

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chimiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO: SCIENZE CHIMICHE

CICLO XXIV

SINTESI DI NANOPARTICELLE PER IL RICONOSCIMENTO SELETTIVO DEI TESSUTI

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore :Ch.mo Prof. Leonard J. Prins

Dottorando : Matteo Graziani

INDICE

1 - INTRODUZIONE	11
1.1 - CHIMICA SUPRAMOLECOLARE	12
1.1.1 - AUTO-ASSEMBLAGGIO di SUPRAMOLECOLE	12
1.1.2 - SUPRAMOLECOLE a CONFRONTO	13
1.1.2.1 - Differenze tra Nanoparticelle d'Oro e Micelle	13
1.1.2.2 - Differenze tra Nanoparticelle d'Oro e Liposomi	14
1.1.2.3 - Differenze tra Nanoparticelle d'Oro e Dendrimeri	15
1.1.3 - NANOPARTICELLE (GENERALE)	16
1.1.3.1 - Leganti delle Nanoparticelle	18
1.1.3.2 - Nanoparticelle come Sistemi Polivalenti	19
1.2 - SISTEMI BIOMIMETICI MULTIVALENTI	19
1.2.1 - MULTIVALENZA e COOPERATIVITÀ	20
1.2.2 - SISTEMI MULTIVALENTI ARTIFICIALI	21
1.2.3 - CATALIZZATORI MULTIVALENTI	22
1.2.4 - IDROLISI di DIESTERI FOSFORICI	23
1.3 - NANOPARTICELLE d'Au(0)	27
1.3.1 - SINTESI di NANOPARTICELLE d'Au(0)	28
1.3.2 - LEGANTI	31
1.3.2.1 - Leganti al Fosforo	33
1.3.2.2 - Leganti allo Zolfo	34
1.3.2.3 - Leganti all'Azoto	39
1.3.3 - POST-FUNZIONALIZZAZIONE di NANOPARTICELLE	39
1.4 - APPLICAZIONI degli MPCs	41
1.4.1 - MPCs nel RICONOSCIMENTO MOLECOLARE	41
1.4.1.1 - Vaccini Artificiali	48
1.4.1.2 - Test Enzimatici e Nucleici	49
1.4.2 - MPCs FUNZIONALIZZATI come ENZIMI SINTETICI (NANOZIMI)	50

1.5 - SCOPO	59
2 - FUNZIONALIZZAZIONE COVALENTE di NANOPARTICELLE d'ORO RICOPERTE con un MONOSTRATO di MOLECOLE ORGANICHE	63
2.1 - INTRODUZIONE	63
2.2 - RISULTATI e DISCUSSIONE	64
2.2.1 - COPERTURA di AuNPs con ALDEIDI AROMATICHE	64
2.2.1.1 - Sintesi di AuNPs p-nitrobenzaldeide	65
2.2.1.2 - Formazione di idrazoni	69
2.2.1.3 - Utilizzo di disolfuri	72
2.2.1.4 - Rimozione del nitrogruppo	75
2.2.2 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs con ALDEIDI LATENTI	77
2.2.2.1 - Sintesi del diolo vicinale	77
2.2.2.2 - Copertura AuNPs e ottenimento di aldeide alifatica	79
2.2.2.3 - Sintesi di dietilacetale e formazione di AuNPs	81
2.2.2.4 - Ottimizzazione aldeidi alifatiche latenti	83
2.2.3 - ALTRI METODI di FUNZIONALIZZAZIONE	87
2.2.3.1 - Funzionalizzazione tramite alchilazione	87
2.2.3.2 - Funzionalizzazione tramite gruppi carbossilici attivati	91
2.3 - CONCLUSIONI	92
2.4 - PARTE SPERIMENTALE	93
2.4.1 - MATERIALI	93
2.4.1.1 - Reagenti e Solventi	93
2.4.1.2 - Materiale per Cromatografia	93
2.4.2 - STRUMENTAZIONE	93
2.4.2.1 - Spettri NMR	93
2.4.2.2 - Spettri con gradiente di campo	94
2.4.2.3 - Spettri di Massa	94
2.4.2.4 - Misura del pH	94

2.4.3 - METODOLOGIE GENERALI	94
2.4.3.1 - Test di Ellman qualitativo	94
2.4.3.2 - Procedura per la sintesi di AuNPs col metodo Brust-Schiffin	94
2.4.3.3 - Procedura generale per la sintesi di AuNPs col metodo Scrimin	95
2.4.4 - SINTESI e APPLICAZIONI delle AuNPs 7	95
2.4.4.1 - Sintesi di S-acetil-8-bromoottantiolo	95
2.4.4.2 - Sintesi di 3-idrossi-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene	97
2.4.4.3 - Sintesi 3-(S-acetil-8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene	97
2.4.4.4 - Sintesi 3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene	98
2.4.4.5 - Sintesi delle AuNPs 7	99
2.4.4.6 - Liberazione del gruppo aldeidico dalle AuNPs 7	99
2.4.4.7 - Formazione AuNPs-N(CH ₃) ₃ ⁺ in fase eterogenea	100
2.4.4.8 - Formazione AuNPs-N(CH ₃) ₃ ⁺ in fase omogenea	101
2.4.4.9 - Formazione AuNPs-Ph in fase omogenea	102
2.4.4.10 - Formazione AuNPs-Ph in fase eterogenea	102
2.4.5 - SINTESI di DISOLFURI	103
2.4.5.1 - Sintesi di [3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene] disolfuro	103
2.4.5.2 - Sintesi di [3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-benzaldeide] disolfuro	104
2.4.5.3 - Sintesi di AuNPs-p-nitro-benzaldeide	104
2.4.5.4 - Sintesi di N ₁ -[3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-benzil]-N ₂ -(2-fenilacetil)-idrazone disolfuro	105
2.4.6 - SINTESI di AuNPs-BENZALDEIDE	106
2.4.6.1 - Sintesi 3-idrossi-1-(dimetossimetil)-benzene	106
2.4.6.2 - Sintesi di 3-(8-mercapto-ottilossi)-1-(dimetossimetil)-benzene	106
2.4.7 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPS con ALDEIDI LATENTI da DIOLO VICINALE	107
2.4.7.1 - Sintesi di acido S-acetil-8-mercapto-ottanoico	107
2.4.7.2 - Sintesi di S-acetil-8-mercapto-ottanoil cloruro	108
2.4.7.3 - Sintesi di N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammide	109
2.4.7.4 - Sintesi di N-(2,3-diidrossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanammide	110
2.4.7.5 - Sintesi di N-(2,3-diidrossipropil)-8-mercapto-ottanammide	110
2.4.7.6 - Sintesi di AuNPs 25	111
2.4.7.7 - Sintesi di AuNPs 26	112

2.4.8 - FUNZIONALIZZAZIONE AuNPs con ALDEIDI ALIFATICHE PROTETTE	112
2.4.8.1 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanammide	112
2.4.8.2 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-8-mercapto-ottanammide	113
2.4.8.3 - Sintesi di AuNPs 32	114
2.4.9 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs tramite ALCHILAZIONE con ALDEIDI PROTETTE	114
2.4.9.1 - Sintesi 8-bromo-ottantiolo	114
2.4.9.2 - Sintesi AuNPs 34	115
2.4.9.3 - Sintesi AuNPs-dietilacetale 35	116
2.4.9.4 - Sintesi AuNPs-aldeide 36	116
2.4.10 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs con TIOLO 40	117
2.4.10.1 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-S-acetil-8-mercapto-ottanamina	117
2.4.10.2 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-8-mercapto-ottanamina	118
2.4.10.3 - Sintesi di AuNPs 40	118
2.4.10.4 - Sintesi di AuNPs 41	119
2.4.11 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs tramite TIOLI BROMURATI	120
2.4.11.1 - Sintesi di AuNPs 43	120
2.4.11.2 - Sintesi di AuNPs 45	120
2.4.11.3 - Sintesi di AuNPs 47	121
2.4.12 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs tramite CARBOSSILI ATTIVATI	121
2.4.12.1 - Sintesi di AuNPs 48	121
2.4.12.2 - Sintesi di AuNPs 49	122

3 - STUDI sulla FUNZIONALIZZAZIONE di NANOPARTICELLE d'ORO tramite INTERAZIONI IONICHE 123

3.1 - INTRODUZIONE	123
3.2 - RISULTATI e DISCUSSIONE (FRET su NPs)	123
3.2.1 - NANOPARTICELLE CATIONICHE LEGATE a PEPTIDI	123
3.2.1.1 - Sintesi dei tioli cationici	124
3.2.1.2 - Procedimento di sintesi e copertura di AuNPs-TACN e AuNPs-NH ₄ ⁺	128
3.2.1.3 - Sintesi di peptidi oligoanionici fluorescenti	131
3.2.1.4 - Analisi fluorimetriche del legame tra peptidi cationici e fluorescenti	135
3.2.2 - ANALISI AuNPs tramite FRET	141
3.2.2.1 - Il fenomeno FRET e la scelta dei peptidi fluorescenti	141

3.2.2.2 - Comportamento dei peptidi fluorescenti in soluzione e su AuNPs cationiche	144
3.2.2.3 - FRET su AuNPs con sonde fluorescenti in rapporti variabili	148
3.3 - CONCLUSIONI	152
3.4 - PARTE SPERIMENTALE	153
3.4.1 - MATERIALI	153
3.4.1.1 - Reagenti e solventi	153
3.4.1.2 - Soluzioni Tampone	154
3.4.1.3 - Materiale per sintesi su fase solida	154
3.4.2 - STRUMENTAZIONE	154
3.4.2.1 - Spettrofotometria UV/Vis	154
3.4.2.2 - Spettrofluorimetria	154
3.4.3 - METODOLOGIE GENERALI	154
3.4.3.1 - Kaiser test qualitativo	154
3.4.3.2 - Distacco del gruppo protettore Fmoc	155
3.4.3.3 - Acetilazione	155
3.4.3.4 - Lavaggio della resina	155
3.4.4 - PROCEDURE di SINTESI	155
3.4.4.1 - Sintesi S-acetil-8-mercapto-1-bromoottano	155
3.4.4.2 - Sintesi S-acetil-8-mercapto-1-ottil-trimetilammonio bromuro	156
3.4.4.3 - Sintesi 8-mercapto-1-ottil-trimetilammonio cloruro	156
3.4.4.4 - Sintesi S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil-pentafluorofenilestere	157
3.4.4.5 - Sintesi 1,4-Bis(t-butilossicarbonil)-1,4,7-triazaciclononano	158
3.4.4.6 - Sintesi metil-[1-(4,7-diBoc-1,4,7-TACN)]-acetato	158
3.4.4.7 - Sintesi di pentafluorofenil[1-(4,7-diBoc-1,4,7-TACN)]-acetato	159
3.4.4.8 - Sintesi di N-Boc-diamminobutano	160
3.4.4.9 - Sintesi N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-butilendiammonio trifluoroacetato	161
3.4.4.10 - Sintesi del tiolo 63	162
3.4.4.11 - Sintesi e copertura di AuNPs-TACN e AuNPs-NH ₄ ⁺	163
3.4.4.12 - Sintesi di peptidi oligoanionici fluorescenti	164
3.4.4.13 - Sintesi di cumarina 343 N-propilammide	167
3.4.4.14 - Sintesi di acido (4,6-dimetil-7-etilammino-cumaril) etanoico	167
3.4.4.15 - Sintesi di TriAsp-Cum 2	168

3.4.5 - VALUTAZIONE dell'INTERAZIONE tra AuNPs e OLIGOANIONI	169
3.4.5.1 - Calcolo coefficiente di estinzione molare di cumarina 343 N-propilammide	169
3.4.5.2 - Calcolo concentrazione peptidi fluorescenti	170
3.4.5.3 - Titolazione fluorimetrica di AuNPs con oligoanioni fluorescenti	171
3.4.5.4 - Contro-titolazione con ATP di AuNPs sature di oligoanioni fluorescenti	171
3.4.6 - ANALISI AuNPs tramite FRET	172
3.4.6.1 - Titolazione AuNPs-TACN(Zn^{2+}) con TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343	172
3.4.6.2 - Titolazione AuNPs-NH ₄ ⁺ con TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343	172
3.4.6.3 - Fluorescenza di TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343 in soluzione	172
3.4.6.4 - Fluorescenza di TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343 su AuNPs-TACN(Zn^{2+})	173
3.4.6.5 - FRET su AuNPs-TACN(Zn^{2+}) con diversi rapporti di fluorescenti	173
3.4.6.6 - FRET su AuNPs-TACN(Zn^{2+}) in eccesso di ATP	173
3.4.6.7 - FRET su AuNPs-NH ₄ ⁺	174
4 - INTERAZIONE tra la PROTEINA SCCA e un COMPLESSO MULTIVALENTE FORMATO da NANOPARTICELLE d'ORO e preS1	175
4.1 - INTRODUZIONE	175
4.2 - RISULTATI e DISCUSSIONE	175
4.2.1 - SINTESI del PEPTIDE preS1 (21-47)	175
4.2.1.1 - Scelta dell'ancora anionica	176
4.2.1.2 - Sintesi di Mal-Cys-preS1 e di TriAsp-Mal-Cys-preS1	178
4.2.2 - VALUTAZIONE dell'INTERAZIONE tra PEPTIDI 82-84 e MONOSTRATO CATIONICO180	
4.2.2.1 - Titolazione diretta della capacità di legame del monostrato cationico	180
4.2.2.2 - Valutazione indiretta di legame per inibizione della capacità idrolitica del TACN(Zn^{2+})	181
4.2.2.3 - Valutazione indiretta di legame per spiazzamento di F-ATP dal monostrato	184
4.2.3 - INTERAZIONE di SCCA con i COMPLESSI di preS1-AuNPs e preS1-TriAsp-AuNPs	189
4.2.3.1 - Valutazione interazioni AuNPs-TACN(Zn^{2+}) e oligoanioni in micropiastre	190
4.2.3.2 - Interazione SCCA con TriAsp-preS1 e preS1	191
4.2.4 - ANALISI NON FLUORESCENTI delle INTERAZIONI preS1-SCCA	194
4.2.4.1 - Analisi tramite Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)	194
4.2.4.2 - Analisi tramite Dynamic Light Scattering (DLS)	195

4.3 - CONCLUSIONI	197
4.4 - PARTE SPERIMENTALE	198
4.4.1 - MATERIALI e STRUMENTAZIONE	198
4.4.1.1 - Materiale per sintesi su fase solida	198
4.4.1.2 - Analisi SPR con Biacore	198
4.4.1.3 - Tampone HBS-EP	198
4.4.1.4 - Analisi DLS	198
4.4.2 - METODOLOGIE GENERALI	199
4.4.2.1 - Soluzioni madre del substrato HPNP	199
4.4.2.2 - Condizioni per gli esperimenti cinetici realizzati con HPNP	199
4.4.3 - SCELTA dell'ANCORA ANIONICA	199
4.4.3.1 - Sintesi TriAsp-Triptofano	199
4.4.3.2 - Sintesi Tyr(OPO ₃ ⁽²⁻⁾)-Triptofano	200
4.4.3.3 - Sintesi DiTyr(OPO ₃ ⁽²⁻⁾)-Triptofano	201
4.4.3.4 - Confronto della capacità di legame tra fosfati e carbossilati	202
4.4.4 - SINTESI del PEPTIDE preS1 (21-47)	203
4.4.4.1 - Sintesi manuale di Mal-Cys-preS1	203
4.4.4.2 - Sintesi manuale di TriAsp-Mal-Cys-preS1	203
4.4.5 - INTERAZIONI IONICHE SUPERFICIALI di AuNPs-TACN(Zn ²⁺) e preS1	204
4.4.5.1 - Titolazione AuNPs-TACN(Zn ²⁺) con preS1	204
4.4.5.2 - Inibizione della capacità idrolitica del TACN(Zn ²⁺)	204
4.4.5.3 - Titolazione AuNPs-TACN(Zn ²⁺) con F-ATP	205
4.4.5.4 - Prove di spiazzamento di F-ATP da AuNPs-TACN(Zn ²⁺)	205
4.4.5.5 - Spiazzamento di F-ATP con TriAsp-preS1 e preS1	205
4.4.6 - INTERAZIONE di SCCA con preS1 e AuNPs	206
4.4.6.1 - Titolazione di AuNPs-TACN(Zn ²⁺) in micropiastra - F-ATP	206
4.4.6.2 - Spiazzamento di F-ATP con oligoanioni	206
4.4.6.3 - Spiazzamento F-ATP con TriAsp-preS1 e preS1 in presenza di SCCA	206
4.4.7 - ANALISI NON FLUORESCENTI delle INTERAZIONI preS1-SCCA	206
4.4.7.1 - Analisi tramite Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)	206
4.4.7.2 - Analisi tramite Dynamic Light Scattering (DLS)	207

5 - BIBLIOGRAFIA	208
RIASSUNTO	215
SUMMARY	218

1 - INTRODUZIONE

Il presente progetto di dottorato si inquadra nell'ambito del Programma Operativo F.S.E., all'interno del progetto "creazione di professionalità elevate di livello dottorale nelle aree delle scienze di base, dell'ingegneria, delle scienze della vita e delle scienze umane e sociali, Asse Capitale Umano" finanziato dalla Regione Veneto con fondi dell'Unione Europea.

Questo progetto si inserisce in un linea di ricerca più ampia, la nanomedicina, che ha come scopo generale quello di sviluppare nanosistemi che siano in grado di interagire in maniera selettiva con cellule tumorali allo scopo di rilevarne la presenza (uso diagnostico) e di portare alla loro morte (uso farmacologico). La comunicazione tra cellule, tra proteine e cellule e tra cellule e farmaci, per essere elevata e selettiva, richiede di avvenire mediante una serie d'interazioni intrinsecamente deboli ma che complessivamente diventino forti in seguito alla natura multivalente della superficie cellulare. Per questa ragione nanosistemi basati su nanoparticelle di oro, di silice, o di ossidi di ferro come pure dendrimeri e nanoparticelle polimeriche hanno un grande potenzialità come sistemi multivalenti per impiego diagnostico e terapeutico. La ragione di ciò sta nel fatto che tutti questi sistemi possono essere facilmente funzionalizzati con diverse unità costituite da leganti o elementi adatti al riconoscimento e possono, quindi, essere trasformati in entità multivalenti.

Verso la metà degli anni '90, infatti, si è cominciato a comprendere che l'approccio covalente aveva delle limitazioni nella realizzazione di sistemi complessi confrontabili a quelli presenti nei sistemi biologici. L'approccio covalente alla realizzazione di tali sistemi vede aumentare la complessità sintetica proporzionalmente col numero di gruppi funzionali che si vogliono introdurre. Benché le proprietà di tali sistemi possano essere così diverse da quelle dei corrispondenti monomeri da considerare accettabili i costi sintetici alla loro realizzazione, spesse volte l'approccio covalente è del tutto impossibile. Un tentativo di ovviare a questo inconveniente è costituito dall'utilizzo di polimeri funzionali, che possono essere ottenuti sia attraverso la polimerizzazione diretta di monomeri funzionali, sia per successiva funzionalizzazione di opportuni polimeri preformati ("Synzymes"¹). Questi sistemi risultano essere polidispersi e con una scarsa strutturazione, anche nel caso si usino tecniche di "impressione molecolare" ("Imprinted Polymers"²). Eccezione sono i dendrimeri, specie monodisperse con un'accentuata tendenza ad essere globulari, la cui sintesi cresce in difficoltà con la

generazione. I limiti della chimica di tipo covalente sono evidenti, per questo l'attenzione è stata rivolta ad approcci di tipo supramolecolare, dove si sfruttano interazioni non covalenti per organizzare la struttura nello spazio.

1.1 CHIMICA SUPRAMOLECOLARE

La chimica supramolecolare si basa sulla preparazione di strutture complesse usando sub-unità semplici che si legano tra loro tramite legami di tipo non covalente. Grazie a questi legami, singolarmente molto più deboli rispetto a un legame covalente, si possono ottenere sistemi relativamente complessi costituiti tramite un processo di autoassemblaggio. Si possono così ottenere recettori molecolari sintetici,³ sistemi efficienti nel riconoscimento molecolare⁴ e catalizzatori a modelli enzimatici⁵. Appare chiaro che un approccio di tipo supramolecolare non può prescindere dal controllo di questa "aggregazione" che, in genere, deriva da legami a idrogeno o di coordinazione, privi di un vero processo di riconoscimento. La necessità di imporre un riconoscimento selettivo ha portato allo sviluppo di alcuni degli strumenti tipici della chimica supramolecolare quali i templati (stampi molecolari) e le piattaforme. Un template è, in genere, una specie che introduce un elemento di controllo conformazionale e di rigidità nella struttura in cui è inserito. Una piattaforma ha, invece, la particolarità di poter ospitare più sub-unità portandole in contatto le une con le altre. In questo modo si ottengono oggetti complessi in cui è potenzialmente possibile sfruttare interazioni che altrimenti non sarebbero osservabili (figura 1.1).

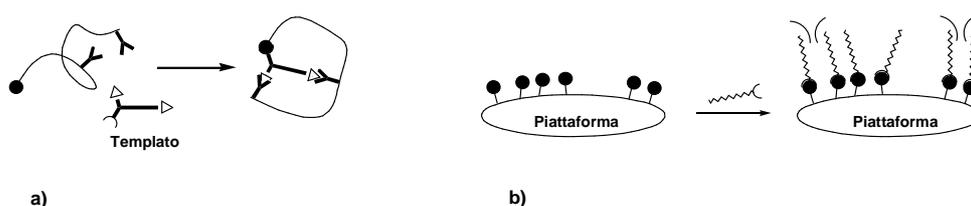


Figura 1.1: l'uso di un template a) introduce un vincolo che irrigidisce una struttura molecolare conferendole proprietà che altrimenti non avrebbe. Una piattaforma b) può ospitare più sub-unità, permettendo interazioni tra le singole unità che altrimenti non sarebbero presenti.

1.1.1 - AUTO-ASSEMBLAGGIO di SUPRAMOLECOLE

L'auto-assemblaggio è che il processo attraverso il quale un sistema supramolecolare costruisce se stesso a partire dai suoi componenti elementari⁶ Tra tutti i processi che portano alla costruzione di oggetti supramolecolari, quelli di auto-assemblaggio sono probabilmente i più affascinanti e i più diffusi nei sistemi viventi; ne sono una

manifestazione la costruzione dei capsidi virali, delle membrane cellulari, dei ribosomi. Il riconoscimento tra due filamenti complementari di DNA deriva anch'esso da un processo di auto-assemblaggio il quale è un processo dinamico reversibile; questo garantisce l'esistenza di uno stato di equilibrio termodinamico tra la supramolecola e i suoi costituenti. Una caratteristica importante e virtualmente unica dei processi di auto-assemblaggio è che essi possono generare oggetti con dimensioni notevoli, più grandi rispetto a quelli ottenibili tramite la via covalente. Questa particolarità rende l'auto-assemblaggio uno strumento appetibile per le applicazioni nanotecnologiche e per la fabbricazione di nanostrutture.

1.1.2 - SUPRAMOLECOLE a CONFRONTO

Le nanoparticelle d'oro protette da un monostrato di leganti (altresì chiamate MPCs, dall'inglese *Monolayer Protected Clusters*) sono una delle strutture supramolecolari sui cui si è focalizzata l'attenzione di molti gruppi di ricerca. Tali nanoparticelle sono oggetti inorganici di dimensioni nanometriche (2-10 nm) che hanno la speciale caratteristica di poter essere ricoperte con una grande varietà di molecole organiche, con un processo molto semplice che necessita del solo mescolamento dei componenti. Le AuMPCs sono costituite da un nanoparticelle composte da atomi d'oro ricoperti da un monostrato di molecole organiche (leganti) che sono ancorate sulla loro superficie. Ciascuno di questi leganti può essere opportunamente funzionalizzato con diversi gruppi funzionali. Molto dell'interesse suscitato dagli MPCs deriva dal fatto che questi composti sono nanostrutture polivalenti auto-assemblate. Le loro proprietà li pongono in diretto confronto con altre supramolecole dello stesso tipo, quali aggregati di molecole anfifiliche come micelle e vescicole, e con macromolecole covalenti polivalenti, ossia dendrimeri e polimeri funzionali.

