2006. Composite Silica Spheres with Magnetic and Luminescent Functionalities. *Adv. Funct. Mater.* 16:509–514.
- Sanderson W.R. 2000. Clear industrial processes using hydrogen peroxide. *Pure Appl. Chem.* 72:1289–1304.
- Sandip B. B., Mahesh V. B., Rekha S. S., Laxmi A. 2009. Glucose oxidase - an overview. *Biotechnol. Adv.* 27:489-501.
- Shubayev V.I., Pisanic T.R., Jin S. 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews.* 61:467–477.
- Steinitz M. 2000. Quantification of blocking effect of tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA microwells. *Anal. Biochem.* 282: 232-238.
- Stevanato R., Mondovi B., Sabatini S., Rigo A., 1990. Spectrophotometric assay for total polyamines by immobilized amine oxidases. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 237:391 – 397.
- Stevanato R., Vianello F., Rigo A. 1995. Thermodynamic analysis of the oxidative deamination of polyamines by bovine serum amine oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324:374-378.
- Swamy M.J., Heimburg T., Marsh D. 1996. Fourier-Transform Infrared Spectroscopic studies on avidin secondary structure and complexation with biotin and biotin-lipid assemblies. *Biophys. J.* 71:840-847.
- Swoboda B.E.P., Massey V., 1965. Purification and properties of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry.* 240:2209 – 2215.
- Teja A.S., Koh P.Y. 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials.* Vol. 55:22 – 45.
- Tuohimaa P., Joensuu T., Isola J., Keinanen R., Kunnas T., Niemela A., Pekki A., Wallen M., Ylikomi T., Kulomaa M. 1989. Development of progestin-specific response in the chicken oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* 33:125-134.
- Vaglio A. 1981. Spettrometria e gascromatografia-Spettrometria di massa. Principi e applicazioni. Piccin Editore.
- Valeur B. 2002. Molecular fluorescence. Principle and applications. Wiley-VHC, Weinheim, Germany.

- Van Dijk M.A., Tchegotareva A.L., Orrit M., Lippitz M., Berciaud S., Lasne D., Cognet L., Lounis B. 2006. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8:3486-3495.
- Veisegh O., Gunn J.W., Zhang M. 2010. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews.* 62:284–304.
- Veitch N.C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65:249-259.
- Vianello F., Bortoluzzi S., Zennaro L., Rigo A. 2002. Determination of glucose oxidase immobilised as monolayer onto a flat surface. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 3:263-271.
- Vianello F., Zennaro L., Di Paolo M.L., Rigo A., Malacarne C., Scarpa M. 2000. Preparation, morphological characterized and activity of thin films of Horseradish Peroxidase. *Biotechnol Bioeng.* 68:488-495.
- Vieira Ferreira L.F., Cabral P.V., Almeida P., Oliveira A.S., Reis M.J., Botelho do Rego A.M. 1998. Ultraviolet/Visible Absorption, Luminescence, and X-ray Photoelectron Spectroscopic Studies of a Rhodamine Dye Covalently Bound to Microcrystalline Cellulose. *Macromol.* 31:3936-3944.
- Wang X., Zhuang J., Peng Q., Li Y.D. 2005. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature.* 437:121-124.
- Wang, J., 2008. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* 108:814–825.
- Wilchek M., Bayer E.A. 2010. Methods in enzymology, Avidin-biotin technology, volume 184. M.Wilchek and E.A.Bayer.
- Wong C. M., Wong K. H., Chen X. D. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:927-938.
- Ye X.S., Wang P., Zhou T., Liu J., Liu F. 2009. Molecular mechanism for conformation mobility of the active center of glucose oxidase adsorbed on single wall carbon nanotubes. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society:* 2739 – 2743.
- Zboril R., Mashlan M., Petridis D. 2002. Iron(III) Oxides from Thermal Processes Synthesis, Structural and Magnetic Properties, Mössbauer Spectroscopy Characterization, and Applications. *Chemistry of Materials* 14:969-982.

- Zerega B., Camardella L., Cermellis S., Sala R., Cancedda R., Descalzi Cancedda F. 2001. Avidin expression during chick chondrocyte and myoblast development in vitro and in vivo: regulation of cell proliferation. *J. Cell. Sci.* 114:1473-1482.
- Zsila F. 2009. Novel circular dichroism spectroscopic approach for detection of ligand binding of proteins: Avidin as example. *Anal. Biochem.* 391:154-156.