1.1.2.1 - Differenze tra Nanoparticelle d'Oro e Micelle

Le **micelle** sono aggregati di molecole anfifiliche che si formano spontaneamente in soluzione acquosa per interazioni idrofobiche tra i "monomeri" costituenti (in solvente apolare per interazioni polari si ottengono *micelle inverse*). Questi aggregati sono specie flessionali, in quanto la mobilità dei monomeri è molto elevata. Per loro natura, le micelle posseggono un "core" interno idrofobico a causa della presenza delle catene alchiliche dei tensioattivi, e una superficie esterna idrofilica che contiene le teste polari dei monomeri e degli eventuali controioni. In chimica supramolecolare hanno trovato notevole impiego per lo sviluppo di modelli enzimatici: in catalisi micellare si osserva

infatti un aumento della reattività, il quale è legato all'elevata concentrazione di specie che si realizza nella pseudo-fase della micella piuttosto che ad una maggiore reattività intrinseca del sistema micellare.

Tra questi aggregati di tensioattivi e MPCs la differenza sostanziale sta nella natura del processo di auto-assemblaggio; nel primo caso la forza trainante è la natura idrofobica dell'interazione tra i componenti della supramolecola, nel secondo l'instaurazione di forti interazioni oro-zolfo. Questa differenza è di notevole importanza: gli aggregati di tensioattivi non possono esistere in solventi che non permettano l'instaurarsi d'interazioni idrofobiche, mentre gli MPCs possono esistere in qualunque solvente, compatibilmente con la natura del loro monostato, in particolare del gruppo terminale esposto sulla loro superficie. Una seconda osservazione importante è che gli aggregati di tensioattivi come le micelle esistono solamente quando la concentrazione di tensioattivo in soluzione supera la cosiddetta concentrazione micellare critica (CMC), valore alla quale i tensioattivi in soluzione collassano nella pseudo-fase della micella. Questa caratteristica è estranea agli MPCs: non è infatti necessaria una concentrazione critica perché gli aggregati possano esistere in soluzione. Un'altra importante differenza tra gli MPCs e le micelle è il fatto che nei primi l'equilibrio di dissociazione oro-tiolo è su una scala temporale molto più lenta rispetto agli equilibri di dissociazione spontanea dei monomeri, mentre nelle seconde quest'equilibrio è molto rapido.

1.1.2.2 - Differenze tra Nanoparticelle d'Oro e Liposomi

Le vescicole, o **liposomi**, sono aggregati di molecole anfifiliche esattamente alla pari delle micelle, con la differenza che questi anfifili sono in particolare lipidi che si auto-assemblano formando doppi strati chiusi su loro stessi. La membrana lipidica così formata racchiude un piccolo volume di soluzione acquosa, tanto da far considerare questi sistemi delle membrane cellulari sintetiche a tutti gli effetti. I liposomi hanno trovato un largo impiego in *Drug-Delivery*,⁷ proprio per la loro particolarità di racchiudere un piccolo volume di soluzione separata dalla fase liquida esterna. Possono essere funzionalizzati introducendo lipidi funzionali nella membrana, approccio che ha portato alla preparazione di sistemi polivalenti impiegati, ad esempio, nello studio dell'interazione con il DNA,⁸ nella trasfezione cellulare⁹ e nell'inibizione dell'e-selettina¹⁰ (una delle adesine responsabili dell'adesione cellulare). La possibilità di introdurre gruppi funzionali nei liposomi è in stretta analogia con quanto accade con gli

MPCs, con la grossa differenza che le vescicole possono sopravvivere solamente in soluzione acquosa restrizione non applicata agli MPCs stessi.

1.1.2.3 - Differenze tra Nanoparticelle d'Oro e Dendrimeri - Polimeri Funzionali

Se le micelle e i liposomi sono oggetti auto-assemblati per interazioni idrofobiche, esistono delle macromolecole covalenti che possono essere paragonate agli MPCs: i dendrimeri e i polimeri funzionali.

I **dendrimeri** presentano un'elevata concentrazione di gruppi funzionali sulla loro superficie esterna ed un interno relativamente idrofobico, caratteristica sfruttata per avere riconoscimento e catalisi¹¹. In particolare, i dendrimeri possono portare gruppi cataliticamente attivi sia in posizione centrale (*core*), sia in posizione distale, caso questo in cui l'analogia con gli MPCs è più stretta. Aspetto caratteristico dei dendrimeri, correlato in particolare alla catalisi, è la loro capacità di porre i gruppi funzionali molto vicini tra loro. Questo ha permesso di evidenziare fenomeni di cooperatività tra gruppi legati ai rami del dendrimero (effetto dendrimerico positivo). Una prova di questo effetto è stata riportata da Breinbauer e Jacobsen¹², che ottennero la risoluzione cinetica di epossidi terminali utilizzando metallodendrimeri di tipo PAMAM-Co(Salen), proponendo uno schema meccanicistico in cui un complesso Co(Salen) coordina l'eossido e un secondo adiacente attiva il nucleofilo che attacca l'anello ossiranico. Il principale vantaggio nell'utilizzo degli MPCs rispetto ai dendrimeri è la loro facilità di sintesi e funzionalizzazione, derivante dalla loro natura auto-assemblata.

Ulteriore paragone può essere fatto tra gli MPCs e i **polimeri funzionali**, composti utilizzati come modelli enzimatici grazie alla possibilità di introdurre, nei loro microambienti poco solvatati, gruppi cataliticamente attivi. Quest'approccio ha visto la preparazione di polimeri e copolimeri funzionalizzati con gruppi catalitici (*Synzymes*), oppure la preparazione di polimeri con introdotto un sito attivo preorganizzato (*Imprinted Polymers*). La differenza sostanziale tra i "polimeri catalitici" in senso lato e gli MPCs sta nella morfologia: mentre gli MPCs offrono una superficie funzionale, capace di fungere da eso-recettore polivalente, un polimero è una specie con una morfologia non ben definita. In casi specifici i gruppi funzionali possono trovarsi entro una cavità ("*Imprinted Polymers*"²), proprietà che li trasforma in degli endo-recettori, nell'altro possono trovarsi distribuiti in modo casuale lungo il polimero ("*Synzymes*"¹).

La dimensione degli MPCs è abbastanza simile a quella di micelle e dendrimeri, indicativamente nell'ordine di 2-10 nm; si tratta quindi di oggetti di dimensione

notevole se paragonate a molecole come calixareni e ciclodestrine che trovano comunemente impiego in chimica supramolecolare. La superficie e il volume molecolare degli MPCs sono paragonabili a quelli di molte proteine globulari, ed è quindi naturale pensare che alcune delle proprietà delle proteine possano essere mimate dagli MPCs stessi.

Caratteristiche/Specie	Micelle	Vescicole	Dendrimeri	Polimeri	MPCs
Forma (dimensione)	Sferiche (5-10)	Sferiche (20→500)	Globulari (5-10)	Globulari (nessuna limitazione)	Sferici (5-10)
Sintesi	Auto-assemblaggio per interazioni idrofobiche	Auto-assemblaggio per interazioni idrofobiche	Sintesi covalente convergente o divergente	Sintesi covalente	Auto-assemblaggio per interazioni oro-zolfo
Ambiente	Acquoso	Acquoso	Nessuna limitazione	Nessuna limitazione	Nessuna limitazione

Tabella 1.1: Proprietà di supramolecole e macromolecole polivalenti.

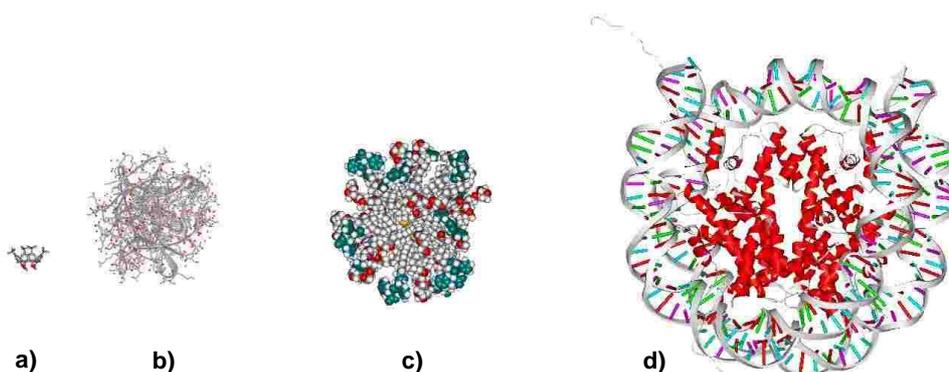


Figura 1.2: Rappresentazione in scala di: a) un calix[4]arene, b) una molecola di g-chimotripsina, c) un tipico MPC, d) un frammento di DNA avvolto su un istone. E' facilmente visibile come gli MPC siano oggetti con dimensioni del tutto paragonabili a quelle di macromolecole biologiche.

1.1.3 - NANOPARTICELLE (GENERALE)

L'auto-assemblaggio è una strategia interessante per la preparazione di sistemi supramolecolari, utilizzabile per la preparazione di supramolecole così come delle

piattaforme sulle quali andare a costruire tali supramolecole. Quest'approccio è interessante perché permette di ottenere piattaforme di complessità notevole con uno sforzo sintetico relativamente piccolo, e una nanoparticella non rappresenta altro che un supporto solubile "nanoscopico" sul quale operare delle modificazioni chimiche¹³. In questo modo si ottengono oggetti di natura ibrida, con proprietà nuove e l'enorme vantaggio della semplicità sintetica e di funzionalizzazione.

Nel campo delle nanoparticelle c'è poi grande "diversità chimica", essendo note nanoparticelle di svariati materiali quali silice¹⁴, ossidi metallici¹⁵, solfuri metallici¹⁶ e metalli a stato di ossidazione zero¹⁷. La natura del materiale costituente non è affatto trascurabile, a causa dei fenomeni di confinamento quantico¹⁸ che insorgono quando esso raggiunge dimensioni nanoscopiche, con mutamento delle sue proprietà rispetto all'analogo materiale in forma non nanoparticellare. Esistono procedure ben definite per la sintesi di nanoparticelle metalliche, particolarmente di "metalli da conio" e di metalli nobili (Ag, Cu, Au, Pd, Pt)¹⁹, così come ne esistono per la preparazione di nanoparticelle di seleniuri e tellururi metallici (Cd, Zn)²⁰ con interessanti proprietà di semiconduttori, e procedure per la preparazione di particelle magnetiche²¹ (γ -Fe₂O₃).

I composti a cluster di elementi metallici sono specie prevalentemente molecolari e di bassa nuclearità, con legami covalenti metallo-metallo, mentre i colloidali sono sospensioni di particelle metalliche finemente suddivise, specie "nude" composte solamente da atomi metallici più gli eventuali ioni adsorbiti sulla superficie esterna dell'aggregato; sono questi ioni adsorbiti a generare la repulsione elettrostatica interparticella che è alla base della meta-stabilità delle soluzioni colloidali. Essendo le nanoparticelle dei nanocomposti costituiti da aggregati di atomi metallici con nuclearità variabile da alcune decine a diverse migliaia, vanno a colmare lo spazio esistente tra i cluster di bassa nuclearità e i colloidali veri e propri, come illustrato in figura 1.3.

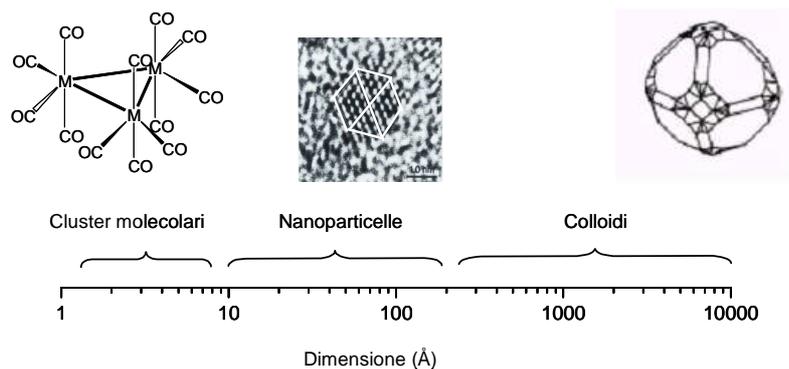


Figura 1.3: Rappresentazione in scala delle dimensioni tipiche di nanoparticelle e colloidi. E' evidente che i cluster molecolari propriamente detti, sono oggetti completamente diversi dai cluster di elevata nuclearità che costituiscono le nanoparticelle.

Esse devono infatti essere considerate come dei cluster metallici di elevata nuclearità, con proprietà comuni sia ai cluster metallici propriamente detti che ai colloidi. Differenze, nelle nanoparticelle, sono la presenza dei “leganti” e le proprietà derivanti dalla presenza di un aggregato esteso di atomi metallici, ma a parte questo le nanoparticelle mantengono una natura sostanzialmente molecolare.

1.1.3.1 - Leganti delle Nanoparticelle

Lo scopo principale dei leganti organici è quello di isolare le nanoparticelle le une dalle altre prevenendo il contatto reciproco ed evitando in tal modo la loro aggregazione irreversibile. Tali leganti producono una sorta di “stabilizzazione sterica” proteggendole verso agenti esterni, con interazioni con le nanoparticelle di natura elettrostatica oppure covalente. Possono essere leganti monomerici o polimerici, specie neutre o cariche, e devono costituire, per ragioni geometriche, uno strato più o meno esteso che circonda la superficie esterna del nucleo della nanoparticella. I leganti che danno singole interazioni covalenti producono gusci protettivi stabili, i leganti che danno interazioni covalenti multiple producono reti che collegano più nanoparticelle diverse²², i leganti che danno interazioni ioniche deboli creano gusci protettivi “dinamici” e potenzialmente poco stabili mentre i polimeri carichi o neutri formano una sorta di matrice in cui le nanoparticelle sono disperse. E' stato recentemente dimostrato da Carotenuto e coll.²³ che è possibile rimuovere lo stabilizzante polimerico per interazione delle nanoparticelle con specie che formano gusci protettivi più stabili, e sono inoltre preparabili nanoparticelle metalliche in presenza di dendrimeri²⁴.

Molti leganti delle nanoparticelle metalliche sono specie solforate o fosforate quali tioli, disolfuri, tioeteri e fosfine, note per la loro capacità di stabilizzare i metalli nei bassi stati di ossidazione. Esistono però esempi di nanoparticelle metalliche stabilizzate da ioni ammonio quaternari²⁵ o nanoparticelle di calcogenuri metallici stabilizzate da fosfinossidi.²⁶ Per “nanoparticella passivata” si intende un oggetto costituito da un nucleo centrale in cui è concentrata quasi tutta la sua massa, circondato da uno strato “soffice” più o meno compatto costituito da leganti organici.

1.1.3.2 - Nanoparticelle come Sistemi Polivalenti

Molto interessante è l'idea di progettare e realizzare oggetti polivalenti, capaci di dare forti interazioni con molecole biologiche²⁷. Le interazioni di legame multiplo tra leganti multivalenti e recettori multivalenti hanno mostrato di essere caratterizzate da costanti di affinità molto elevate, fino a molti ordini di grandezza superiori alle analoghe interazioni con leganti monovalenti. La multivalenza è uno stratagemma che la natura ha utilizzato per creare interazioni forti usando legami monotopici deboli: anche se non esiste un'idea chiara sull'origine dell'aumentata affinità nei sistemi polivalenti rispetto agli analoghi monovalenti, è evidente tali sistemi si basano sull'organizzazione di più “monomeri” all'interno della stessa struttura. Una grande porzione dei sistemi polivalenti riportati in letteratura è di natura polimerica, come liposomi funzionali usati come leganti polivalenti e come oligomeri funzionali. Una nanoparticella funzionale non rappresenta altro che un'entità fisica polivalente, cioè potenzialmente capace di dare interazioni multiple con recettori politopici.

1.2 - SISTEMI BIOMIMETICI MULTIVALENTI

Se si analizzano da un punto di vista chimico le strutture e i processi presenti negli organismi viventi, non si può non rimanere affascinati dalla loro complessità e dalla loro efficacia: essi avvengono in un ambiente molto complesso, per la presenza di un gran numero di specie diverse. Le interazioni tra cellule, proteine e altre molecole avvengono tuttavia in maniera efficace e selettiva, con meccanismi molto articolati e regolabili. Gli enzimi poi catalizzano reazioni complesse con un grado di efficienza e selettività molto superiore rispetto ai corrispondenti processi “artificiali”, rendendo interessante studiarne i meccanismi allo scopo di comprenderli, di intervenire su di essi e di trasferire alcune loro qualità ai processi di sintesi “classici”.

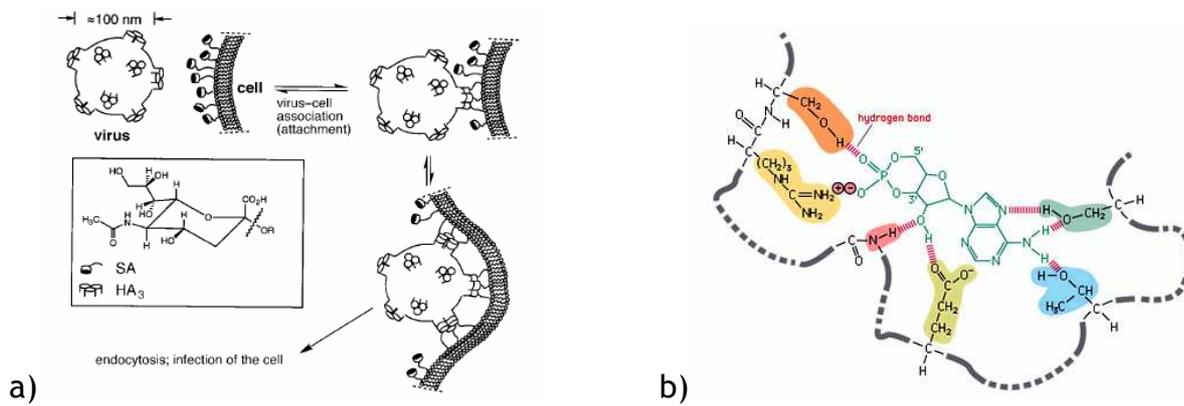


Figura 1.4: a) Interazione del virus dell'influenza con la superficie cellulare; b) Sito attivo dell'enzima adenil-ciclastasi.

1.2.1 - MULTIVALENZA e COOPERATIVITÀ

Una caratteristica dei sistemi naturali ed è la multivalenza, cioè la presenza di un gran numero di gruppi funzionali che agiscono contemporaneamente; al posto di una singola interazione forte vi è la somma di numerose interazioni deboli, le quali possono così avere un effetto maggiore, oltre ad essere più selettive e modulabili. Questi gruppi possono essere uguali oppure di tipo diverso, uniti tra loro per dare interazioni diversificate e selettive. Altra importante qualità che si riscontra spesso in sistemi di questo tipo è la cooperatività, per cui l'effetto complessivo che si ottiene è superiore alla semplice somma dei singoli contributi dei vari elementi, con effetto sinergico tra le varie unità. Dal punto di vista energetico una reale cooperatività si può definire quando la diminuzione di energia libera nel processo è superiore alla somma delle energie relative alle singole interazioni^{109,110}. Esempi di multivalenza e cooperatività si trovano nell'interazione tra i virus e le superfici di cellule, grazie all'interazione multipla tra i gruppi presenti sulle due strutture (figura 1.5 a). Importanti interazioni biologiche sono mediate da carboidrati, interazioni con particolari proteine sono implicati nel sistema immunitario, in infezioni virali, nella crescita cellulare e nei tumori. Queste interazioni multivalenti presentano caratteristiche cooperative: la forza del legame è aumentata rispetto al semplice effetto additivo, per quello che viene definito l'effetto cluster dei poliglicosidi¹¹¹. La maggiore affinità evidenziata nell'interazione multivalente è da attribuirsi a un effetto numerico, per cui si ha un'elevata concentrazione locale di legante, e a un effetto chelante, che diminuisce la probabilità di distacco del legante; vi è anche una stabilizzazione sterica, in quanto le dimensioni del legante multivalente prevengono l'interazione con altri leganti¹¹².

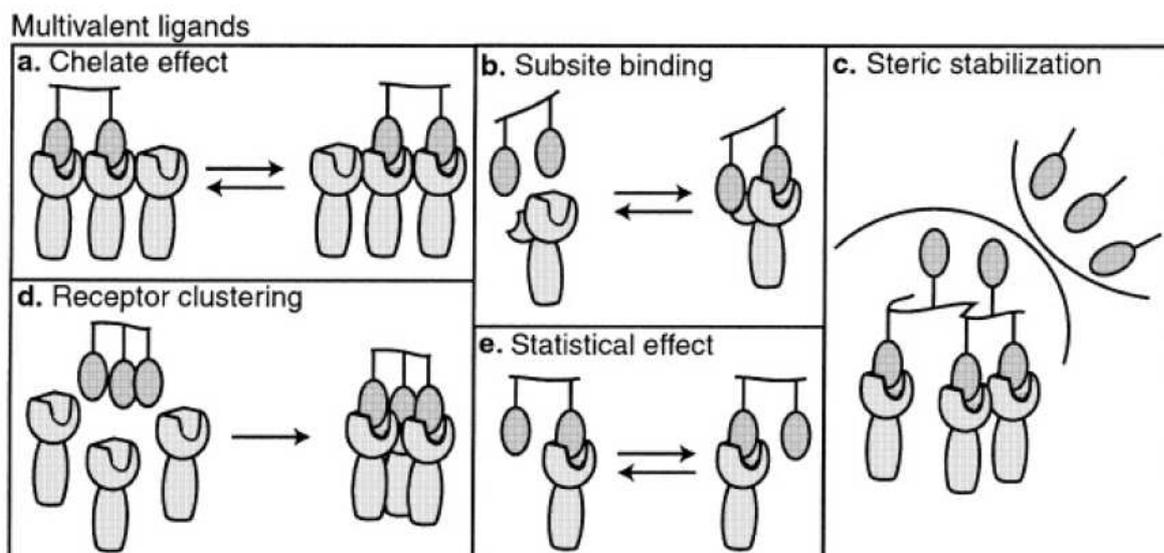


Figura 1.5: Meccanismi di binding multivalente.

La multivalenza può aumentare, oltre all'affinità, anche la selettività di un'interazione: aumentando l'alta affinità per il legante specifico e la bassa affinità per quello non specifico si aumenta il rapporto tra le due costanti, ottenendo maggiore specificità¹¹³. Nella catalisi enzimatica queste proprietà sono fondamentali, alta reattività e selettività sono dovute all'interazione di più gruppi funzionali, spesso diversi tra loro, presenti nel sito attivo dell'enzima, ciascuno dei quali fornisce un contributo al legame col substrato e/o alla catalisi (figura 1.5 b).

1.2.2 - SISTEMI MULTIVALENTI ARTIFICIALI

Strutture che imitino le caratteristiche di multivalenza cooperatività dei sistemi naturali sono studiate perché possano interagire da leganti con le biomolecole oppure come catalizzatori che sfruttino le peculiarità degli enzimi naturali; così potrebbero intervenire negli stessi meccanismi biochimici con applicazioni nel campo terapeutico o diagnostico^{114,115,116,117}. Si tratta di strutture con legate un numero variabile di unità funzionali, quali unità di legame, gruppi attivi cataliticamente, ecc.. La sintesi avviene a partire da una struttura multivalente preformata (piattaforma, la cui scelta può avere effetto sull'attività del sistema) con opportuni gruppi che leghino per reazione di coupling i gruppi desiderati, oppure per autoassemblaggio delle unità funzionali (figura 1.6). Sono studiate strutture multivalenti come polimeri, nanoparticelle, dendrimeri, micelle, liposomi, le quali presentano un'ampia gamma di dimensioni e valenza. Tra tutti i sistemi multivalenti, le nanoparticelle d'oro sono particolarmente utili per la preparazione di superfici funzionali polivalenti, grazie alla facilità con la quale è

possibile auto-assemblare un monostrato di molecole organiche attorno al nucleo metallico, ma anche grazie alla possibilità di controllare la dimensione dei nuclei, la composizione della copertura superficiale, la stabilità nel tempo. Grazie alla stabilità del legame S-Au, tale monostrato si dispone in maniera impaccata esponendo sulla superficie i propri gruppi funzionali terminali, ottenendo un nanosistema portante molteplici gruppi funzionali..

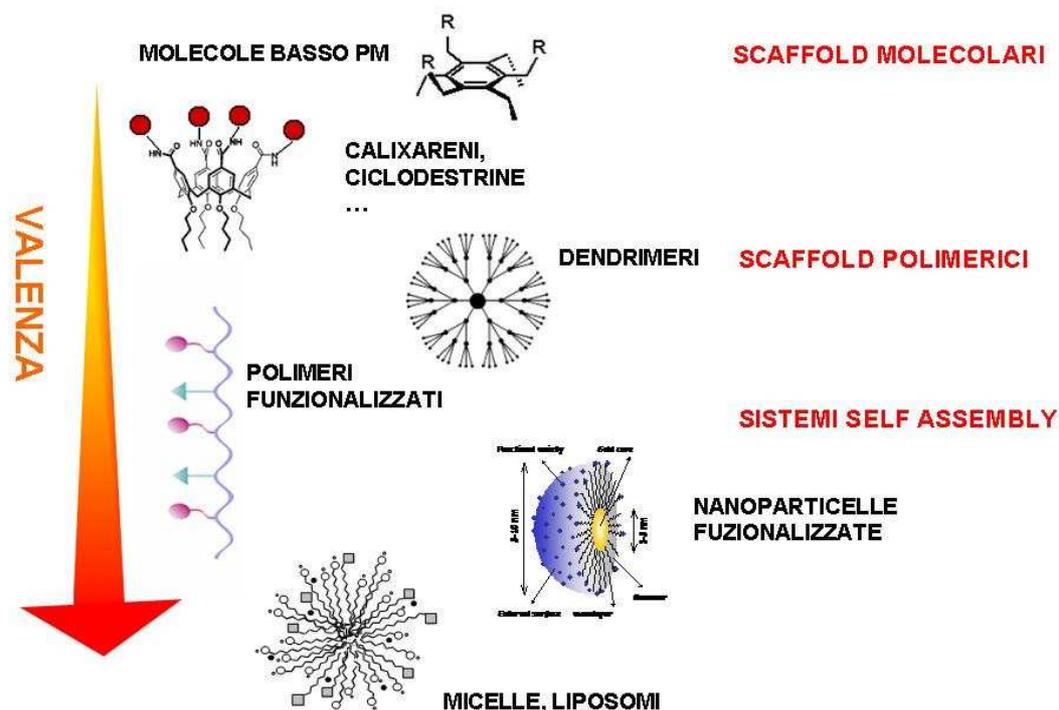


Figura 1.6: Sistemi multivalenti di dimensioni crescenti.

1.2.3 - CATALIZZATORI MULTIVALENTI

Come già detto, la multivalenza è importante anche per la catalisi; per migliorare l'attività di catalizzatori si possono infatti unire insieme più unità catalitiche su di una struttura multivalente. Bisogna però porre attenzione al fatto che non tutti i catalizzatori multivalenti sono anche cooperativi: questo accade solo se l'attività del catalizzatore multivalente è superiore alla somma delle attività di un ugual numero di componenti separati. L'aumento di reattività deve essere quindi dovuto non solo ad effetti di concentrazione locale, ma all'instaurarsi di un meccanismo cooperativo in cui i gruppi hanno un ruolo diverso da quello che si riscontra in un meccanismo non cooperativo¹¹⁸ (variazione non lineare dell'attività catalitica al variare delle componenti funzionali, figura 1.7).

Una catalisi cooperativa si ha se la reazione avviene con un meccanismo che preveda l'interazione di più gruppi catalitici, i quali devono essere posti vicini tra loro in modo da interagire in maniera ottimale. Nell'idrolisi di esteri carbossilici catalizzata da gruppi imidazolici, l'imidazolo può agire sia da nucleofilo e sia tramite catalisi acido-base generale.

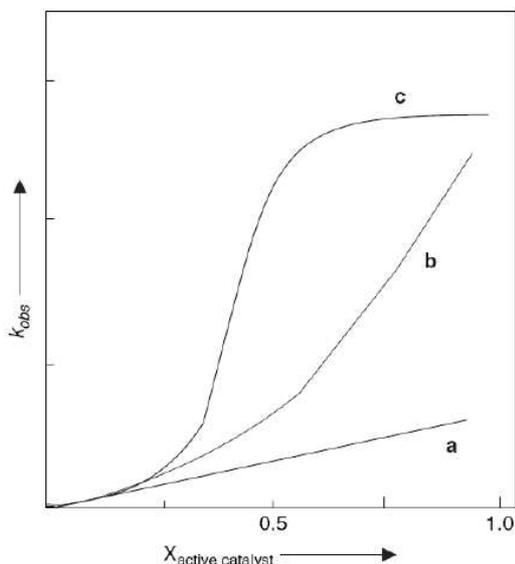


Figura 1.7: Profilo cinetico di un catalizzatore multivalente al variare della frazione molare di componente attivo: a) non cooperativo; b)-c) cooperativo. Nel caso c la massima attività viene raggiunta per una frazione molare inferiore ad 1¹¹⁸.

Funzionalizzando una piattaforma tripodale con una miscela di imidazolo e di un'ammina terziaria in diverse combinazioni¹¹⁸ e misurando la costante catalitica per l'idrolisi di p-nitrofenilacetato, si è visto che l'aumento è rettilineo con l'aumento di percentuale di imidazolo. In questo sistema la cooperatività è dunque assente, poiché i gruppi non riescono a trovarsi abbastanza vicini tra loro.

Inserendo invece dei tioli funzionalizzati con gruppi imidazolici nel monostrato organico di nanoparticelle d'oro si è ottenuta un'attività catalitica (a vari pH) per l'idrolisi del 2,4-dinitrofenilacetato di 30 volte maggiore rispetto a quella del monomero isolato¹¹⁹, con un andamento a massimo per il sistema multivalente: in questo caso quindi si ha cooperatività positiva tra i gruppi imidazolici.

1.2.4 - IDROLISI di DIESTERI FOSFORICI

L'uso di sistemi multivalenti come catalizzatori permette di ottenere elevati incrementi di reattività quando le reazioni presentano un meccanismo di tipo cooperativo. Per studiare tali reazioni sono stati sfruttati, nel nostro gruppo di ricerca, i diesteri

dell'acido fosforico, classe di composti biologicamente importanti (DNA, RNA, ATP, fosfolipidi, etc...). Queste molecole presentano una certa difficoltà nell'essere idrolizzate, a causa anche alla presenza di una carica negativa repulsiva nei confronti di un attacco nucleofilo al carbonile. Questa stabilità è fondamentale per il DNA, che ha il compito di immagazzinare l'informazione genetica; il suo legame estereo ha un tempo di emivita a pH 7 nell'ordine dei 10^{11} anni. L'RNA è anch'esso molto stabile, ma la sua velocità d'idrolisi è superiore di circa 10^9 volte rispetto a quella del DNA, a causa di un diverso meccanismo di idrolisi: nell'RNA infatti la presenza dell'idrossile in posizione 2' permette un attacco intramolecolare al fosfato (figura 1.8), e la conseguente minore stabilità rispecchia il ruolo biologico di trasmissione dell'informazione genetica, terminato il quale la molecola viene scissa e metabolizzata.

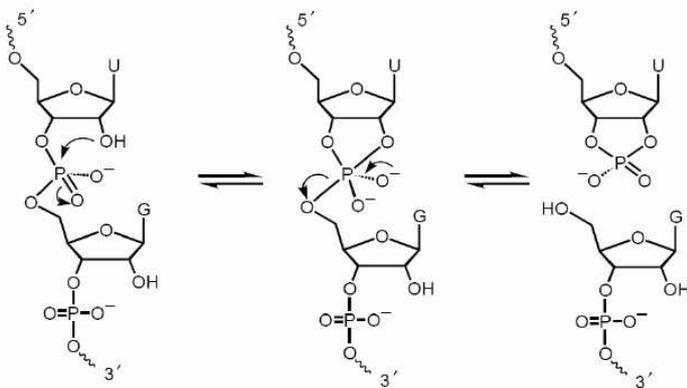


Figura 1.8: Meccanismo d'idrolisi intramolecolare dell'RNA.

Esistono però numerosi enzimi in grado di catalizzare l'idrolisi in modo veloce, a causa della presenza nel sito attivo di due o più ioni metallici vicini tra loro che agiscono in modo cooperativo nel meccanismo catalitico (figura 1.9)¹²⁰.

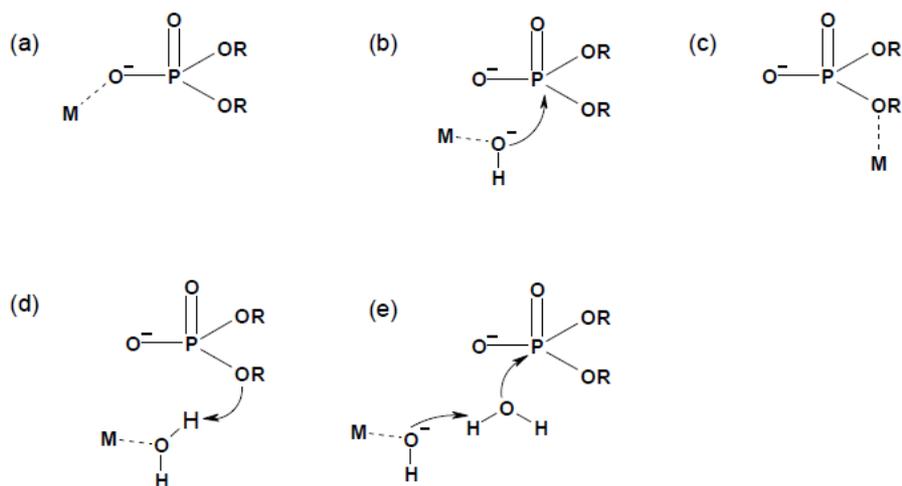


Figura 1.9: Ioni metallici nell'accelerazione dell'idrolisi di esteri fosforici: a) coordinazione dell'ossigeno; b) attivazione nucleofila; c) attivazione gruppo uscente; d) catalisi basica generale; e) catalisi acida generale.

Quando due ioni metallici si trovano vicini (distanza tra 3 e 5 Å) essi possono agire in maniera simultanea con un'accelerazione della reazione molto forte che può arrivare fino a 10^{18} volte¹²¹. Nei sistemi artificiali gli ioni metallici devono quindi essere complessati in modo da trovarsi vicini tra loro, ad esempio mediante leganti a ponte (figura 1.10)¹²².

Oltre che da un secondo ione metallico, una maggiore attività può essere fornita anche da altri gruppi funzionali nella posizione adatta¹²³. Il complesso di zinco in figura 1.10 ad esempio catalizza l'idrolisi del bis-p-nitrofenilfosfato, con accelerazioni di 3000 volte rispetto all'idrolisi spontanea a pH 7.0, e l'eventuale presenza di ammine piridiniche aumenta la reattività di 230 volte.

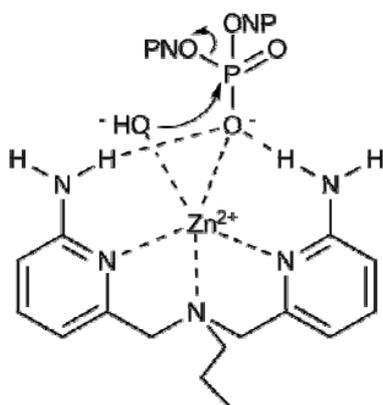


Figura 1.10: Catalizzatore dell'idrolisi del BNPP, meccanismo di reazione¹²².

La prossimità tra i complessi metallici, necessaria alla cooperatività, può essere indotta per un processo allosterico, ossia per una variazione conformazionale dovuta alla complessazione di un altro ione metallico. Molecole di Tren (Tris(2-etilammino)ammina) funzionalizzate alle tre estremità con dei leganti per ioni Zn(II)¹²⁴ vedono un avvicinamento dei tre complessi terminali quando un quarto ione metallico viene complessato dall'ammina terziaria al centro, a causa delle modifiche strutturali della molecola. Le interazioni tra gli ioni migliorano così l'efficacia catalitica. Acetilando le ammine secondarie centrali, la complessazione dello ione centrale viene impedita. Per ottenere catalizzatori multivalenti, è stato usato un legante quale il triazaciclononano, una poliammina ciclica (etere corona azotato) con la capacità di complessare fortemente gli ioni Zn²⁺, agendo a fini catalitici. Il substrato utilizzato è stato l'HPNPP, sistema modello dell'RNA (in quanto l'idrolisi avviene per attacco nucleofilo intramolecolare da parte di un idrossile). In seguito all'idrolisi si libera p-nitrofenolo, rivelabile per via spettrofotometrica, cosa che rende più semplice seguire la cinetica d'idrolisi rispetto all'RNA o agli oligonucleotidi. Sono stati testati dendrimeri con diversi gradi di funzionalizzazione, con un'attività catalitica che aumenta in modo non lineare al crescere della percentuale di complesso metallico presente sul dendrimero, fattore che indica chiaramente l'effetto cooperativo tra i gruppi metallici. Attività molto elevate sono poi state ottenute legando tioli funzionalizzati con il TACN a nanoparticelle d'oro (figura 1.11)¹²⁵: l'interazione dei gruppi metallici posti vicini sulla superficie del nanocluster fornisce un forte incremento della reattività, mostrando anche qui un'evidenza della cooperatività a causa dell'andamento sigmoidale dell'attività catalitica in funzione della quantità di ione metallico presente.

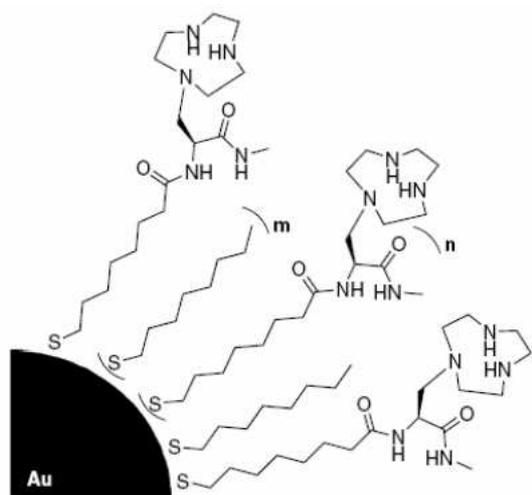


Figura 1.11: Nanoparticelle d'oro ricoperte con TACN-tiolo/ ottantiolo 50:50, variazione della costante catalitica per l'idrolisi dell'HPNPP al variare della quantità di Zn²⁺ presente¹²⁵.

1.3 - NANOPARTICELLE D'AU(0)

La preparazione di particelle metalliche prevede, in genere, la riduzione di un sale metallico in un ambiente in cui sia presente il “legante” che protegge la nanoparticella rispetto alla aggregazione irreversibile. Le due modalità con cui ha luogo questa stabilizzazione sono in genere classificate come elettrostatiche o steriche²⁸.

La stabilizzazione elettrostatica deriva dalla repulsione coulombiana tra le particelle causata dal doppio strato elettrico formato dagli ioni adsorbiti sulla superficie delle particelle stesse e i relativi controioni. Se invece sulla superficie sono coordinate molecole organiche stericamente ingombranti, che possono fungere da “barriera” verso la superficie metallica, si ha una stabilizzazione di tipo sterico.

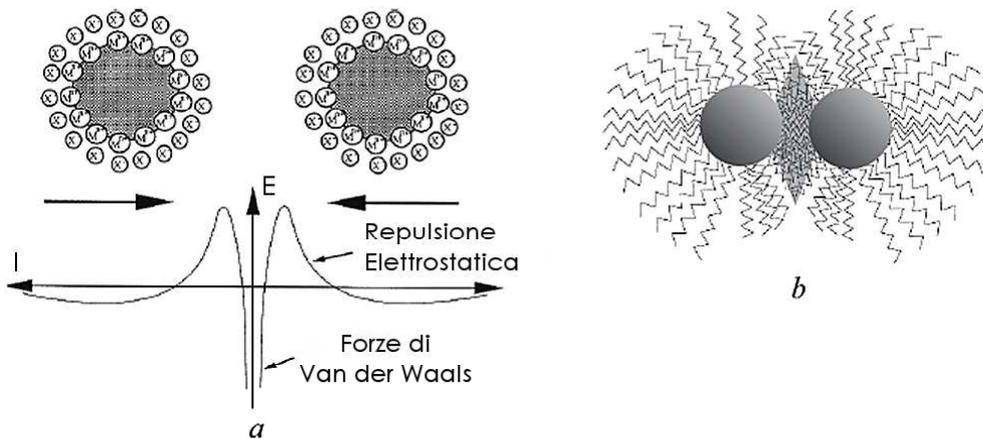


Figura 1.12: a) Stabilizzazione elettrostatica; b) Stabilizzazione Sterica.

Tra tutti i sistemi nanoparticellari, le nanoparticelle d'oro stabilizzate da leganti solforati e fosfine sono i più interessanti, a causa della stabilità dell'interazione oro-fosfina e nell'ancora più stabile interazione oro-zolfo. Le nanoparticelle di Au(0) passivate da tioli alchilici sono stabili in soluzione e allo stato solido e mostrano un'ottima stabilità all'ossigeno atmosferico. Analoghe nanoparticelle di rame sono ossidate facilmente dall'aria, mentre le nanoparticelle di argento mostrano una ridotta stabilità in soluzione. Le nanoparticelle di Au(0) passivate da tioli sono le uniche per le quali sono riportati comunemente spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR con chiara prova di un monostrato organico saldamente ancorato al loro nucleo metallico, a indicare che l'interazione Au-S non è un semplice assorbimento chimico o fisico ma si tratta di un vero e proprio legame.

1.3.1 - SINTESI di NANOPARTICELLE d'Au(0)

La grande varietà di metodi di sintesi di aggregati di atomi di oro di dimensioni nanometriche rispecchia la vastità dei campi d'impiego di queste nanostrutture.

Principale distinzione tra i metodi di preparazione è determinata dallo stato fisico del prodotto che si vuole ottenere, ossia se le nanoparticelle saranno disperse in un solido (film, vetro, etc.) o in un liquido (soluzione o dispersione). Per quanto riguarda l'argomento di questa tesi, l'attenzione è rivolta principalmente alle nanoparticelle ottenute in soluzione, per le quali vi sono approcci sintetici disparati. Occorre infatti fare un'ulteriore classificazione, in base alla natura del processo che porta alla formazione delle nanoparticelle stesse, sulla base della natura del precursore d'oro utilizzato. La generazione di nanoparticelle può avvenire per via termica da specie di Au(0) generate *in situ* oppure tramite processi riduttivi a partire da complessi di Au(III) o Au(I): quest'ultimo metodo è molto più usato, essendo più promettente dal punto di vista della stabilità dei sistemi ottenuti e del controllo che si ha sulle loro proprietà. Tale metodo, noto come "via umida", prevede la riduzione di sali di Oro in presenza di opportuni stabilizzanti, ed è noto fin dall'antichità [es.: Sali di Stagno(II) e Oro(III) usati dai romani per ottenere vetri colorati, che oggi sappiamo contenere nanoparticelle d'Oro(0)], anche se fu nel 1857 che Faraday²⁹ ottenne colloidali d'oro in acqua usando acido citrico; inoltre solo recentemente Turkevich^{30,31} giunse alla metodologia sintetica con cui ottenere campioni standard di nanoparticelle da 20 nm, utilizzati come marcatori in chimica biologica.

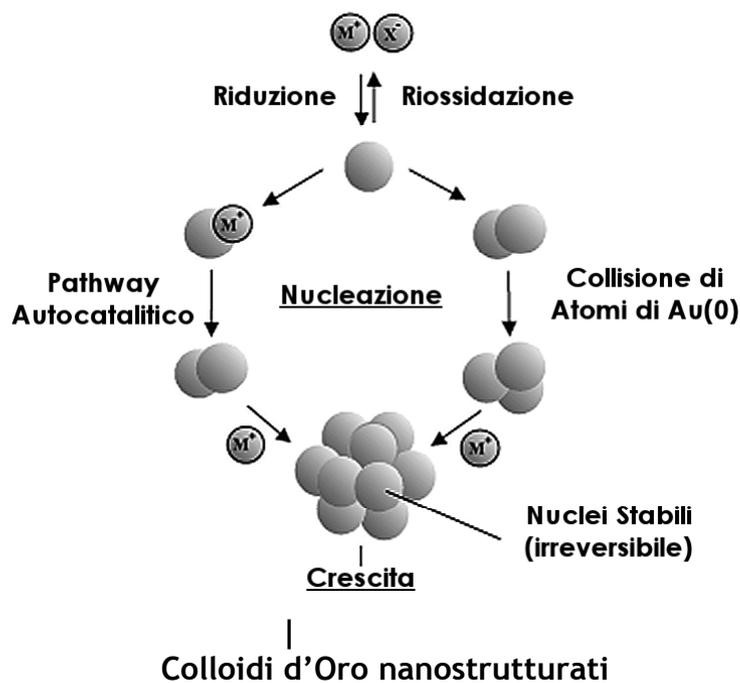


Figura 1.13: Meccanismo di formazione di cluster metallici attraverso la riduzione dei corrispondenti sali

Il meccanismo generalmente accettato prevede come stadio embrionale del processo di nucleazione l'iniziale formazione di atomi metallici zerovalenti per riduzione dei corrispondenti sali³², i quali possono successivamente collidere con altri atomi, ioni o cluster metallici per dare irreversibilmente un "seme" stabile. Le dimensioni di questo "seme" variano in modo dipendente dalla differenza tra i potenziali redox delle specie coinvolte e dall'energia di legame metallo-metallo, potendo essere anche molto inferiori al nanometro. Bisogna poi tenere conto di alcune variabili, tra cui per prima cosa la natura del precursore, costituito da complessi di Au(III) o Au(I). Nel primo caso si parla di acido tetracloroaurico e dei suoi sali³³, nel secondo di cloro-tris(trifenilfosfina)-Oro(I)³⁴. Spesso questi composti non sono i veri precursori delle nanoparticelle, in quanto, prima della riduzione ad Au(0), si formano *in situ* complessi in cui i leganti del centro metallico sono sostituiti da altri presenti in soluzione: nel caso di derivati dell'Au(III), ad esempio, si formano specie preridotte contenenti Au(I).

Altro importante fattore in gioco è il solvente in cui si producono le nanoparticelle, il quale influenza pesantemente la velocità di riduzione e la loro stabilità in rapporto alle dimensioni. La cinetica di riduzione è infatti completamente differente a seconda che abbia luogo in fase omogenea⁴⁴ in un solvente puro piuttosto che in una miscela di solventi, oppure in acqua o ancora in doppia fase¹⁶, con riduzione all'interfase o per catalisi a trasferimento di fase³⁵. Ancora diverso è il caso in cui essa avvenga in

microemulsione³⁶, che può essere olio in acqua oppure acqua in olio³⁷: in questo caso la riduzione avviene all'interfase tra le microscopiche goccioline dell'emulsione.

Importantissimo è il tipo di riducente impiegato: esso, legato per ragioni di solubilità alla scelta del o dei solventi utilizzati, è tra tutti i fattori quello che influenza maggiormente le dimensioni dei sistemi che si ottengono. Infatti i riducenti più blandi sono caratterizzati da cinetiche di riduzione lente e a volte sotto controllo termodinamico, mentre riducenti forti permettono di ottenere sistemi agendo su un controllo di tipo cinetico. La riduzione è infatti il momento cruciale nella sintesi di nanoparticelle e il controllo delle velocità di nucleazione e di crescita dei *cluster* d'oro è l'aspetto fondamentale su cui focalizzare l'attenzione. Tra i riducenti più utilizzati si trovano il sodioboroidruro e i suoi derivati¹⁶, il diborano⁴⁵, il fosforo^{40,38}, il litio trietilboroidruro³⁹, il citrato⁴⁰, l'ascorbato⁴¹, composti amminici⁴², l'etanolo e il glicole etilenico e altre sostanze con limitata applicabilità.

Il più energetico, il litio trietilboroidruro, è usato per la sintesi di nanoparticelle in THF in fase omogenea⁴⁴, dando origine a cluster di nuclearità relativamente bassa con diametri inferiori a 2 nm. Il sodio boro idruro è meno reattivo e più stabile in acqua, ed è il riducente più ampiamente utilizzato in questo campo permettendo di operare sia in fase omogenea⁴⁴ che in emulsione⁴⁷, come anche in doppia fase⁴⁶. A completare la classe di riducenti basati sul boro c'è il diborano⁴⁵, il quale ha permesso la sintesi dei primi cluster di oro protetti da fosfine.

Il fosforo bianco o rosso è stato usato per ottenere aggregati d'oro stabili in solvente organico^{40,49}, mentre composti meno reattivi come ascorbato⁵² e citrato⁵¹, con potenziali di riduzione decrescenti, hanno avuto un vasto impiego nella sintesi di colloidali di oro in acqua, permettendo talvolta di ottenere sistemi caratterizzati da una dispersione veramente ridotta⁴³. Infine le ammine, primarie, secondarie o terziarie, hanno potenziali di riduzione sufficienti a ridurre l'oro dallo stato di ossidazione III a 0, ma con processo lento a temperatura per la formazione di intermedi di Au(I); solo un caso riporta l'uso di ottadecilammina e di un secondo agente riducente, il sodio boroidruro, per decomporre i complessi intermedi e ottenere sistemi colloidali dotati di buona stabilità⁴⁴.

Altri fattori che influenzano le caratteristiche delle nanoparticelle prodotte sono le condizioni sperimentali, tra cui la temperatura del processo (alte temperature favoriscono il controllo termodinamico del processo, mentre basse temperature il

controllo cinetico) e la velocità di aggiunta del riducente (da cui dipende la velocità di nucleazione e di crescita).

Ulteriore elemento di fondamentale importanza per l'ottenimento di nanoparticelle d'oro è la presenza o meno di un monostrato. Il nucleo d'oro che va a formarsi può infatti essere realmente privo di ogni tipo di copertura oppure essere circondato da un monostrato di leganti chimicamente adsorbiti sulla sua superficie, come anche essere stabilizzato da ioni blandamente adsorbiti che gli conferiscono un doppio strato elettrico come interazione principale stabilizzante. Questi ultimi casi sono i più interessanti: esistono infatti numerosi tipi di preparazioni che utilizzano i leganti più svariati per ottenere sistemi stabili e dotati di nuove caratteristiche chimico-fisiche.

Il metodo di Brust-Schiffrin¹²⁶ prevede che tetracloroaurato (AuCl_4^-) venga portato in soluzione organica di toluene grazie ad un trasferitore di fase quale tetraottilammonio bromuro (TOABr), dove va poi aggiunto del tiolo che andrà a formare il monostrato organico della particella. Il tiolo è il primo dei due agenti riducenti richiesti; esso si lega all' Au(III) e lo riduce ad Au(I) , instaurando legami S-Au(I). A questo punto si aggiunge NaBH_4 , secondo agente riducente, il quale porta l'oro dallo stato Au(I) allo stato Au(0) , formando il nucleo metallico già ricoperto da tiolo.

Protocollo differente è invece il metodo di Scrimin¹²⁷, il quale prevede la formazione di particelle "metastabili", passivate in un secondo momento. Al sale d'oro, disciolto in toluene, viene aggiunto come primo riducente diottolammina, la quale riduce l' Au(III) ad Au(I) , instaurando legami N-Au più deboli rispetto agli S-Au. Secondo riducente è sempre NaBH_4 , che porta l' Au(I) ad Au(0) ottenendo così AuNPs ricoperte di diottolammina. Tali nanoparticelle, una volta eliminato il solvente, sono conservabili in atmosfera di N_2 al massimo per 24 ore, termine ultimo per la passivazione della superficie metallica con opportuni tioli; questi tioli possono essere sia idrosolubili che liposubili.

1.3.2 - LEGANTI

Con l'aggiunta di leganti funzionalizzati a oro colloidale metastabile si formano spontaneamente monostrati organici auto-assemblati. Solitamente tali leganti usati per la funzionalizzazione sono sintetizzati a parte, e solo successivamente sono usati per ricoprire le particelle. Questo approccio richiede diversi processi sintetici, uno per ogni tipo di legante e dunque uno per ogni tipo di nanoparticella che si vuole ottenere. Mescolando diversi leganti nella miscela aggiunta al colloide d'oro si ottengono nanoparticelle ricoperte da tutti questi diversi leganti, e nel monostrato essi saranno

presenti in proporzioni esattamente analoghe alla percentuale con la quale erano presenti in soluzione.

I leganti utilizzati sono svariati: storicamente più importanti sono le fosfine, i cui sistemi sono tra i più stabili, superati soltanto da quelli basati su tioli. La stabilità e la forza del legame $Au-S$ è infatti all'origine dell'enorme fortuna che hanno avuto i leganti solforati in questo campo, siano essi tioli così come altri gruppi analoghi basati sullo zolfo quali tioeteri, tioesteri, tiocarbammati, xantati, tiosolfati e disolfuri.

Con energie di legame con l'oro molto inferiori ci sono poi i composti azotati, con la serie delle ammine primarie, secondarie e terziarie e delle piridine variamente sostituite, e successivamente gli ioni che si adsorbono sulla superficie dei *cluster* metallici come il tetraottilammonio, il citrato, l'ascorbato, nonché tutta la serie di tensioattivi utilizzati per produrre le emulsioni. Si possono considerare a parte i sistemi polimerici, che legandosi con interazioni multiple alla superficie dell'oro possono sfruttare interazioni molto deboli, traendo vantaggio dall'effetto chelante. Polimeri utilizzati sono soprattutto quelli a base polietilenglicolica, ma non mancano l'utilizzo del polivinilpirrolidone, del polimetacrilato e del polistirene⁴⁵, oltre ai sistemi basati su dendrimeri.

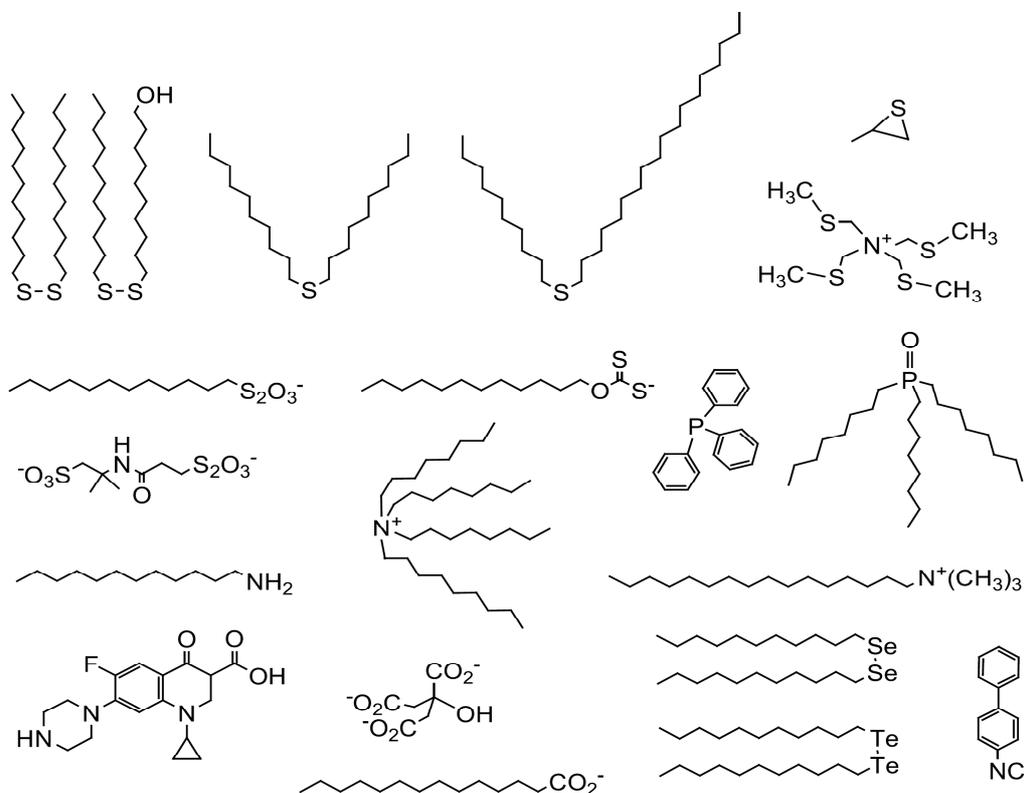


Figura 1.14: Alcune molecole organiche utilizzate nella sintesi di nanoparticelle d'oro, cui ovviamente si aggiungono fosfine e tioli

1.3.2.1 - Leganti al Fosforo

Il primo complesso contenente un cluster d'oro di elevata nuclearità, l' $\text{Au}_{55}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_{12}\text{Cl}_6$, è stato riportato da Schmid e collaboratori⁴⁵, ottenuto per riduzione di una soluzione benzenica di $\text{AuP}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Cl}$ con diborano a 50°C , con una resa del 29% circa.

Esso possiede un nucleo centrale di Au_{13} con caratteristiche metalliche, circondato da uno strato periferico costituito da 42 atomi di oro, di cui 12 legati alla trifenilfosfina e 6 legati al cloro. Le dodici trifenilfosfine formano una sorta di “guscio protettivo” che stabilizza il cluster Au_{55} , rendendo il composto stabile all'aria ma meno in soluzione, dove col tempo genera depositi di oro metallico. La stabilità in soluzione è aumentata se viene aggiunta trifenilfosfina; questo indica che la principale causa di instabilità è dovuta all'esistenza di un facile equilibrio di dissociazione Au-fosfina. Altro composto a cluster d'oro di Au_{11} è $(\text{Ar}_3\text{P})_7\text{Au}_{11}\text{X}_3$ ($\text{X} = \text{I}, \text{CN}$), ottenuto da Bartlett e coll.⁴⁶ con fosfina idrosolubile (tris[p-(amminoetil)fenil]fosfina) per decomposizione riduttiva di un precursore di Au(I) $[\text{Ar}_3\text{PAuX}]$ ($\text{X} = \text{I}, \text{CN}$) per azione del sodioboroidruo in etanolo, applicato nel campo dell'analisi istochimica e “indefinitamente stabile” a bassa temperatura. Questi cluster stabilizzati da fosfine hanno mostrato di essere le migliori sonde per la microscopia ottica, elettronica e in microscopia confocale, potendo essere funzionalizzati, mediante veri legami covalenti, in modo da essere coniugati con macromolecole d'interesse biologico.

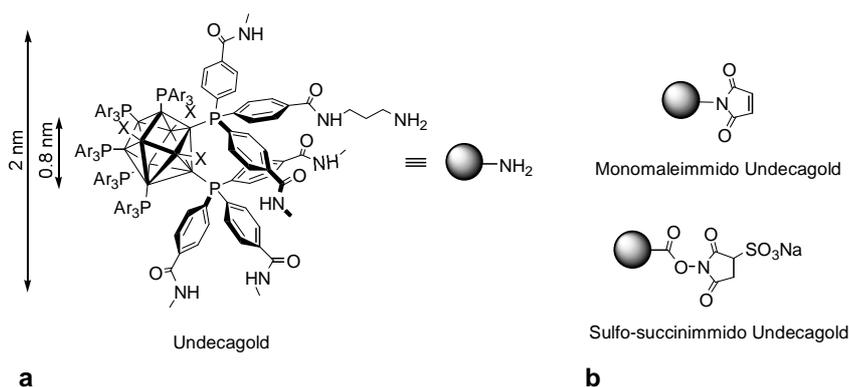


Figura 1.15: a) Rappresentazione schematica dei cluster Au_{11} disponibili in commercio. b) Sono disponibili commercialmente anche dei cluster modificati che presentano un gruppo maleimmidico reattivo verso i tioli, oppure cluster che presentano un gruppo succinimmidico reattivo verso le ammine.

La dimensione del cluster Au_{11} è di circa 0.8 nm, se con nuclearità maggiore (circa 67 atomi d'oro) hanno un diametro di circa 1.4 nm, e sono disponibili in commercio⁴⁷

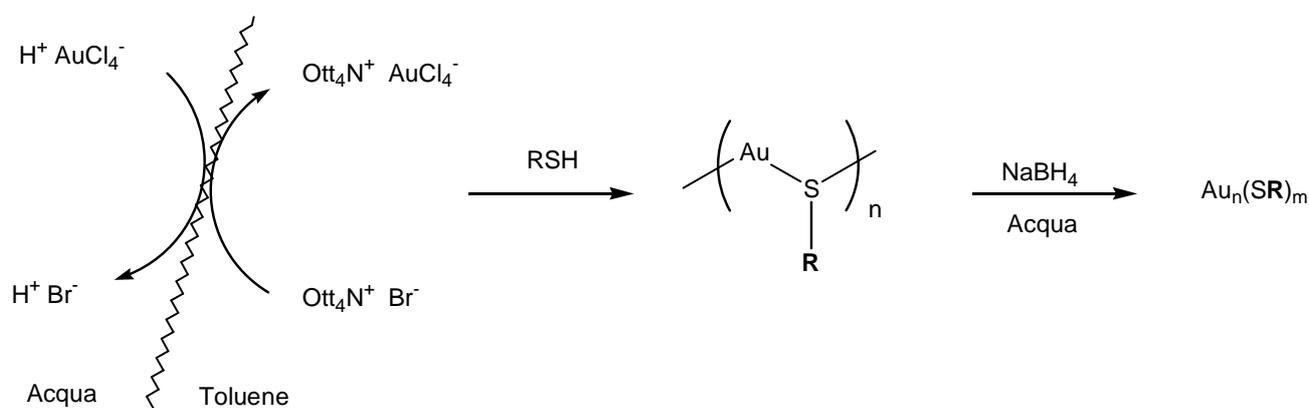
[Undecagold[®] (Monomaleimmido undecagold) e Nanogold[®] (sulfo-succinimmido undecagold), reattivi verso i tioli o le ammine]. Molte molecole d'interesse biologico sono state coniugate all'Undecagold o al Nanogold, tra cui il frammento Fab' di anticorpi⁴⁸, peptidi^{49,50}, ATP, acidi nucleici⁵¹, lipidi, fosfolipidi, carboidrati⁵² e specie complessanti dello ione Ni(II)⁵³.

Inoltre Hutchison e coll.⁵⁴ hanno sintetizzato un cluster Au₁₀₁ stabilizzato da trifenilfosfina, [Au₁₀₁(PPh₃)₂₁Cl₅], con un diametro di circa 1.5 nm.

L'utilizzo di fosfine secondarie in alternativa a quelle terziarie permette di produrre noccioli d'Oro con moderata dispersione (30-40%) e nuclearità compresa tra Au₃₈ e Au₃₁₄ (diametri tra 1 e 2 nm)⁵⁵, coordinandosi con legami con tempi di vita superiori a quelli degli analoghi solforati.

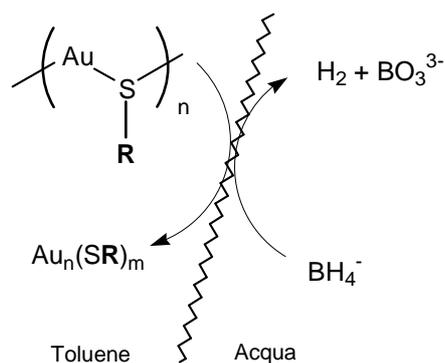
1.3.2.2 - Leganti allo Zolfo

Soluzione dalla labilità dei leganti fosfinici venne trovata nel 1994, quando Brust e Schiffrin⁴⁶ ottennero cluster d'oro di elevata nuclearità (Au_n, n>100) ricoperti da un monostrato di tiolati alchilici per riduzione di alchiltiocomplessi di Au(I) in soluzione di toluene. La sintesi di Brust e Schiffrin prevede il trasferimento dell'anione AuCl₄⁻ da una soluzione acquosa in una soluzione di toluene per mezzo di un trasferitore di fase, il tetraottilammonio bromuro (TOABr); alla soluzione organica di [TOA⁺AuCl₄⁻] viene aggiunto un tiolo alchilico, dodecantiole nella procedura originale, e a seguito di questa aggiunta si osserva la riduzione dell'Au(III) con formazione di un alchiltiocomplesso di Au(I), (schema 1.1). La successiva decomposizione riduttiva del complesso per azione di NaBH₄ in soluzione acquosa porta alla nucleazione del cluster metallico e alla contestuale formazione del monostrato di tiolati sulla sua superficie esterna.



Schema 1.1: sintesi di AuNPs secondo il metodo Brust-Schiffrin.

Questa sintesi consiste quindi nella formazione di un monostrato auto-assemblato di tiolati alchilici sulla superficie esterna di un cluster metallico anch'esso autoassemblato. Tale reazione fu estesa anche ai tiofenoli^{57,56}, riportando la sintesi di MPC protetti da un monostrato di 4-idrossi-tiofenolo⁵⁷ in metanolo, e successivamente anche ad un'ampia gamma di tioli alchilici e funzionali di diversa lunghezza (C3-C24) oltre ad acido tiocianurico⁵⁸, a 2-mercaptobenzotiazolo⁵⁹, tioeteri,⁶⁰ dialchil-disolfuri⁶¹, alchiltiosolfati⁶² e ai derivati dell'azobenzene e dello stilbene⁶³. Gli MPC ottenuti usando tioli alchilici $C_nH_{2n+1}SH$, vengono generalmente indicati con MPC-C_n, dove n indica il numero di atomi di carbonio della catena alchilica; così MPC-C12 indica MPC protetti da dodecantiole, MPC-C8 da ottantiole etc. Se il tiolo porta un gruppo funzionale (GF) in posizione terminale (ω), cioè se si utilizzano tioli del tipo GF- $C_nH_{2n}SH$, le nanoparticelle che si ottengono si indicano con MPC-C_n-GF. I disolfuri possono essere usati come sostituti dei tioli, in quanto vengono ridotti a tioli in seguito all'aggiunta del sodio boro idruro. Questa cosa naturalmente non accade con i tioeteri, e il loro uso genera nanoparticelle con dimensione maggiore di quelle che si ottengono usando tioli⁶⁰, indicando differenze meccanicistiche significative. La sintesi degli MPC è stata studiata in dettaglio da Murray e collaboratori⁶⁴: primo parametro è la stechiometria della reazione, intesa come rapporto molare $AuCl_4^-$ /tiolo che si utilizza nella sintesi; esiste infatti una stretta correlazione tra il rapporto Au/tiolo e la dimensione del nucleo metallico delle nanoparticelle, maggiore è tale rapporto e maggiori sono le dimensioni delle nanoparticelle che si ottengono. Il secondo parametro importante è la velocità con la quale la soluzione di riducente viene aggiunta; aggiunte rapide portano a nanoparticelle di piccole dimensioni, mentre aggiunte lente portano a nanoparticelle di dimensione maggiore. Nelle condizioni di Brust, però, la riduzione dell'alchiltiocomplesso di Au(I) è un processo eterogeneo che avviene all'interfaccia tra due fasi non miscibili (schema 1.2), per cui quando si parla di "velocità di aggiunta del riducente" non si tiene conto della reale velocità della riduzione.



Schema 1.2: Nelle condizioni di Brust, la riduzione dell'alchiltiocomplesso di Au (I) in toluene decorre per azione di una soluzione acquosa di NaBH_4 , si tratta quindi di un processo eterogeneo limitato dalla velocità di riduzione all'interfaccia o dal trasferimento di fase dell'anione BH_4^- ad opera del TOABr.

Il terzo importante parametro è la temperatura alla quale la reazione viene condotta, la quale influenza soprattutto la dispersione delle dimensioni delle nanoparticelle attorno ad un valore medio. Sebbene la reazione di Brust sia stata molto utilizzata e molto studiata, non esistono ipotesi fondate su quale sia il suo meccanismo; in particolare non è chiaro se lo stadio lento della reazione sia la nucleazione del cluster metallico o la sua passivazione ad opera delle specie solforate in soluzione. Le nanoparticelle che si ottengono usando tioli alchilici hanno nuclei metallici con dimensioni variabili da circa 1.5 a circa 5-6 nm, corrispondenti a cluster Au_n con $10^2 < n < 10^4$, circondati da un monostrato di leganti L_m con $10^2 < m < 10^3$. Mentre però la sintesi con leganti fosfinici genera specie con stechiometria ben definita, nella sintesi di Brust si ottengono cluster polidispersi, elemento indicante che nel primo caso la sintesi ha un controllo di tipo termodinamico, mentre nel secondo caso il controllo è di tipo cinetico.

Per dotare i generalmente inerti tioli alchilici di funzionalità e reattività specifiche, sono stati introdotti nel monostrato, prima della riduzione con sodioboridruro, vari gruppi funzionali quali tioli ω -funzionalizzati^{58,65} con gruppi ammidici interni⁶⁶ e terminanti con funzionalità oligossietiliche⁶⁷, ma anche tioli fluorurati⁶⁸ e altro.

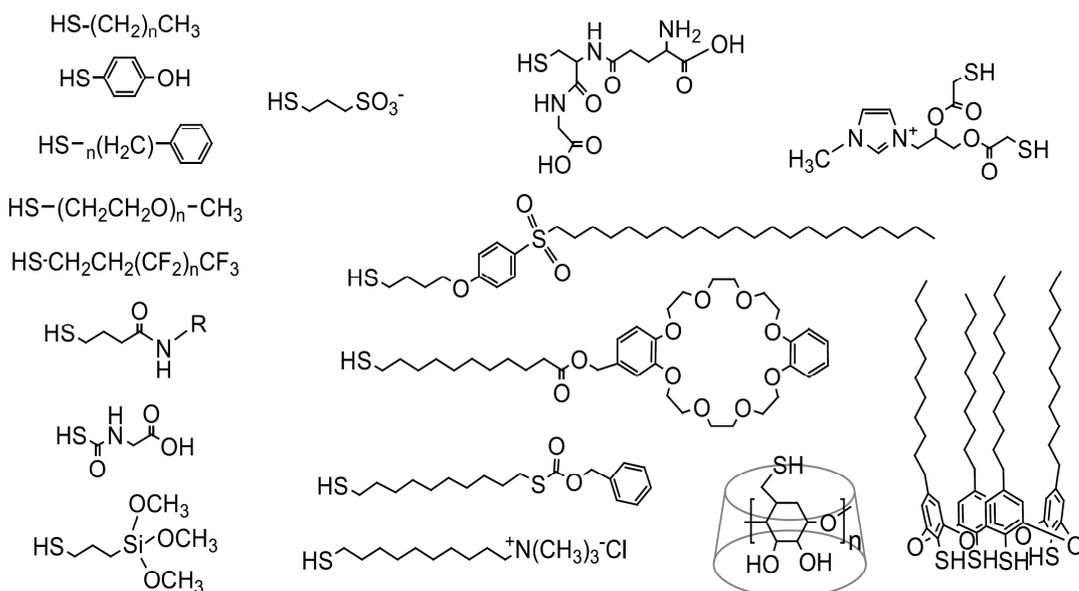


Figura 1.16: Vari tioli utilizzati nella sintesi diretta di nanoparticelle d'oro protette da un monostrato.

Sono stati anche realizzati monostrati misti, utilizzando miscele di tioli⁶⁹, dimostrando che il loro coadsorbimento è guidato dalla termodinamica di solvatazione dei leganti precursori. La realizzazione di monostrati funzionalizzati ha portato a espandere la solubilità delle nanoparticelle ottenute, ottenendo anche sistemi solubili in acqua, ad esempio per riduzione di complessi polimerici tra Au(I) e glutazione (*N*- γ -glutamminil-cisteinil-glicina) in acqua ad opera del sodio boroidruro⁷⁰.

I gruppi funzionali inseriti prima della riduzione devono essere stabili in condizioni basiche estreme e in ambienti fortemente riducenti, nonché all'ossidazione da parte dell'oro(III). Per inserire tioli non soddisfacenti tali caratteristiche è stata introdotta da Templeton e altri⁵⁸ la reazione di scambio dei leganti, attraverso cui è possibile modificare la composizione del monostrato delle nanoparticelle sintetizzate. Essa sfrutta il lento equilibrio tra i tioli in soluzione e quelli nel monostrato e avviene inizialmente attraverso uno scambio associativo in cui il legante entrante diffonde nel monostrato preesistente, cui segue l'uscita di un altro tiolo. La velocità di tale processo è influenzata da vari fattori tra cui i più importanti sono la lunghezza della catena alchilica, l'ingombro sterico del monostrato iniziale e la carica elettrica della nanoparticella. Tale metodologia ha permesso l'introduzione di molti diversi gruppi funzionali con funzionalità elettroattive, fotoattive, catalitiche, strutturali, e biologicamente attive^{58,60}.

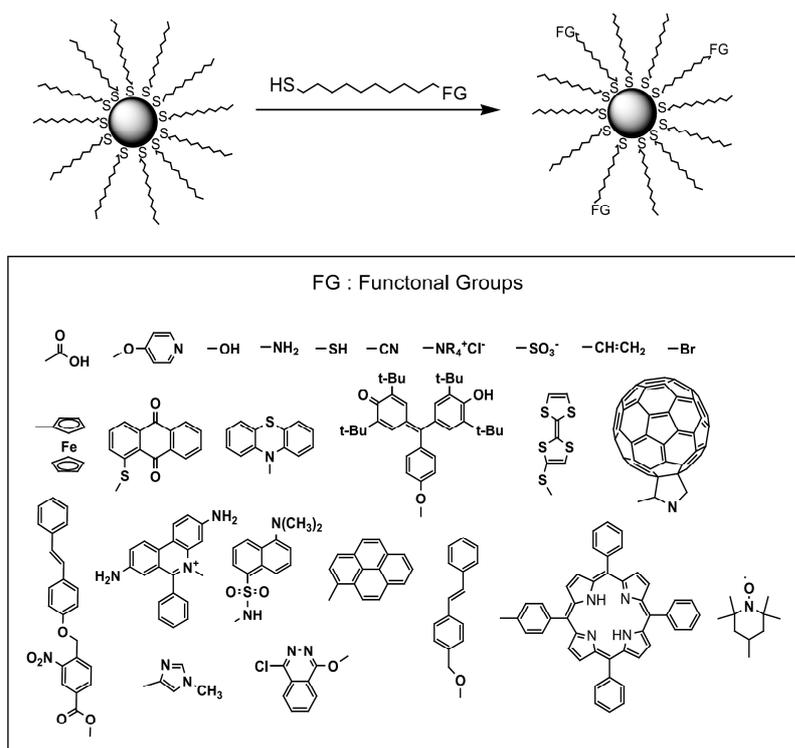


Figura 1.17: Alcuni esempi di gruppi funzionali introdotti tramite reazione di scambio

Per ottenere nanoparticelle funzionali è possibile usare anche sintesi sequenziali dove i gruppi presenti sulla superficie del monostrato sono modificati chimicamente attraverso reazioni di coupling, sostituzione nucleofila e amminazione riduttiva (figura 1.18).

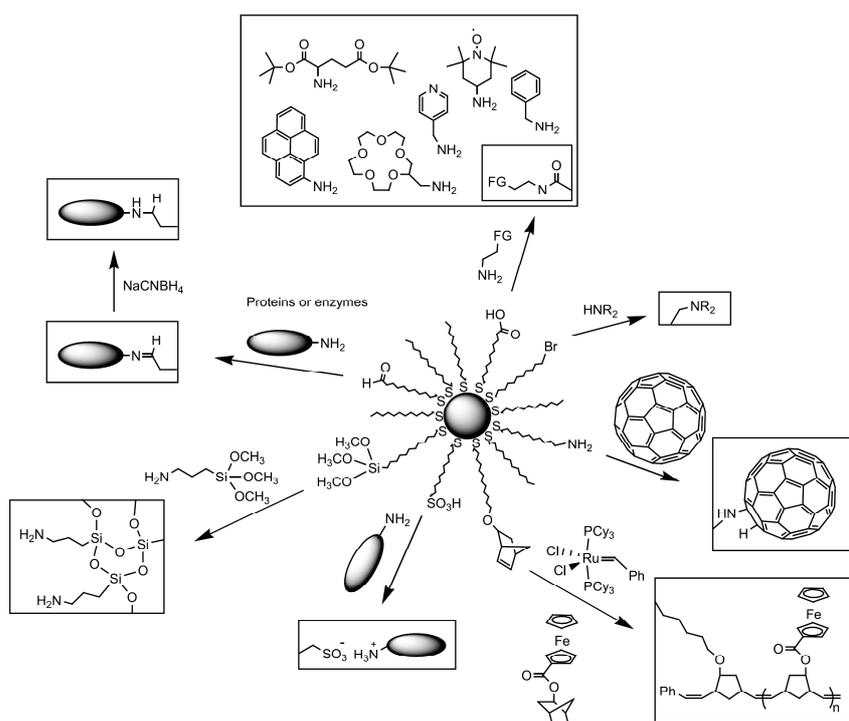


Figura 1.18: Alcuni esempi di funzionalizzazione sequenziale.

Oltre ai tioli, come già detto, sono utilizzabili anche disolfuri⁷¹, solfuri⁷², episolfuri⁷³, tiosolfati⁷⁴ e xantati⁷⁵ (Figura 1.6): nanoparticelle prodotte a partire da disolfuri hanno infatti mostrato le stesse proprietà di quelle ottenute direttamente coi tioli, a causa della conversione dei primi nei secondi durante lo stadio riduttivo. Nel caso di solfuri, episolfuri e tiosolfati, invece, la scarsa compattezza del monostrato permette all'oro metallico di attivare il CH₂ in α allo zolfo verso attacchi di tipo nucleofilo, portando all'ottenimento di nanoparticelle più grandi e meno stabili rispetto a quelle ottenute coi tioli.

1.3.2.3 - Leganti all'Azoto

Le ammine alifatiche sono specie il cui comportamento chimico è ben conosciuto, con varie caratteristiche che le rendono interessanti per la sintesi di nanoparticelle d'oro. Possiedono infatti potenziali redox sufficienti a ridurre l'oro(III) a oro(0), sono in grado di formare complessi con l'Au(I) e anche di realizzare monostrati su superficie di oro in condizioni opportune¹¹¹. A temperatura ambiente l'aggiunta di alchilammine a soluzioni di oro (III) provoca una rapida perdita di colorazione in seguito alla riduzione del metallo, ma la specie che si forma non contiene Au(0); in soluzione si trovano invece complessi oligonucleari o polimerici di Au(I), il quale lentamente decompone ad Au(0). Questi complessi formati in soluzione hanno stechiometria $AuX(NR^1R^2R^3)$ e sono cineticamente stabili, in quanto un blando riscaldamento li fa decomporre a oro metallico con formazione in soluzione di radicali catione ammonio relativamente stabili, il cui tempo di emivita è di alcuni secondi. Oltre alla decomposizione riduttiva per via termica⁷⁶ è possibile usare un secondo agente riducente per favorire la formazione delle nanoparticelle^{75,77}. Il monostrato che circonda il nocciolo d'oro è formato da diverse specie⁷⁹, tra cui coppie dovute all'interazione elettrostatica tra gli ioni negativi adsorbiti sulla superficie delle nanoparticelle e i cationi alchilammonio, complessi $Au^I X(NR_3)$ legati alla superficie e complessi neutri tra Au(0) e ammine neutre.

Anche questi monostrati possiedono un equilibrio tra monomeri liberi e legati alla superficie, permettendo così l'uso di reazioni di scambio per modificare la composizione del monostrato stesso. Inoltre, come per i tioli⁵⁸, il numero di atomi d'oro superficiale per molecola di ammina è circa 3 per nanoparticelle di dimensioni superiori a 5 nm⁷⁷.

1.3.3 - POST-FUNZIONALIZZAZIONE di NANOPARTICELLE

La sintesi di nanoparticelle d'oro funzionalizzate presenta degli inconvenienti. Solitamente, infatti, le molecole per la funzionalizzazione sono sintetizzate a parte, e

solo successivamente sono usate per ricoprire le particelle. Questo richiede diversi processi di sintesi e purificazione, uno per ogni tipo di nanoparticella che si vuole ottenere. Per aggirare questo tipo di problemi ci viene incontro la post-funzionalizzazione.

Il metodo Scrimin è molto versatile poiché permette di funzionalizzare le nanoparticelle con tioli di ogni tipo, sia idro- che lipo- solubili; il metodo Brust-Schiffrin permette la sola formazione di nanoparticelle solubili in ambiente organico, ma è certamente più semplice e rapido.

Con entrambi i metodi è possibile funzionalizzare le AuNPs dopo la loro sintesi, con un processo definito di post-funzionalizzazione. È infatti possibile sostituire i tioli che ne passivano la superficie in qualsiasi momento, e questo ponendo semplicemente le AuNPs in soluzione col tiolo o con la miscela di tioli sostituenti. Problema è la difficoltà nell'ottenere un alto grado di sostituzione.

Altro tipo di post-funzionalizzazione avviene tramite "click" chemistry. Questa si basa sulla modifica della periferia di uno strato di tioli già presenti sulla superficie particellare, non sulla loro sostituzione. Si basa infatti sull'instaurazione di legami tra azidi e alchini, sfruttando reazioni in condizioni blande¹²⁸.

Il processo si basa sull'inserimento nei tioli di gruppi azide, i quali sono poi fatti reagire con i gruppi funzionalizzanti presentanti un gruppo alchamico. Il gruppo di Brust, con questo metodo, ha introdotto lipasi su AuNPs di 12 nm di diametro, ottenendo però una resa dello 0,3% di azidogruppi "clickati"¹²⁹. Il gruppo di Williams ha formato AuNPs usando alchiltioli come riducente, sostituendoli poi con bromoundecantiolo (resa 52%) e sostituendo poi i bromi con gruppi azide (resa 92%). Su tali azidi sono state poi legate svariate molecole aventi alchini terminali i quali, oltre ad essere in largo eccesso, erano attivati da legami carbonilici allo scopo di essere maggiormente reattivi. Sono state così ottenute rese tra l'1 e il 22%¹³⁰. Il gruppo di Astruc infine ha formato AuNPs di 2,5 nm di diametro passivate con dodecantiolo, sostituito poi da 1-bromoundecantiolato in grande eccesso. Ha poi sostituito i bromi con gruppi azide con resa quantitativa, per poi legarvi alchini terminali sotto atmosfera d'azoto e con aggiunta di CuSO₄ e acido ascorbico in quantità stechiometriche: ha ottenuto così AuNPs sostituite con i gruppi funzionali d'interesse con resa quantitativa¹³¹. L'acido ascorbico riduce il Cu(II) a Cu(I), fondamentale catalizzatore della reazione, e l'atmosfera inerte impedisce la riossidazione a Cu(II). È questa la ragione dell'elevata resa.

Un ulteriore metodo di post-funzionalizzazione si basa sull'uso di tioli terminanti con aldeidi; nanoparticelle così ricoperte si prestano facilmente alla funzionalizzazione con qualsiasi molecola presenti gruppi amminici, in qualsiasi momento dopo la sintesi delle AuNPs. Il gruppo di Tamp ha ricoperto una superficie d'oro con un monostrato di tioli terminanti con funzioni aldeidiche latenti (ottenute, cioè, per ossidazione in situ di un diolo vicinale), alle quali ha poi legato delle proteine con legami covalenti tramite residui di lisina. Usando una concentrazione di proteine pari a 1 mg/ml la superficie del monostrato è stata completamente ricoperta in pochi minuti, e nessuna proteina è stata legata tramite adsorbimento non specifico¹³².

1.4 - APPLICAZIONI DEGLI MPCs

La possibilità di poter disporre, per “via umida”, di quantità notevoli di nanoparticelle metalliche stabili in soluzione è un'opportunità per applicazioni tecnologiche e in scienza dei materiali. La natura multivalente degli MPCs è una potenzialità importante per lo sviluppo di sistemi enzima-mimetici o per riprodurre, in sistemi semplificati, le interazioni polivalenti che hanno luogo in natura. La combinazione d'interazioni multivalenti e riconoscimento molecolare può essere sfruttata per lo sviluppo di sensori, eso-recettori e catalizzatori supramolecolari. Nanoparticelle metalliche “nude” sono usate come catalizzatori supportati in catalisi eterogenea⁷⁸, e anche se la presenza di un monostrato passivante impedisce la catalisi metallica, offre la possibilità di avere una “superficie funzionale solubile” e organizzata potenzialmente in grado di operare in processi catalitici.

1.4.1 - MPCs nel RICONOSCIMENTO MOLECOLARE

La natura multivalente delle nanoparticelle funzionali è l'ideale punto di partenza per lo sviluppo di sensori basati sul riconoscimento molecolare. Astruc ha sviluppato sensori elettrochimici per anioni quali H_2PO_4^- e HSO_4^- ⁽⁷⁹⁾, preparando MPCs che incorporano un ammidoferrocenil-alchiltiolo (AFAT) nel monostrato di MPC-C12 (figura 1.19).

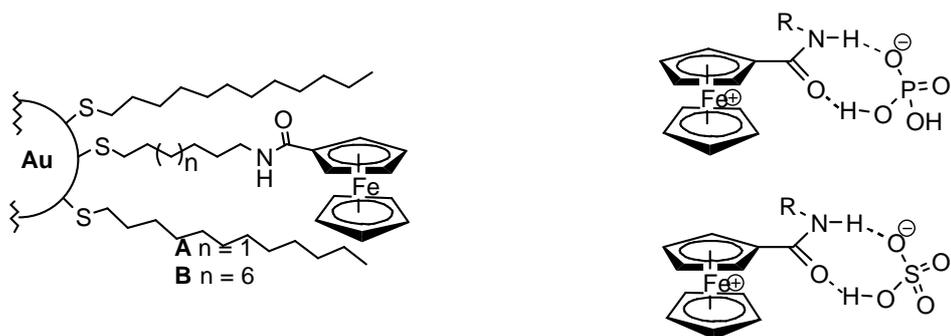


Figura 1.19: Nanoparticelle utilizzate nel riconoscimento degli ioni H_2PO_4^- e HSO_4^- .

Eseguendo esperimenti di voltammetria ciclica, la presenza degli anioni provoca lo spostamento dell'onda voltammetrica a potenziali meno positivi rispetto alla stessa onda in assenza degli anioni, in seguito alla riduzione del complesso $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{catione ferrocenilico}$ la cui costante di legame è 6000 volte maggiore di quella con l'ammidoferrocene. Le costanti di legame per l'anione bisolfato risultano però molto minori rispetto alle costanti ottenute per lo ione bifosfato, permettendo al processo di essere selettivo per il riconoscimento di quest'ultimo.

Watanabe et al.⁸⁰ hanno sintetizzato MPCs funzionalizzati con 10-mercaptodecanoilbutilammide C a partire da MPC-C6.

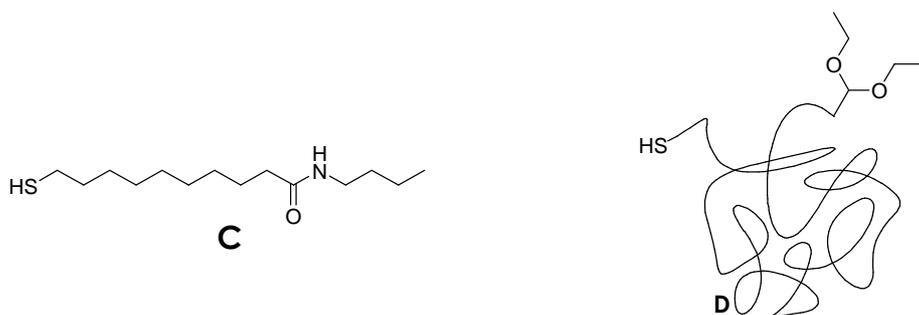


Figura 1.20: Il tiolo C è stato utilizzato da Watanabe,⁸⁰ il tiolo D è stato utilizzato da Kataoka.⁸¹

Queste nanoparticelle, con diametro del nucleo metallico pari a 4 nm, presentano una SPB (banda plasmonica di risonanza) ben definita, e in soluzione di CH_2Cl_2 , complessano gli ioni H_2PO_4^- , HSO_4^- , AcO^- , NO_3^- , I^- , Br^- , Cl^- , introdotti in soluzione come sali di tetrabutylammonio. Tale complessazione fa variare l'intensità della SPB in base alla

quantità di sale aggiunto, con un meccanismo basato sulla formazione di legami ad idrogeno tra gli anioni e i legami -CONH- nel monostrato.

Kataoka⁸⁵ ha preparato nanoparticelle idrosolubili (diametro del nucleo metallico 8.9 nm) per riduzione dell'acido tetracloroaurico con sodio boroidruro in presenza di α -dietossi- ω -mercapto-PEG.

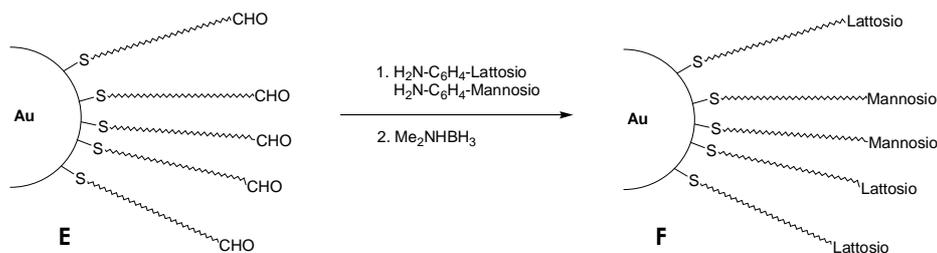


Figura 1.21: Rappresentazione schematica della preparazione delle nanoparticelle E per amminazione riduttiva degli MPC F.

Idrolizzando la funzione acetaleica in posizione α (nanoparticelle E) e funzionalizzandole mediante amminazione riduttiva con p-amminofenillattosio (p-aminofenil- β -D-lattopiranoside) in presenza di $(\text{CH}_3)_2\text{NHBH}_3$ (figura 1.21), sono state ottenute nanoparticelle glicosilate (F) che in presenza di agglutinina bivalente RCA_{120} formano superaggregati in soluzione, con variazione di colore da rosa a violetto.

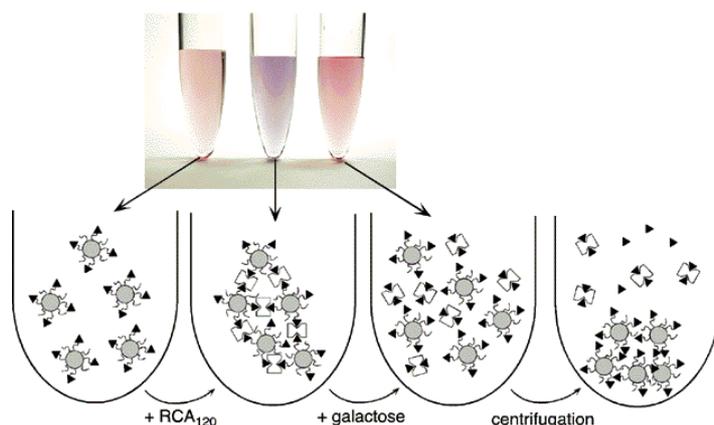


Figura 1.22: Rappresentazione schematica del processo di aggregazione studiato da Kataoka. L'aggiunta dell'agglutinina RCA_{120} provoca l'aggregazione, l'aggiunta di un eccesso di galattosio ristabilisce la situazione iniziale.

Questa reazione è reversibile, ristabilendo la condizione iniziale tramite aggiunta di un largo eccesso di galattosio; questo indica che la formazione di superaggregati non sfocia

nella aggregazione irreversibile delle nanoparticelle con “fusione” dei loro nuclei metallici.

Penadés⁸², nello studio del riconoscimento molecolare, ha sintetizzato MPCs funzionalizzati con tiolati recanti oligosaccaridi d’interesse biologico in posizione terminale, utilizzando il disaccaride lattosio e il trisaccaride Le^X (figura 1.23).

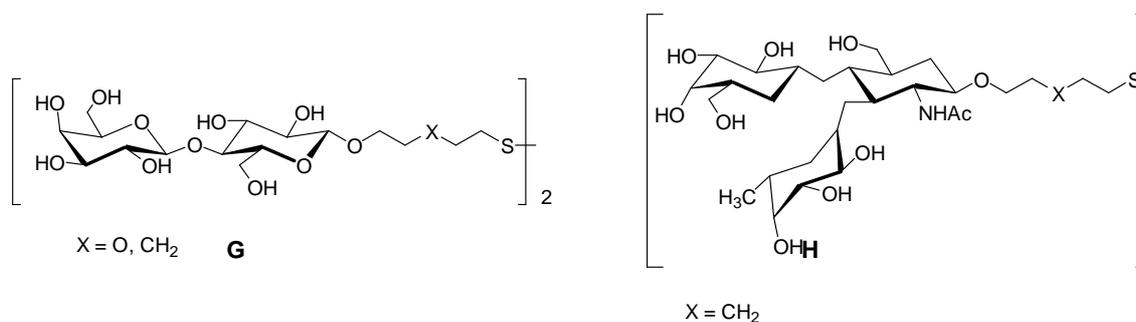


Figura 1.23: Disolfuri glicosilati utilizzati nella preparazione di MPC. Le nanoparticelle sintetizzate da Penadés constano di un monostrato omogeneo di G e H.

Cercando di riprodurre il clustering di glucosidi sulla superficie esterna delle membrane cellulari, è stato evidenziato come sia necessario l’intervento dello ione Ca²⁺ perché l’interazione glicoside-glicoside possa instaurarsi; questo solo su nanoparticelle funzionalizzate con il trisaccaride Le^X, confermando la sua importanza nei processi di adesione. L’aggiunta di EDTA alla soluzione sequestra lo ione Ca²⁺, con conseguente distruzione degli aggregati (reversibili).

Letsinger e Mirkin⁸³ sono stati in grado di rivelare selettivamente, per via colorimetrica, i polinucleotidi complementari a filamenti singoli di DNA legati a oro colloidale, grazie all’elevatissima selettività con cui tali filamenti a catena singola riconoscono i propri frammenti complementari in modo esatto, con elevatissima omologia di sequenza (figura 1.24).

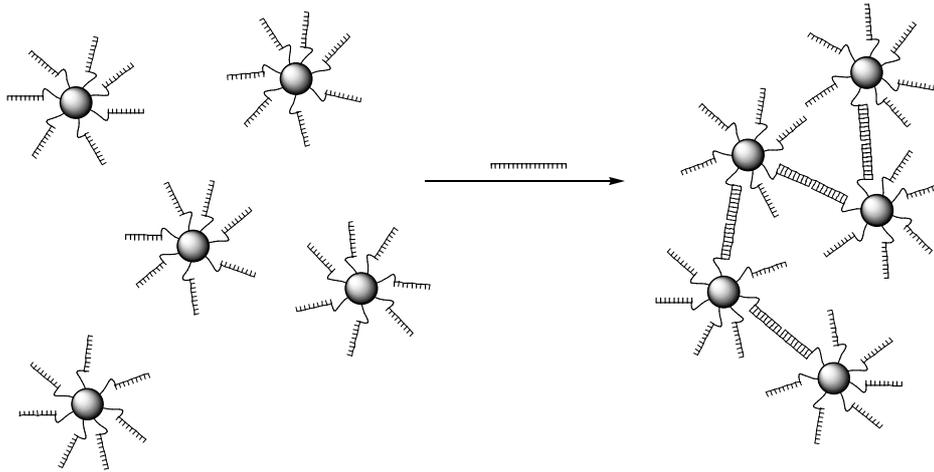


Figura 1.24: L'introduzione del filamento di DNA complementare alla sequenza oligonucleotidica del DNA legato alle nanoparticelle provoca la formazione di una estesa rete di aggregati. L'accoppiamento tra i plasmoni di superficie di nanoparticelle adiacenti, provoca la variazione di colore della soluzione dal rosa al blu.

L'ibridizzazione con i filamenti complementari provoca la formazione di superaggregati di nanoparticelle, generando una variazione del colore delle soluzioni di nanoparticelle dal rosso-rosa al blu-violetto. Dal momento che queste nanoparticelle metalliche hanno coefficienti di estinzione molare $>10^7 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, la sensibilità della tecnica è molto alta, permettendo di rivelare frammenti di polinucleotidi in concentrazione sub-picomolare.

Sempre Mirkin e coll.⁸⁴ hanno usato nanoparticelle di Au modificate con frammenti di DNA per il riconoscimento specifico di anticorpi in presenza di altre proteine, usando nanoparticelle modificate con DNA e pre-incubate con sequenze oligonucleotidiche funzionalizzate con l'opportuno aptene (figura 1.25), portando all'aggregazione delle nanoparticelle.

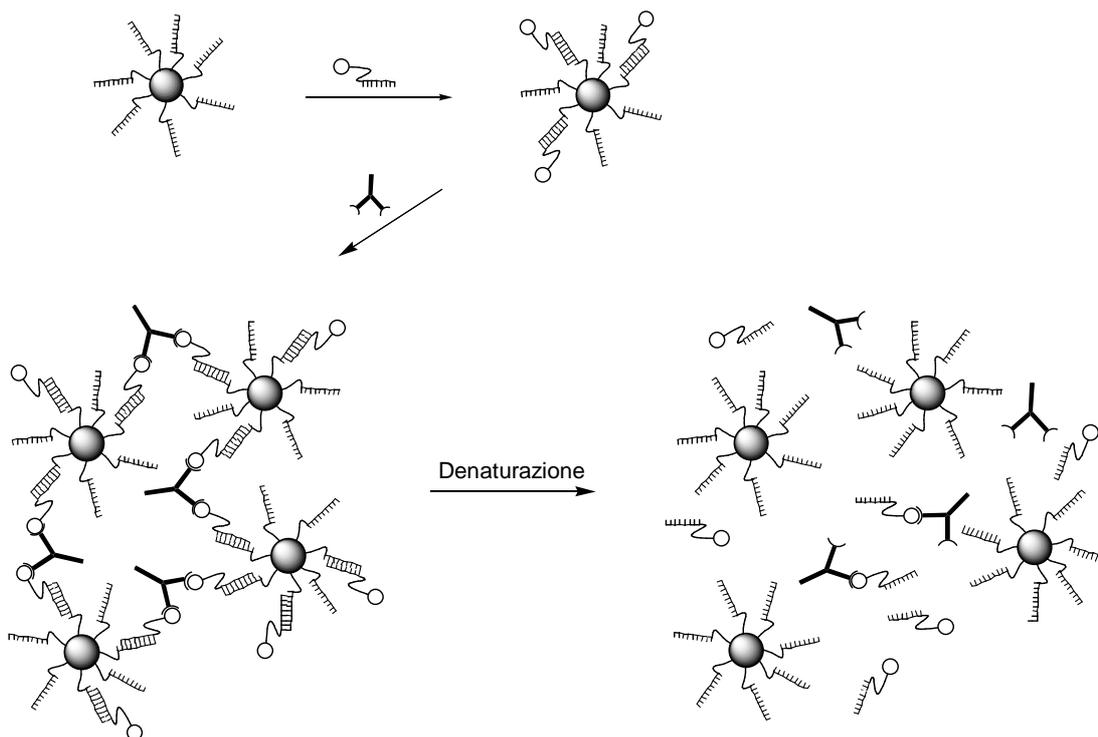


Figura 1.25: L'introduzione dell'anticorpo specifico per l'aptene legato alle nanoparticelle nello stadio d'incubazione, provoca la formazione degli aggregati in soluzione. La denaturazione termica delle sequenze di DNA rompe tali aggregati. La diversa temperatura di denaturazione di diverse sequenze di DNA permette di rivelare la presenza contemporanea di anticorpi diversi.

Questa tecnica permette di rivelare più anticorpi, purché le sequenze oligonucleotidiche che legano gli apteni siano abbastanza diversi e i frammenti di DNA che derivano dal processo d'ibridizzazione abbiano temperature di fusione diverse. Si è riusciti così a rivelare contemporaneamente l'immunoglobulina E (IgE) e l'immunoglobulina G1 (IgG1) in presenza di lisozima, albumina bovina e anti-digitossina.

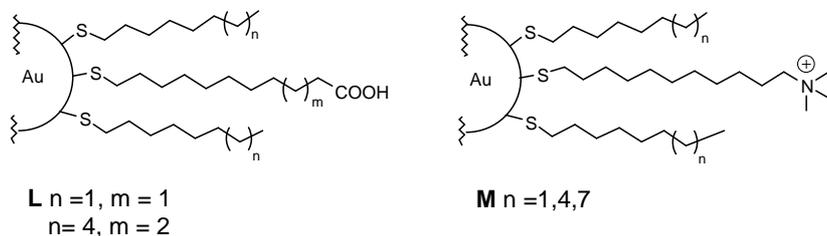


Figura 1.26: Rappresentazione schematica di MPC idrosolubili ottenuti per reazioni di scambio su alchiltiolato-MPC da Rotello e coll.^{85,93}

Nanoparticelle poli-cationiche sviluppate da Rotello⁹², allo stesso modo di liposomi, polilisine, polietilenimine, polimeri e dendrimeri PAMAM, mostrano una forte capacità di legame col DNA: per questo tali composti sono utilizzabili nella trasfezione cellulare. Gli MPCs ammoniacali (**M**) sono fino a 8 volte più attivi rispetto alla polietileneimina, usata comunemente nella trasfezione genica, tanto che la complessazione di tali MPCs con un frammento di DNA costituito da 37 paia di basi impedisce la sua trascrizione *in vivo* ad opera della polimerasi T7, con una costante di dissociazione inferiore a 5 nM (costante del complesso polimerasi-DNA).

Rotello⁸⁶ ha poi dimostrato che nanoparticelle polianioniche carbossiliche (**L**) inibiscono l' α -chimotripsina con sua successiva denaturazione, tramite un'associazione delle nanoparticelle con la chimotripsina con conseguente ostruzione dell'accesso al sito attivo dell'enzima, il quale viene circondato da residui polari e cationici con denaturazione dell'enzima ($K_{\text{inibizione}} \approx 10.4 \pm 1.3$ nM).

L'inibizione non avviene con nanoparticelle policationiche, confermando la tesi secondo cui essa nasce da un'associazione per attrazione elettrostatica.

Sempre Rotello e coll.⁸⁷ hanno usato MPCs come eso-recettori, funzionalizzandoli con tioli recanti in posizione ω dei gruppi pirene e diacilamminopiridina, in grado così di complessare la flavina sia nello stato ridotto **Q2** che nello stato ossidato **Q1** (figura 1.27).

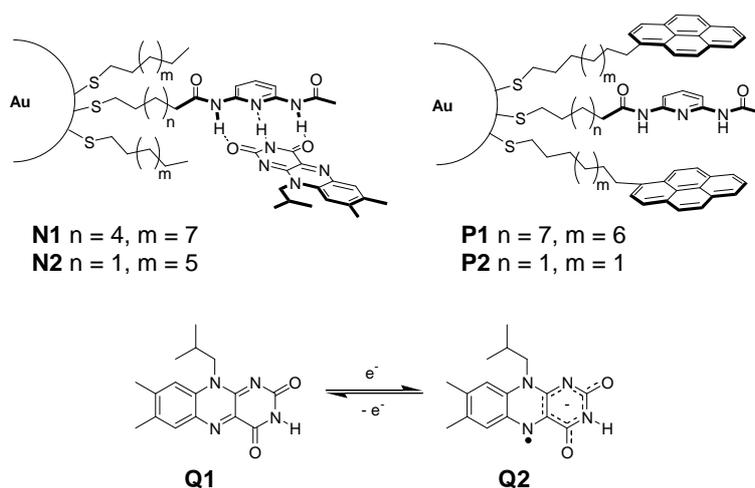


Figura 1.27: Nanoparticelle utilizzate da Rotello per la preparazione di recettori per la flavina.

Tra le due, però, questi MPCs legano meglio la forma ridotta, poiché essa è un miglior accettore di legami ad idrogeno rispetto alla flavina ossidata. Le unità pireniliche in

posizione ω dei tioli ha generato un recettore sintetico **P1** in grado di legare la flavina sia mediante legami a idrogeno che mediante interazioni di stacking π , risultando più efficienti nella complessazione della flavina ossidata rispetto alla flavina ridotta.

Un'altra caratteristica degli MPCs, importante nella preparazione di modelli enzimatici e nei processi di riconoscimento, è la loro natura multivalente; infatti MPCs che presentano unità *N*-metilimidazoliche sulla superficie esterna del monostrato sono efficaci leganti polivalenti per modelli di recettori multitemporali quali le porfirine **R1** ed **R2**⁸⁸.

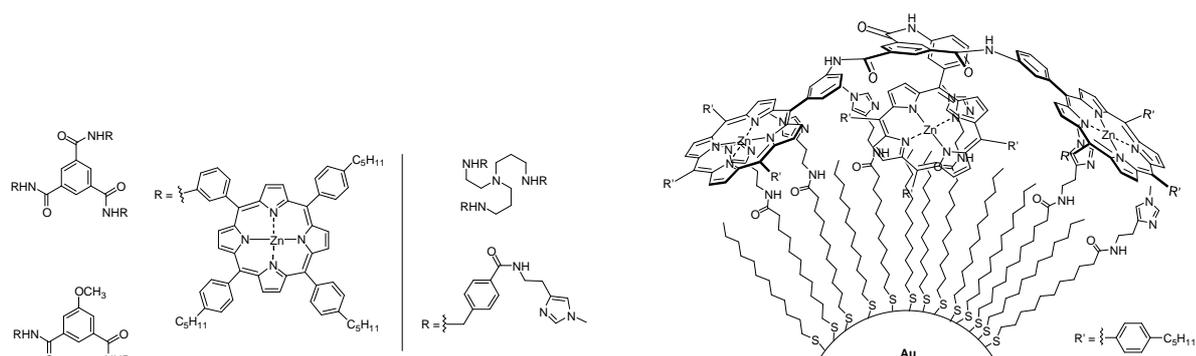


Figura 1.28: Rappresentazione schematica dei recettori politopici utilizzati in questo studio (a sinistra). Addotto supramolecolare tra gli MPC una poliporfirina (a destra).

La combinazione di mobilità e pre-organizzazione che è possibile ottenere sulla superficie esterna degli MPCs, unitamente alla possibilità di creare dei microambienti separati dal solvente bulk, rende queste nanoparticelle delle ottime piattaforme per la preparazione di modelli enzima-mimetici.

1.4.1.1 - Vaccini Artificiali

Come già accennato in precedenza, nanoparticelle d'oro ricoperte da tioli funzionalizzati con carboidrati aventi azione antigenica, possono mimare la superficie cellulare di organismi patogeni, e possono dunque essere usate per attivare il sistema immunitario a produrre anticorpi. Sono quindi potenziali vaccini di origine sintetica¹⁵. Le nanoparticelle fungono infatti da supporto, dando agli epitopi legati la disposizione spaziale corretta perché possano essere riconosciuti dagli specifici anticorpi; allo stesso tempo però le nanoparticelle mancano di tutta la parte patogena del batterio o virus contro il quale si vuole creare il vaccino, eliminando dunque tutta quella serie di effetti collaterali che si avrebbero utilizzando il corrispondente virus o batterio inattivato.

Il gruppo di Scrimin ha preparato AuNPs di differenti dimensioni (2, 3,5 e 5 nm) ricoprendole con tioli funzionalizzati con i mono-, di- e trisaccaridi analoghi agli epitopi del meningococco A. Esse sono poi state testate nella loro capacità di competere con il naturale meningococco A (Men A) nel legame con gli anticorpi specifici anti-Men A policlonali di topo in test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), calcolandone l'IC₅₀: le gliconanoparticelle hanno mostrato una capacità di inibizione degli anticorpi fino al 60% rispetto a quella del Men A naturale, maggiore per NPs più grandi. La capacità d'inibizione delle gliconanoparticelle si è poi dimostrata maggiore rispetto a quella degli oligosaccaridi liberi.

1.4.1.2 - Test Enzimatici e Nucleici

Nanoparticelle d'oro sono utilizzabili anche come dispositivi sensori per la determinazione enzimatica. Sono utilizzati appositi peptidi funzionalizzati a entrambe le estremità con unità tioliche; questi peptidi causano aggregazione delle nanoparticelle d'oro, caratterizzata da una colorazione blu della soluzione in cui si trovano, a causa della modifica della banda plasmonica superficiale di risonanza. La presenza di enzimi risulta in un taglio dei legami peptidici, con conseguente perdita da parte dei peptidi stessi della capacità di indurre aggregazione; le AuNPs assumono quindi colorazione rossa.

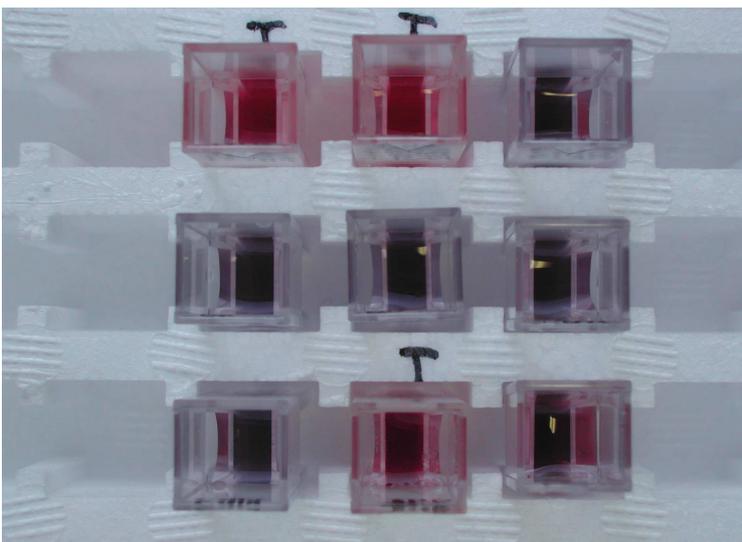


Figura 1.29: test enzimatici, la colorazione rossa è proporzionale alla quantità di enzima presente.

1.4.2 - MPCs FUNZIONALIZZATI come ENZIMI SINTETICI (NANOZIMI)

Lo sviluppo di sistemi enzima-mimetici, a scopo di conoscenza oppure come applicazione tecnologica, è stato attuato con approcci molto diversi gli uni dagli altri, in base alla diversa formazione di complessi enzima-substrato e alla stabilizzazione degli stati di transizione rispetto ai reagenti. Essi si basano su micelle⁸⁹, liposomi⁹⁰, sinzimi⁹¹, polimeri impressi⁹² o specie monometriche, utilizzabili in solventi non acquosi, a temperature elevate o nella catalisi di reazioni non biochimiche, dove gli enzimi mostrano attività ridotta. Le reazioni enzimatiche decorrono in condizioni di desolvatazione e in ambienti generalmente idrofobici, elementi che rafforzano interazioni normalmente deboli come legami a idrogeno o interazioni elettrostatiche, alterando la reattività dei gruppi funzionali; tali condizioni si trovano nel sito attivo, dove sono collocati i gruppi cataliticamente attivi. I primi tentativi di mimare gli enzimi sono partiti introducendo in ambienti idrofobici gruppi che si trovano nelle catene laterali degli amminoacidi come -OH (serina), -COOH (acidi aspartico e glutammico), -imidazolo (istidina), -NH₂ (lisina). Il più semplice micro-ambiente idrofobico in acqua è stato realizzato con soluzioni micellari di tensioattivi, le quali non mostrano elevate specificità di substrato poiché l'accelerazione deriva dall'elevata concentrazione di substrato e catalizzatore nella pseudo-fase della micella⁹³; essendo poi delle specie flessionali, il tempo di residenza dei monomeri nella micella è dell'ordine dei μ s, impedendo la sinergia tra gruppi diversi. L'uso di copolimeri contenenti gruppi presenti nelle catene laterali degli amminoacidi, (*synzymes*⁹⁴) ha invece evidenziato l'esistenza di quei fenomeni di cooperazione tra gruppi localmente vicini non osservati nelle micelle⁹⁵, avendo un comportamento enzimatico, con saturazione del catalizzatore e cinetiche di Michaelis-Menten⁹⁶. un sito attivo preorganizzato entro una matrice polimerica (*imprinted polymers*)⁹². Ponendo un tempato analogo allo stato di transizione (TSA) della reazione da catalizzare⁹² nella reazione di polimerizzazione, sono stati ottenuti polimeri con i gruppi funzionali conformati in un'opportuna cavità organizzata (figura 1.30Figura).

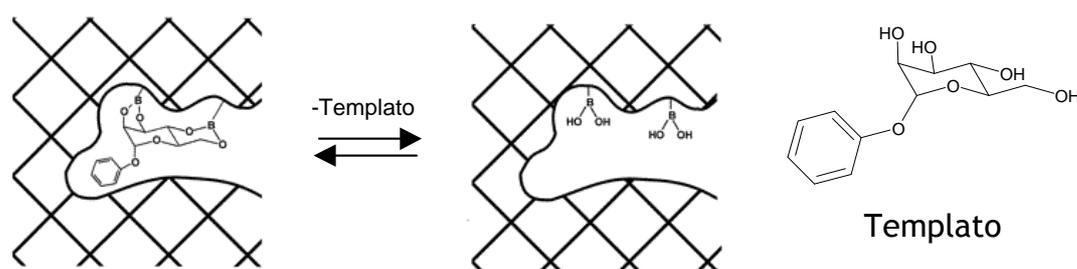


Figura 1.30: Rappresentazione schematica della strategia di sintesi degli *imprinted polymers*.

Sono poi stati preparati anticorpi monoclonali contro gli analoghi degli stati di transizione delle reazioni che si vogliono catalizzare, usandoli poi come modelli enzimamimetici di natura proteica detti anticorpi catalitici⁹⁷: il “sito attivo” dell’anticorpo catalitico stabilizza lo stato di transizione della reazione, catalizzandola.

Gli MPCs sono sistemi rigidi e densi, la cui natura globulare li rende simili alle micelle. La loro rigidità rende possibili quei fenomeni di cooperazione tra gruppi funzionali che non sono possibili nei sistemi micellari⁹⁸, e l’introduzione di gruppi polari nel monostato non è limitata alla superficie esterna, essendo realizzabile in qualunque posizione, creando micro-ambienti con polarità non omogenea (figura 1.31).

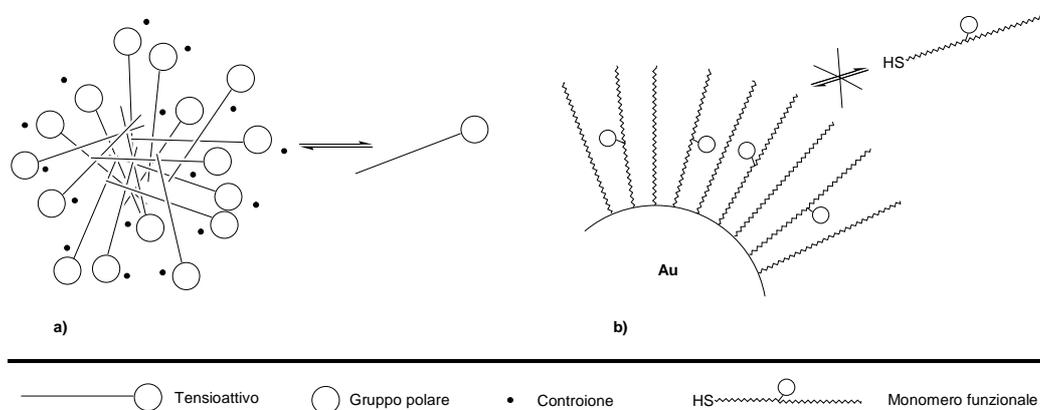


Figura 1.31: a) Rappresentazione schematica degli aggregati micellari. b) Rappresentazione schematica degli MPC, per questi composti non esiste alcun equilibrio di dissociazione spontanea dei monomeri.

Anche se la stabilità del sistema diminuisce, questo permette di creare dei “gradienti di lipoficità” che guidano i substrati nel “sito attivo”.

Le nanoparticelle di oro sono dunque ottimi agenti templanti⁹⁹, avendo il vantaggio che le loro sintesi e funzionalizzazione sono processi di autoassemblaggio. La combinazione di mobilità e organizzazione che è possibile ottenere sulla superficie esterna degli MPC, unitamente alla possibilità di creare dei microambienti con caratteristiche sensibilmente diverse dal bulk della soluzione, rende le nanoparticelle delle ottime piattaforme per la preparazione di modelli enzima-mimetici, funzionalizzando degli MPCs con peptidi o molecole sintetiche che presentino un’intrinseca attività catalitica. La natura auto-assemblata di queste nanoparticelle permette la loro facile funzionalizzazione con peptidi-tioli anche molto complessi, trasferendo così molte delle caratteristiche degli enzimi su sistemi completamente sintetici. Inoltre gli MPCs possono essere usati in

approcci di tipo combinatoriale allo sviluppo di oggetti supramolecolari enzimamimetici, introducendo qualunque peptide possieda una funzione tiolica (es: peptidi con istidina su MPC-C12, figura 1.32)¹⁰⁰.

Mrksich¹⁰¹ ha sintetizzato MPCs con monostato di DHQ, usando tali nanoparticelle nella reazione di diidrossilazione di Sharpless ottenendo attività paragonabile a quella dell'analogo sistema supportato.

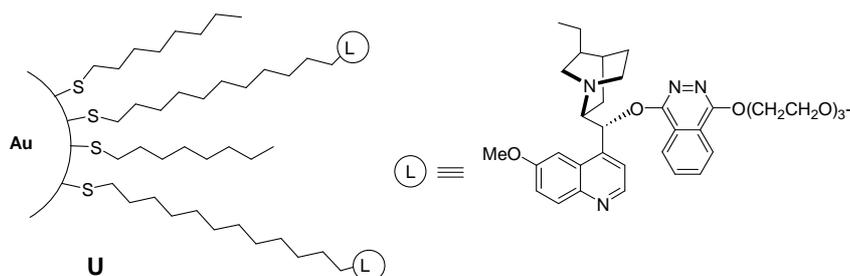


Figura 1.32: Nanoparticelle funzionalizzate con DHQ e utilizzate nella reazione di diidrossilazione di Sharpless. Le nanoparticelle U hanno mostrato un'attività comparabile a quella dell'analogo sistema supportato.

Scrimin e coll.¹⁰⁴ hanno invece preparato, con MPC-C12, degli MPCs funzionalizzati con 12-mercaptododecanoilmetilistamina (V2, figura 1.33), ottenendo delle nanoparticelle con una percentuale di sostituzione del 50% utilizzate come catalizzatori nella reazione d'idrolisi del DNPA in metanolo/acqua 6/4.

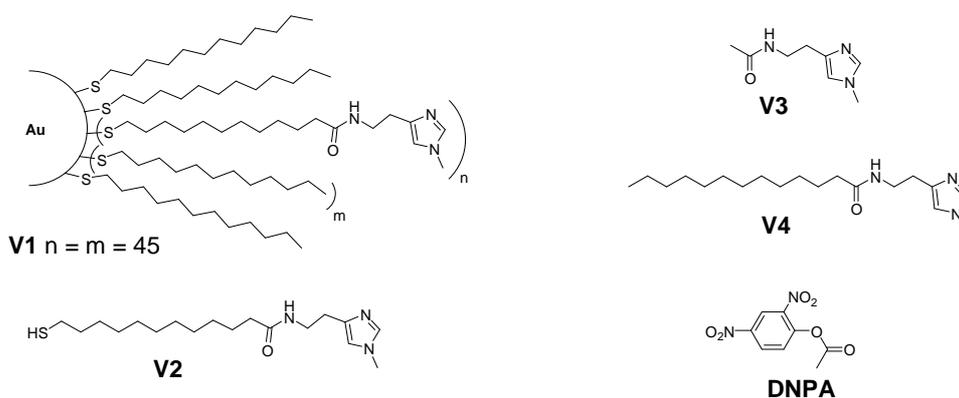


Figura 1.33: Rappresentazione schematica delle nanoparticelle usate come catalizzatore nell'idrolisi del DNPA.

Il meccanismo è di tipo cooperativo, e vede coinvolti due gruppi metilimidazolici adiacenti, mimando il comportamento dei sistemi con sito attivo preorganizzato come gli enzimi.

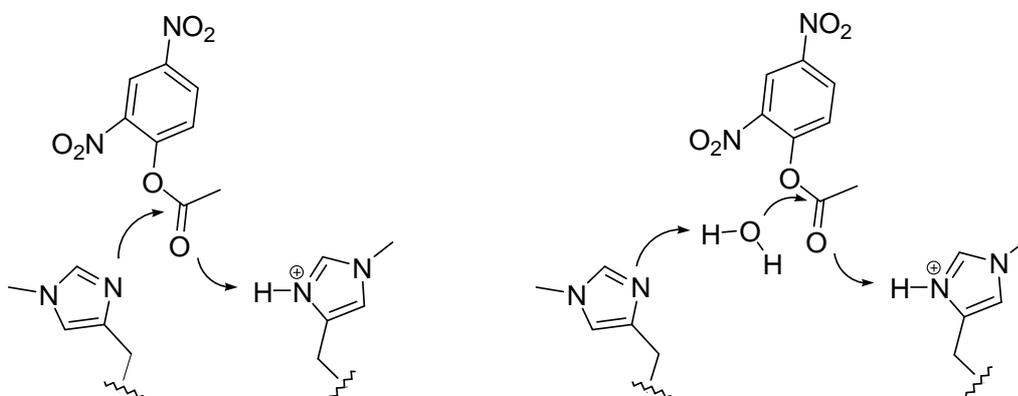


Figura 1.34: Possibili meccanismi di reazione, a sinistra nucleofilo-acido generale, a destra base generale-acido generale.

I due residui imidazolici che cooperano nella catalisi hanno però ruoli differenti. L'imidazolo neutro può infatti agire da nucleofilo attaccando direttamente il carbonile con formazione di un intermedio acil-imidazolo rapidamente idrolizzato, oppure agire da base generale attivando la molecola d'acqua; il residuo protonato invece opererà una catalisi acida generale attivando il carbonile. Entrambi i meccanismi sono in accordo con i dati sperimentali e non è attualmente possibile escludere uno dei due.

In MPCs più complessi sono stati inseriti un residuo d'istidina e un residuo di fenilalanina, elemento di lipoficità per aumentare il legame idrofobico verso i substrati e per schermare l'imidazolo dalla fase liquida; la presenza di acido carbossilico libero, presente nel sito attivo di varie proteasi, agisce da modulatore delle proprietà acido base dell'imidazolo (figura 1.35). Nella catalisi è coinvolta l'azione di due gruppi che operano come nucleofili o come basi generali¹⁰²: l'anello imidazolico dell'istidina e il gruppo carbossilato libero della fenilalanina C-terminale.

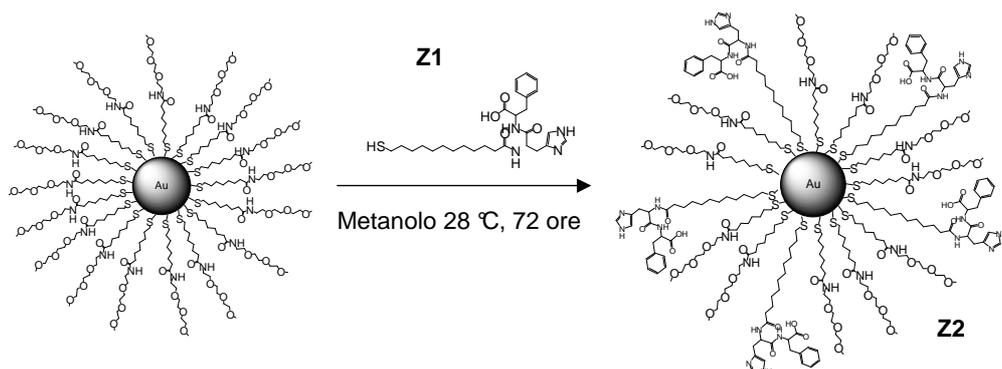


Figura 1.35: Rappresentazione schematica della sintesi delle nanoparticelle.

Tali MPCs sono stati testati come catalizzatori in reazioni d'idrolisi di esteri modello di acidi carbossilici, come *p*-nitrofenilesteri di amminoacidi *N*^α-protetti X1-3, il *p*-nitrofenilestere dell'acido nipecotico (±)-X4 e il 2,4-dinitrofenilestere dell'acido butirrico X5 (figura 1.36).

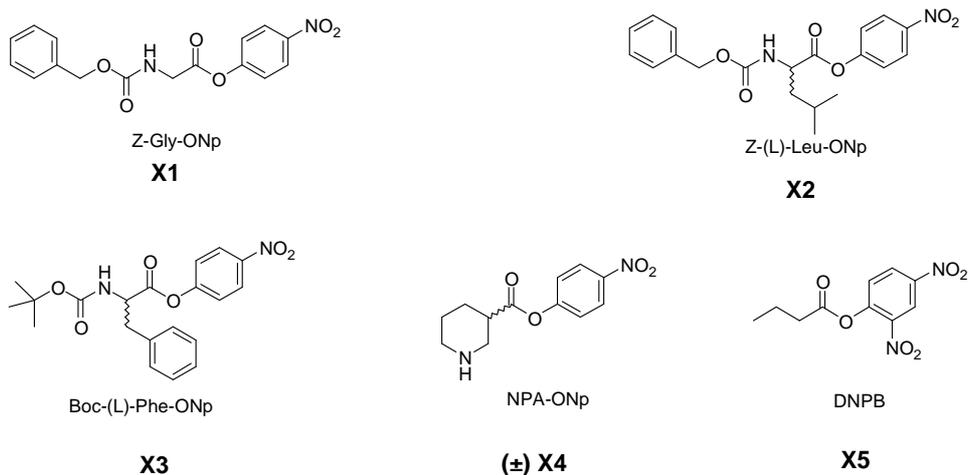


Figura 1.36: Substrati utilizzati nelle reazioni di idrolisi catalizzate dalle nanoparticelle Z2.

Come riferimento per il confronto dei dati di accelerazione tra diversi catalizzatori peptidici legati alle nanoparticelle è stato usato il semplice modello in grafico 1.1.

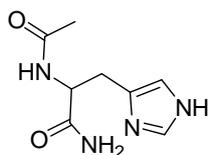


Grafico 1.1

Altro catalizzatore basato su MPCs, è un sistema portante una funzionalità triazaciclononano(TACN), il quale complessando lo Zn(II) si dimostra performante nella catalisi della reazione di transesterificazione di substrati analoghi dell'RNA (HPNP).

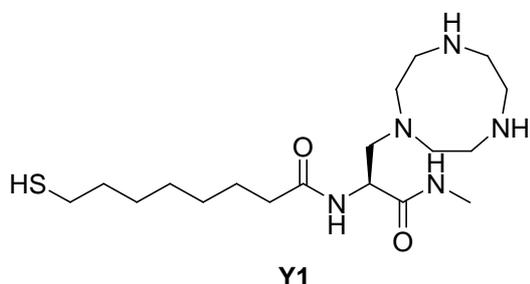


Grafico 1.2

La sintesi di questo sistema avviene a partire da nanoparticelle MPC-C8 per reazione di scambio con il tiolo Y1, ottenendo gli MPC Y2 che, attraverso titolazione con Cu(II) seguita tramite UV-Vis e stima $^1\text{H-NMR}$, sono risultati essere funzionalizzati per circa il 50% con gruppi TACN.

Oltre alla grande efficienza, con accelerazioni fino a 5 ordini di grandezza, tale sistema si è dimostrato essere cooperativo, poiché sono necessari almeno due gruppi funzionali nel processo catalitico¹⁰³, con un modello meccanicistico proposto del tipo (figura 1.37).

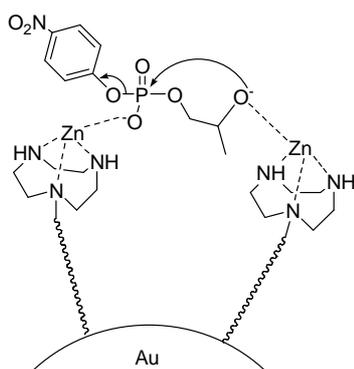


Figura 1.37: Meccanismo proposto per il sistema basato sul TACN

La prosecuzione dello studio sui sistemi enzima mimetici ha portato alla realizzazione di MPCs nei quali il tiolo è stato funzionalizzato con il dipeptide His-Phe¹⁰⁴. Gli studi condotti con il solito estere modello (HPNP) hanno messo in evidenza come queste nanoparticelle funzionali attuino un meccanismo d'azione non presente nel sistema

monometrico, dovuto al coinvolgimento del carbossilato terminale come nucleofilo (figura 1.38).

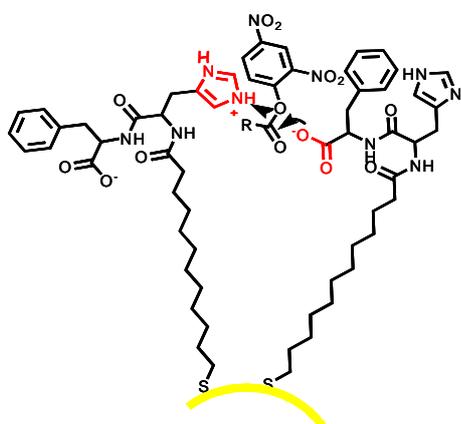


Figura 1.38: idrolisi cooperativa di HPNP operata da istidine.

L'allungamento della catena del dipeptide a formare un dodecapeptide ha permesso di realizzare il primo esempio di proteina sintetica ottenuta per autoassemblaggio su di un nocciolo di oro¹⁰⁵. Questo sistema è assai complesso, avendo un peso molecolare della parte organica (ca. 150 kDalton) confrontabile con quella di una proteina di media grandezza. Questo sistema ha presentato proprietà catalitiche molto simili a quelle dei precedenti MPCs funzionalizzati con un dipeptide, ma la pluralità dei gruppi funzionali ha introdotto significative accelerazioni anche a valori di pH basici. Inoltre l'estere dell'amminoacido leucina agisce come agente in grado di controllare l'attività di questo enzima sintetico, una proprietà che si incontra di frequente nei sistemi enzimatici naturali. Infatti, al di sotto di una certa concentrazione critica, gli MPCs presentano un meccanismo idrolitico in un unico stadio senza formazione di intermedi; al di sopra di questa concentrazione, si forma un intermedio di acilazione dell'imidazolo di His la cui idrolisi diventa il processo che controlla la velocità della reazione.

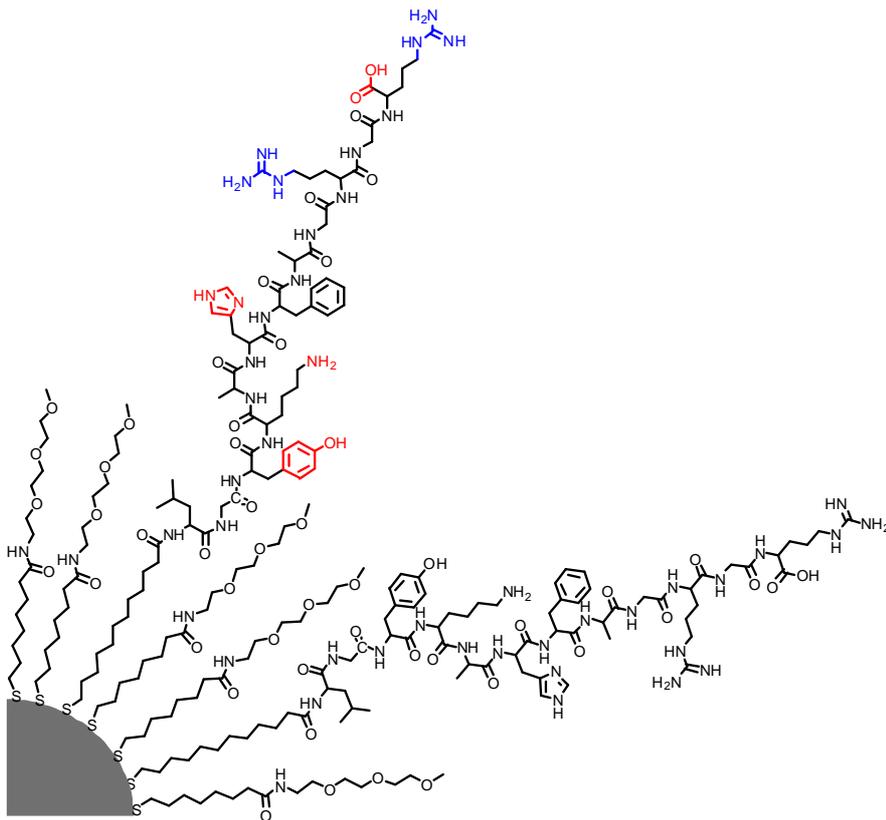


Grafico 1.3

Presso il gruppo di ricerca dove sto svolgendo il dottorato è stato dimostrato come AuNPs ricoperte da un monostrato organico possano fungere da catalizzatori biomimetici molto efficaci: avendo infatti funzionalità simili alle proteine tali sistemi hanno un comportamento catalitico che può ricalcare quello degli enzimi, per cui possono essere definiti dei “nanozimi”. L’aumento di reattività deve essere quindi dovuto non solo ad effetti di concentrazione locale, ma anche all’instaurarsi di un meccanismo cooperativo in cui i gruppi hanno un ruolo diverso da quello che si riscontra in un meccanismo non cooperativo¹³³. Una catalisi di tipo cooperativo si ha quindi solo se la reazione può avvenire con un meccanismo che preveda l’interazione di più gruppi, e il tipo di catalizzatore multivalente è molto importante in questo proprio perché deve porre le unità catalitiche vicine tra loro in modo che possano interagire in modo ottimale.

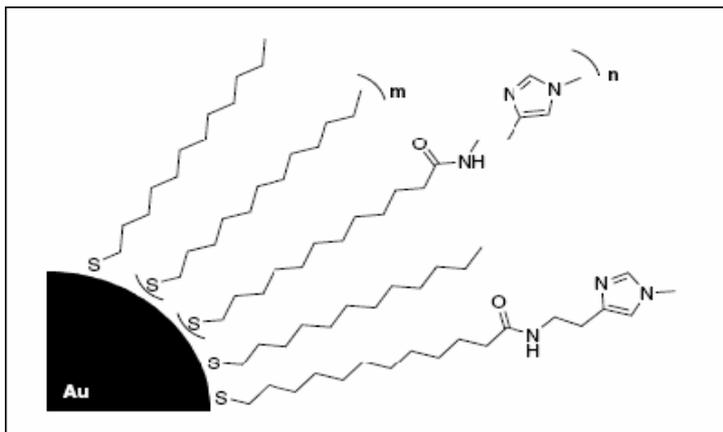


Figura 1.39: AuNPs funzionalizzata con gruppi imidazolici

L'inserimento di opportuni peptidi ha portato all'ottenimento di catalizzatori attivi per l'idrolisi di esteri carbossilici¹³⁴; un esempio è l'idrolisi di esteri carbossilici catalizzata da gruppi imidazolici, tramite un meccanismo cooperativo in cui l'imidazolo può agire sia da nucleofilo che tramite una catalisi acido-base generale.

La ricopertura delle AuNPs con tioli funzionalizzati con leganti per ioni Zn^{2+} ha invece permesso di ottenere degli ottimi catalizzatori per l'idrolisi di diesteri fosforici¹³⁵. I diesteri dell'acido fosforico, come DNA, RNA, ATP, etc., sono biologicamente molto importanti. Essi presentano difficoltà nell'idrolisi dovuta alla presenza di una carica negativa che ha un effetto repulsivo nei confronti di un attacco nucleofilo al carbonile. Il legame estereo del DNA ha un tempo di emivita a pH 7 stimato nell'ordine dei 10^{11} anni, mentre per l'RNA la velocità di idrolisi rispetto al DNA è superiore di circa 10^9 volte, a causa di un diverso meccanismo di idrolisi: nell'RNA la presenza dell'idrossile in posizione 2' permette infatti un attacco intramolecolare al fosfato. In natura esistono comunque numerosi enzimi in grado di catalizzare l'idrolisi in modo veloce, capacità spesso derivante dalla presenza nel sito attivo di due o più ioni metallici posti vicini tra loro che agiscono in modo cooperativo nel meccanismo catalitico.

Nei sistemi artificiali quindi per ottenere reattività elevate due ioni metallici vengono complessati in modo da trovarsi vicini tra loro¹³⁶. Monostrati formati da tioli funzionalizzati con triazaciclononano (TACN) complessante Zn^{2+} presentano infatti elevata attività catalitica. I complessi TACN- Zn^{2+} all'estremità esterna del monostrato si trovano sufficientemente vicini da avere attività cooperativa nell'idrolizzare substrati quali HPNPP (p-nitrofenil-2-idrossipropil-fosfato), composto modello per RNA. Caratteristica che rende tali complessi così efficaci è in primo luogo la vicinanza tra i gruppi funzionali presenti sulla superficie, che favorisce la cooperatività tra essi

permettendo meccanismi catalitici assenti nei rispettivi monomeri. Questo, unito all'ambiente apolare generato dal monostrato metallico, favorisce la catalisi così come essa avviene nel sito attivo degli enzimi.

Il gruppo di Scrimin ha posto in soluzione AuNPs, funzionalizzate con TACN, in presenza di HPNPP in largo eccesso, quindi in condizioni di saturazione. Mediante titolazioni con Zn^{2+} è stato verificato che l'attività catalitica del sistema aumentava in modo sigmoidale. Questo andamento indica che l'azione idrolitica sul substrato viene realizzata da due complessi TACN- Zn^{2+} vicini che operano cooperativamente.

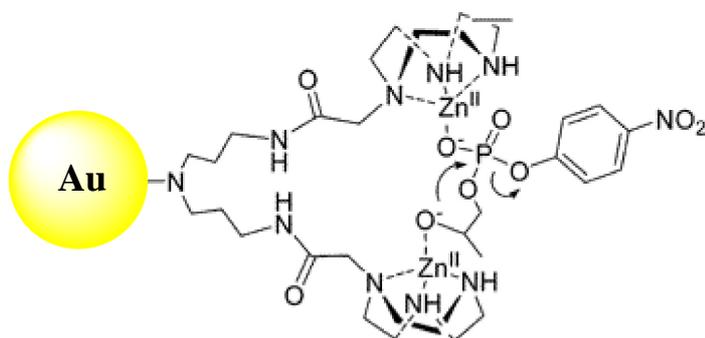


Figura 1.40: idrolisi cooperativa TACN- Zn^{2+} di HPNPP.

1.5 - SCOPO

Come visto nel primo capitolo la sintesi dei nuclei d'oro e la loro copertura con un monostrato organico formato da tioli sono operazioni semplici da eseguire. L'autoassemblaggio permette alle nanoparticelle funzionalizzate di essere ottenute semplicemente miscelando i componenti. Più complesso, invece, è il processo di purificazione, per separare le nanostrutture dai reagenti e dai surfattanti utilizzati nella sintesi, come anche i tioli in eccesso rimasti in soluzione. La purificazione può essere fatta per estrazione chimica, per precipitazione delle nanoparticelle seguita da centrifugazione, oppure tramite passaggio su resina a esclusione dimensionale. Spesso, però, uno solo di questi passaggi non è sufficiente: sono necessari molteplici usi di una di queste tecniche, oppure la loro combinazione (estrazione o precipitazione seguite da gel filtrazione, ad esempio). Ovviamente, per ogni tipo di nanoparticelle con un particolare monostrato organico è necessario un procedimento di sintesi seguito da uno o più procedimenti di purificazione, con un notevole dispendio di tempo. Sarebbe quindi interessante ideare un protocollo che permettesse di ottenere una grande diversità di nanoparticelle funzionalizzate in un unico procedimento di sintesi e di purificazione, per

modificarle successivamente con reazioni compatibili con la stabilità del sistema. Questo permetterebbe di risparmiare sui procedimenti di sintesi, ottenendo un prodotto che possa essere funzionalizzato con i gruppi funzionali o le molecole d'interesse al momento del bisogno. Inoltre permetterebbe la formazione di librerie combinatorie di nanoparticelle eterofunzionalizzate (figura 1.41).

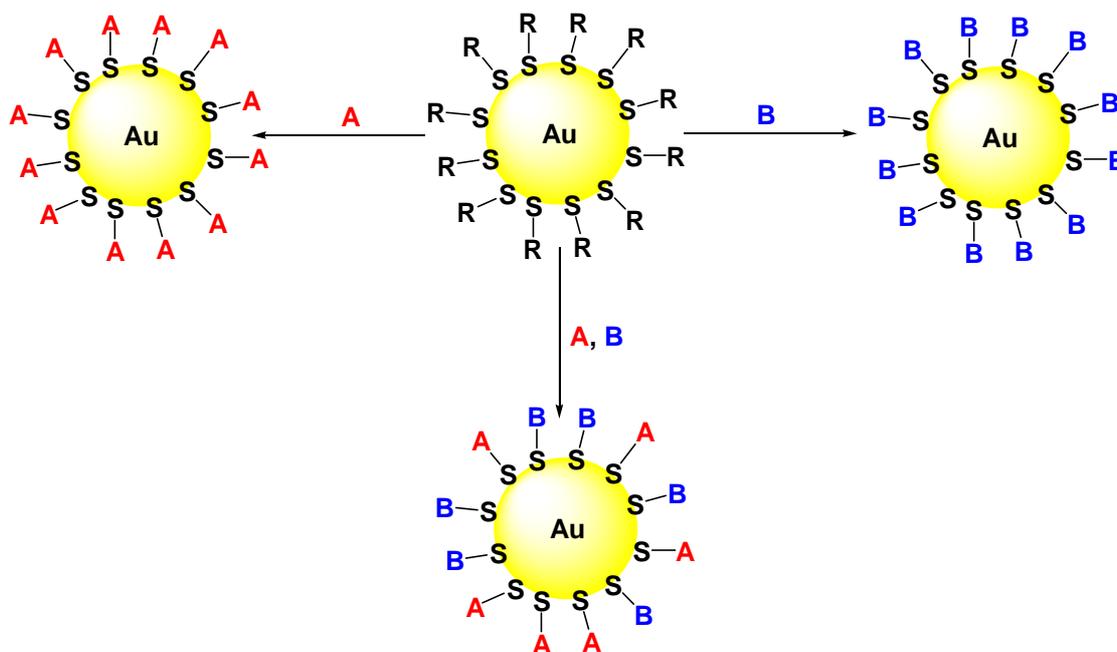


Figura 1.41: post-funzionalizzazione di AuNPs generiche (R) con diverse molecole o gruppi funzionali da soli o miscelati.

Un sistema del genere prevede la sintesi di nanoparticelle già passivate con il medesimo monostrato organico, il quale deve possedere gruppi funzionali che gli permettano di subire delle modificazioni chimiche. Queste modifiche devono avvenire con reazioni semplici, quantitative, ed essere compatibili con la stabilità del sistema nanoparticellare.

Lo scopo di questo progetti di ricerca è quello di ottenere un protocollo semplice per la sintesi e la purificazione di tali nanoparticelle “universali”, le quali siano anche stabili nel tempo. La possibilità di utilizzare una post-funzionalizzaizone mista, con diverse molecole miscelate assieme, potrà inoltre essere estremamente utile nella creazione di sistemi multivalenti artificiali eterofunzionalizzati. La coesistenza sulla superficie nanoparticellare di molecole di riconoscimento e di sonde chemiluminescenti potrebbe permettere, ad esempio, la creazione di sistemi diagnostici in vitro. Esso potrebbe riguardare, ad esempio, la rivelazione di cellule tumorali.

SCCA (antigene del carcinoma a cellule squamose) è una proteina di membrana che risulta sovraespressa nelle cellule tumorali epatiche. Tale proteina risulta essere legata in modo specifico dalla proteina pre-S1 HBVm, la quale ricopre il virus dell'epatite B. Selezionando il suo frammento di riconoscimento, ossia il peptide preS1 (21-47), la specificità antigenica risulta essere mantenuta. Sistemi basati sul peptide preS1 (21-47) sono già stati ampiamente utilizzati da parte dell'azienda Xeptagen Spa per riconoscere antigeni endoteliali tumorali. In questa sede è stato notato che, qualora il peptide si trovi in forma multimerica, la sua interazione con la proteina SCCA aumenta, per un fenomeno di multivalenza. Se il medesimo peptide fosse organizzato sulla superficie di nanoparticelle d'oro, le sue proprietà multivalenti sarebbero probabilmente incrementate, aumentando ulteriormente la sua capacità di riconoscimento specifico.

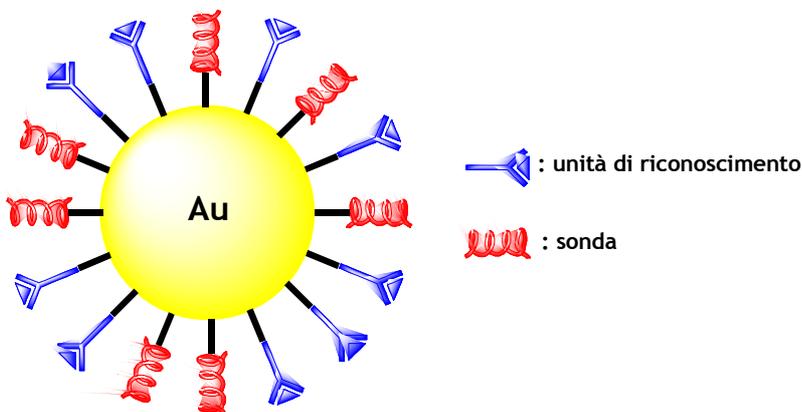


Figura 1.42: ipotetico sistema di riconoscimento eterofunzionalizzato.

Riuscire a sintetizzare un metodo diagnostico basato su nanoparticelle d'oro "universali", eterofunzionalizzate in modo che siano in grado di riconoscere specificatamente le cellule tumorali epatiche ma anche di segnalarle, sarebbe un ottimo test di verifica per dimostrare le potenzialità del sistema. La possibilità di creare librerie di nanoparticelle funzionalizzate contenenti anche frammenti di peptide preS1 può inoltre servire a verificare quale sua parte è responsabile del legame.

2 - POST-FUNZIONALIZZAZIONE COVALENTE di NANOPARTICELLE d'ORO RICOPERTE con un MONOSTRATO di MOLECOLE ORGANICHE

2.1 - INTRODUZIONE

Le nanoparticelle d'oro sono strutture facilmente funzionalizzabili con un monostrato organico di tioli, il tutto sintetizzabile tramite un semplice processo di auto-assemblaggio. I tioli del monostrato, oltre a determinare la solubilità delle nanoparticelle, possono portare all'estremità terminale esterna dei gruppi funzionali; questi possono conferire alle NPs capacità catalitica (nanozimi)⁷⁷, proprietà di riconoscimento molecolare (anticorpi sintetici)¹⁰⁶ oppure reattività chimica, come discusso nel capitolo 1. Questa reattività può essere sfruttata per attuare post-funzionalizzazione, come descritto più avanti. Si sintetizzano delle nanoparticelle "generiche", aventi un particolare gruppo funzionale sulla superficie esterna del monostrato, e in un secondo tempo si vanno a legare al sistema le molecole di interesse. Ovviamente le reazioni sfruttate a questo scopo devono essere semplici e compatibili con la stabilità dei nuclei d'oro e dei legami oro-zolfo. Questo tipo di procedura è stata utilizzata in passato, sfruttando ad esempio la formazione di esteri tra gruppi carbossilici posti all'estremità esterna dei tioli e gruppi amminici di varia natura, con attivazione *in situ* dei gruppi carbossilici¹⁰⁷. Altri tipi di post-funzionalizzazione hanno sfruttato la sostituzione nucleofila alchilica su NPs con tioli bromurati¹⁰⁷ piuttosto che reazioni di tipo click come quella tra un'azide e un gruppo alchidico in ambiente ossidante¹⁰⁸.

Per ottenere nanoparticelle semplici sia da sintetizzare che da post-funzionalizzare, è stato deciso di sviluppare una nuova procedura che fosse compatibile con le nanoparticelle. Per farlo è stato scelto di utilizzare la semplice chimica di formazione di legami imminici o idrazoni dovuta alla condensazione di gruppi aldeidici con ammine primarie o con idrazidi.

Ricoprendo le nanoparticelle d'oro con tioli che presentano gruppi aldeidici all'estremità esterna, esse possono poi essere funzionalizzate con qualsiasi tipo di ammina o idrazide semplicemente tramite un processo di mescolamento. Questo

consentirebbe la funzionalizzazione delle nanoparticelle con praticamente qualsiasi molecola opportunamente modificata, e in qualsiasi momento dopo la loro sintesi.

Lo scopo ultimo di questo progetto è quello di sviluppare una strategia rapida ed efficiente tramite la quale funzionalizzare il monostrato di nanoparticelle d'oro con svariate specie peptidiche, quali possono essere il preS1 per il riconoscimento delle cellule cancerose¹³⁷, molecole di permeabilità della membrana, ad azione diagnostica o chemioterapica. Dal momento che i peptidi sono ricchi in gruppi amminici, le AuNPs funzionalizzate con aldeidi si prestano bene a una tale post-funzionalizzazione.

Si vuole quindi mettere a punto un protocollo che preveda di utilizzare reazioni chimiche quantitative per ottenere nanoparticelle definibili come “universali”. Con un unico processo sintetico e un'unica purificazione (tramite cromatografia ad esclusione dimensionale o precipitazione) si potrà ottenere una qualsiasi quantità di nanoparticelle tutte identiche tra loro, funzionalizzabili al momento del bisogno in modo rapido e quantitativo sfruttando i gruppi funzionali d'interesse opportunamente adattati.

2.2 - RISULTATI e DISCUSSIONE

2.2.1 - COPERTURA di AuNPs con ALDEIDI AROMATICHE

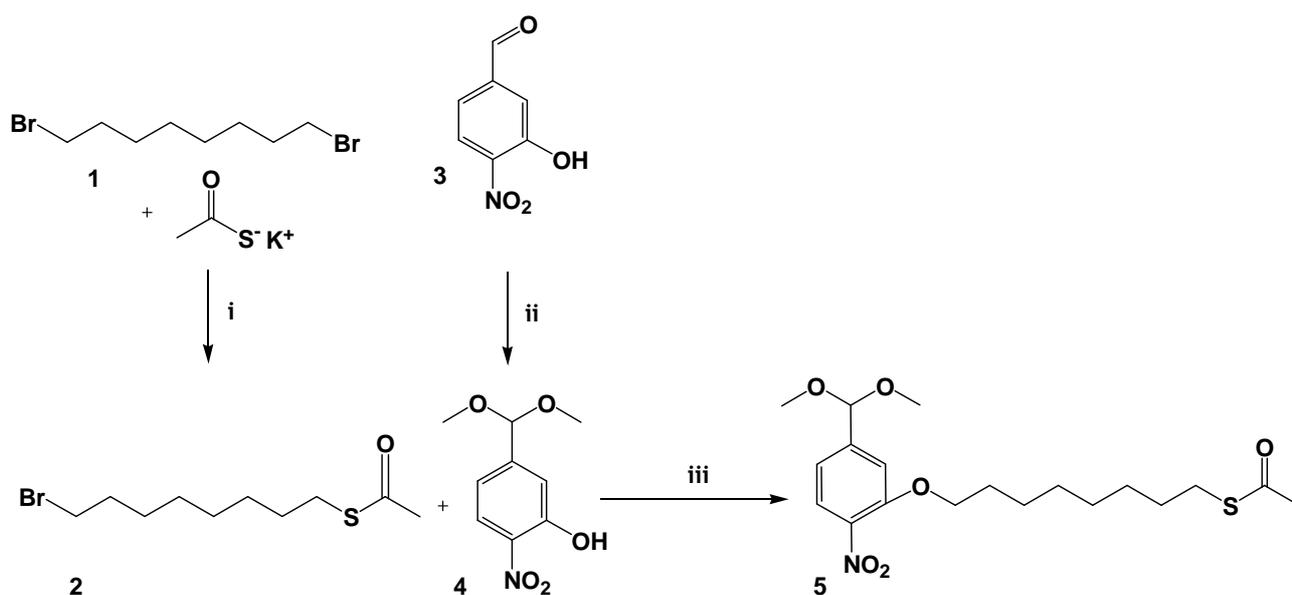
Il modo scelto per raggiungere lo scopo è stato l'utilizzo di tioli presentanti, all'altra estremità, un gruppo aldeidico, in modo che esso fosse esposto sulla superficie del monostrato una volta formato sulle AuNPs. Per avere però reattività sufficiente al rapido e forte legame con i gruppi amminici, è stato prescelto l'uso di aldeidi di tipo aromatico. La coniugazione degli elettroni π imminici con la nube elettronica dell'anello aromatico conferisce infatti alle immine ottenute con aldeidi aromatiche una stabilità termodinamica superiore rispetto all'uso di corrispondenti aldeidi alifatiche.

L'uso di gruppi aldeidici e tiolici assieme ha imposto come necessaria la protezione dei gruppi funzionali: operando con tioli e aldeide liberi si otterrebbe, come unico risultato, l'attacco al carbonio elettrofilo del carbonile da parte del gruppo SH, nucleofilo, dando luogo ad una reazione di polimerizzazione. La protezione prescelta deve essere stabile nelle condizioni di reazione alle quali saranno sottoposti i composti, ma deve essere successivamente rimovibile in condizioni blande, senza destabilizzare le nanoparticelle stesse.

2.2.1.1 - Sintesi di AuNPs *p*-nitrobenzaldeide

L'uso di aldeidi di tipo aromatico rispetto alle corrispettive alifatiche permette di sfruttare la loro maggiore reattività al fine di ottenere nanoparticelle post-funzionalizzabili tramite chimica covalente dinamica. Per questo è stato deciso di utilizzare tioli dotati di un gruppo aldeidico aromatico come gruppo funzionale, con in più la presenza di un nitrogruppo in posizione para al carbonile. L'effetto elettron-attrattore di tale gruppo attiva l'aldeide aromatica nei confronti degli attacchi nucleofili. Si è dunque partiti da 3-idrossi-4-nitro-benzaldehyde (composto 3) dissolta in metanolo, alla quale è stata aggiunta una soluzione di HCl 1.25 M in metanolo. Eliminato il solvente per evaporazione, è stato recuperato l'acetale puro (composto 4) con resa quantitativa. Contemporaneamente, il composto 2 è stato ottenuto per sostituzione nucleofila, con tioacetato di potassio, partendo dal composto 1.

Infine il composto 5 è stato ottenuto tramite eterificazione tra i composti 2 e 4, in presenza di K_2CO_3 come base (schema 2.1).



Schema 2.1: sintesi convergente di tiolo con aldeide aromatica protetti: i) K_2CO_3 ; ii) MeOH; iii) K_2CO_3 .

Prima della ricopertura delle AuNPs è stato necessario rimuovere il gruppo protettore dalla funzionalità SH, in modo da permettere la formazione del legame Au-S. Il composto 5 è stato quindi liberato dal gruppo acetile in ambiente alcalino deossigenato, evitando la formazione di disolfuri. È stato ottenuto il composto 6, come confermato dalla risposta positiva al test di Ellman e dalla spettroscopia NMR protonica (figura 2.1). Nello spettro si possono notare chiaramente l'assenza del segnale dell'aldeide a 10 ppm,

la presenza del segnale dell'acetale a circa 5,3 ppm e l'assenza del segnale dell'acetile a 2,3 ppm.

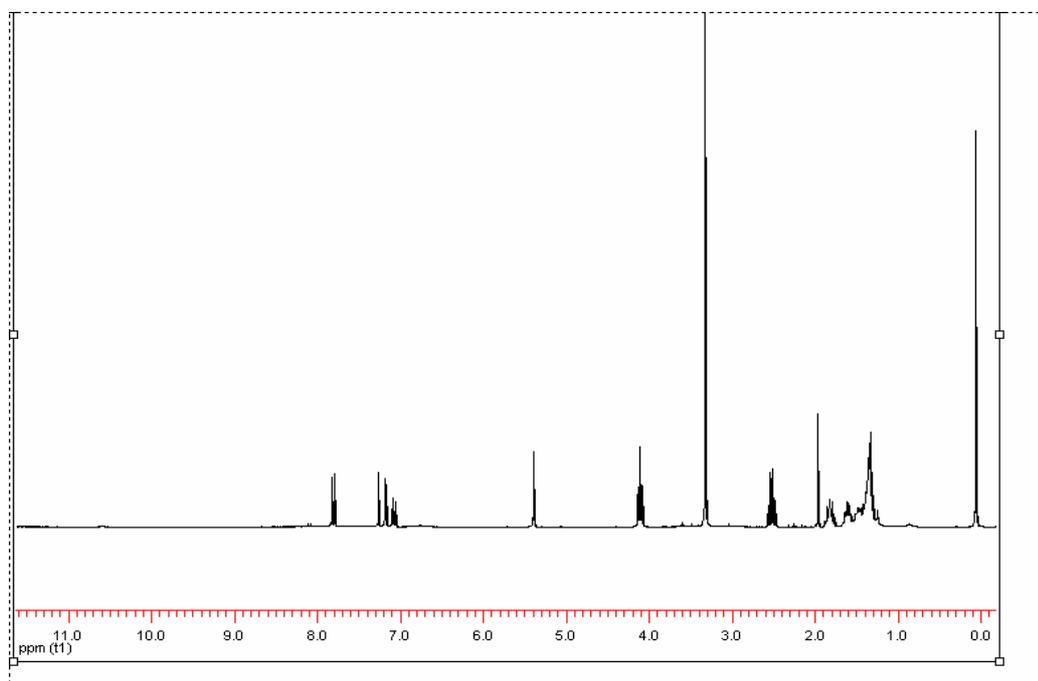
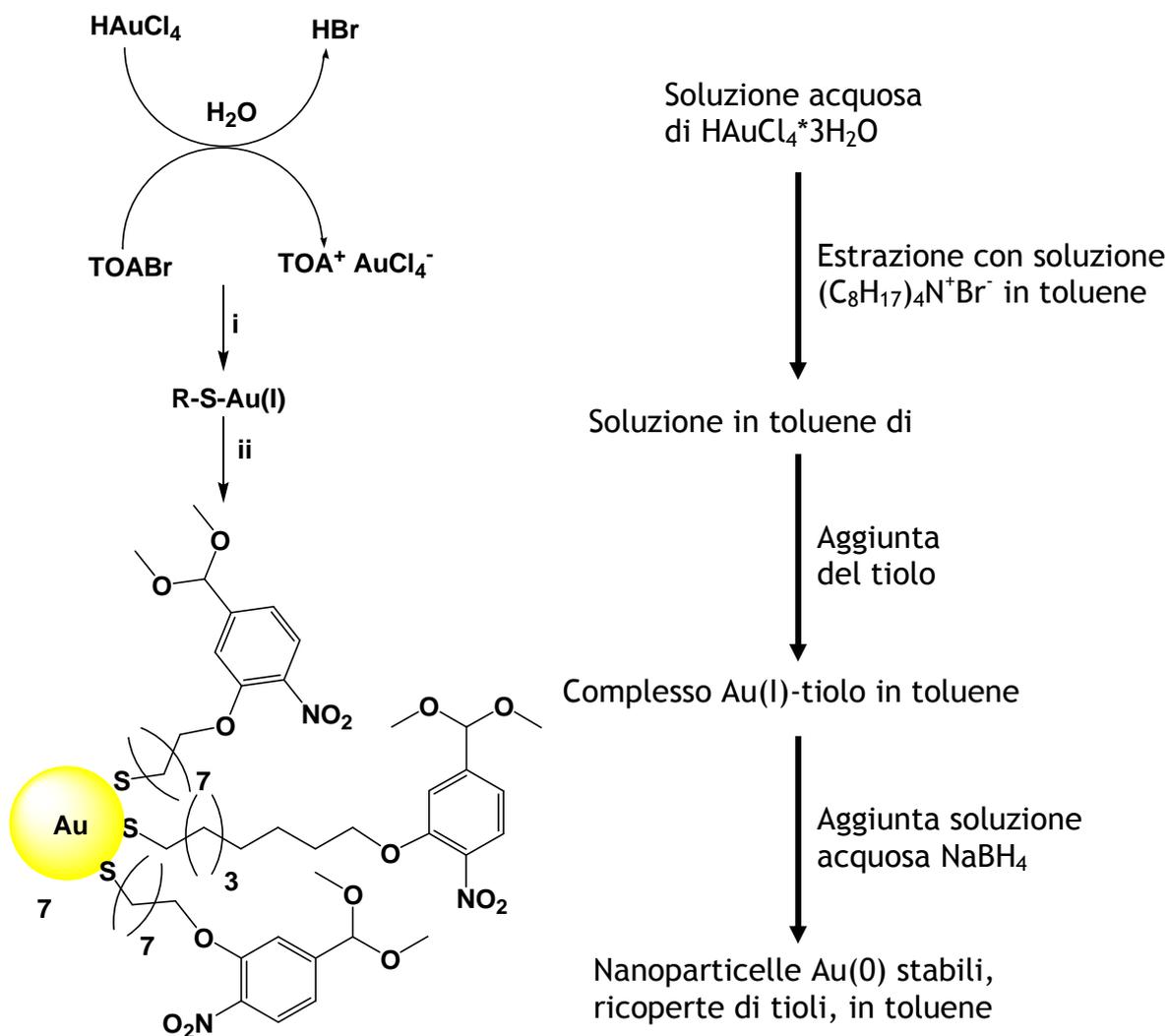


Figura 2.1: spettro $^1\text{H-NMR}$ del tiolo **6** (CDCl_3 , 250 MHz, 25 °C).

Col tiolo **6** sono state sintetizzate le nanoparticelle col metodo di Brust e Schiffrin¹³⁸. Questo protocollo prevede che l' Au(III) , in forma di tetracloroaurato e solubile in acqua, venga portato in fase organica in forma di sale di tetraottilammonio, un trasferitore di fase. A tale soluzione viene aggiunto il tiolo col quale si vogliono ricoprire le costituenti nanoparticelle (in questo caso, il tiolo **6**): esso deve essere in molarità doppia rispetto all'oro pesato, in modo da ridurre efficacemente l' Au(III) ad Au(I) , legandovisi. Successivamente, alla miscela viene aggiunto un agente riducente quale NaBH_4 . Esso è in soluzione acquosa, e agendo all'interfaccia toluene-acqua riduce l' Au(I) ad Au(0) . Malgrado la riduzione avvenga in fase eterogenea, essa è estremamente rapida, con formazione delle nanoparticelle in soluzione, già ricoperte dai tioli (schema 2.2). La riduzione è talmente rapida da essere influenzata dalla velocità di aggiunta del riducente, con conseguenze sulla dimensione finale delle nanoparticelle. Le AuNPs finali sono infatti tanto più piccole quanto maggiore la velocità di aggiunta del riducente, a causa della formazione contemporanea di un maggior numero di centri di aggregazione. Ottenute le nanoparticelle volute (**7**), esse sono recuperate per centrifugazione dopo precipitazione in etanolo a -18°C .



Schema 2.2: sintesi generale secondo il metodo di Brust-Schiffin di AuNPs ricoperte col tiolo 6: i) R-SH (tiolo 6); ii) NaBH₄.

Le nanoparticelle così ottenute sono state caratterizzate con ¹H-NMR a gradiente di campo (Figura 2.2). Rispetto ad un'analisi NMR tradizionale, in cui il campo magnetico B₀, parallelo al vettore di magnetizzazione, viene mantenuto costante, con questa tecnica viene imposto un gradiente monodimensionale del campo B₀ in una sequenza particolare di impulsi. La sequenza ha inizio con un impulso del campo di eccitazione B₁ per ruotare il vettore magnetizzazione di 90°, parallelo al piano xy, e a questa operazione segue velocemente la realizzazione di un gradiente del campo B₀ lungo l'asse z per un dato intervallo di tempo δ. Quindi, dopo un tempo Δ viene imposto un nuovo impulso di B₁ a 180° con lo scopo di rifocalizzare tutti gli spin, ed infine che si abbia un nuovo gradiente lineare di B₀. Questa successione di operazioni consente di registrare

selettivamente solo i segnali di quelle molecole che, avendo elevate dimensioni, diffondono a bassa velocità e quindi rispondono più lentamente alle variazioni del campo magnetico. In uno spettro di questo tipo, come quello mostrato, i segnali dei tioli legati all'oro risultano allargati in modo caratteristico. Si può notare la presenza dei segnali dell'acetale a 5.3 e a 3.2 ppm.

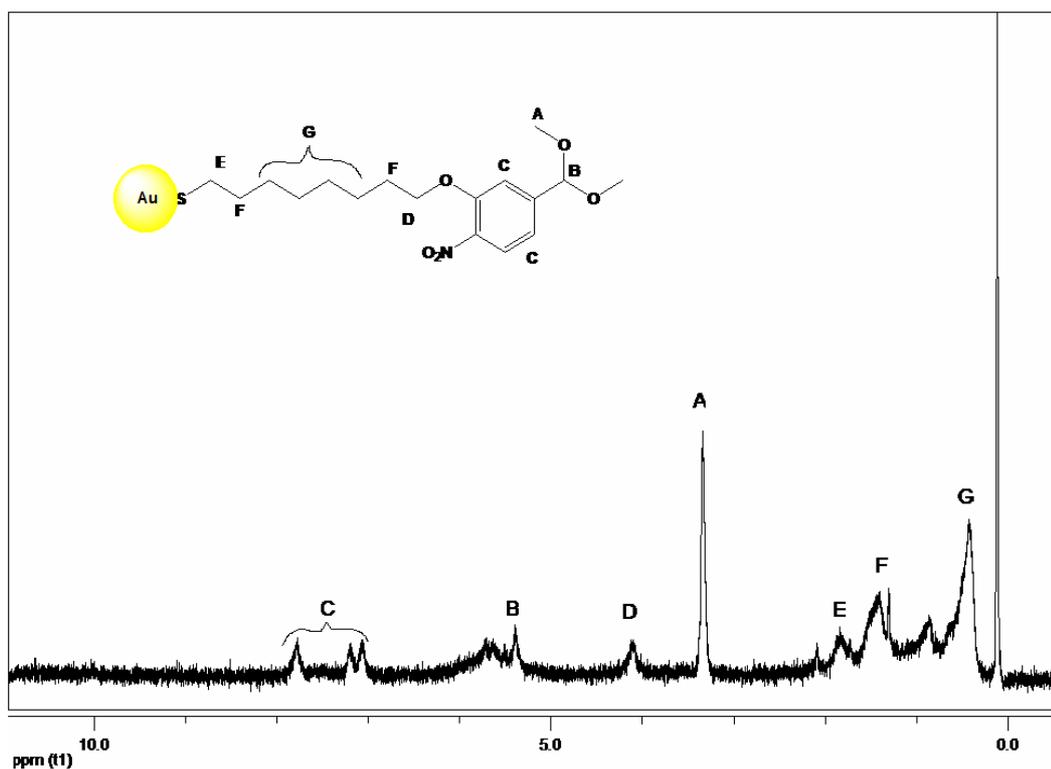


Figura 2.2: spettro ¹H-NMR a gradiente di campo delle AuNPs 7 (CDCl₃, 250 MHz, 25 °C).

A questo punto è stato necessario liberare l'aldeide dal gruppo protettore, così da ottenere nanoparticelle sulle quali testare la propria capacità di legame con gruppi amminici di varia natura. Per la rimozione del gruppo dimetil-acetale sono state seguite varie strade, ponendo le nanoparticelle in diverse miscele in differenti condizioni di acidità. Non è stato ottenuto l'esito sperato: procedendo all'analisi NMR del residuo è infatti emerso che soltanto in un caso si è avuto il distacco parziale del gruppo protettore acetale (figura 2.3), visto l'abbassamento del suo segnale a 5.5 ppm e la comparsa del segnale aldeidico a 10 ppm. Negli altri casi, invece, i tioli si sono staccati dalle nanoparticelle dando aggregazione dei nuclei, formando delle placche, oppure non è accaduto nulla.

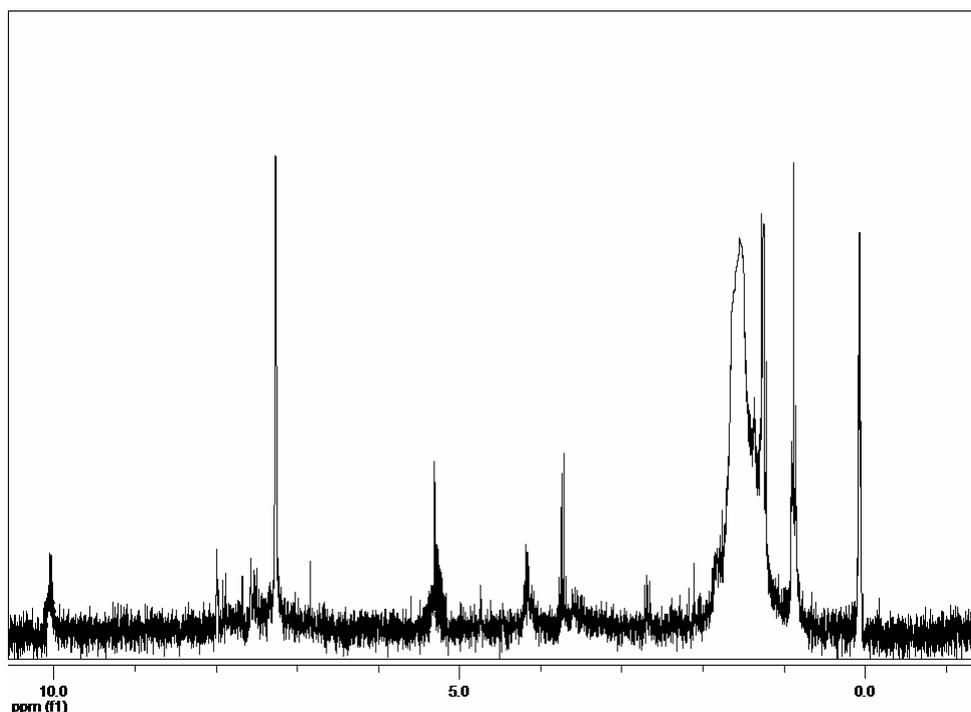


Figura 2.3: spettro $^1\text{H-NMR}$ delle AuNPs **7** sottoposte a trattamento acido (CDCl_3 , 250 MHz, 25°C).

2.2.1.2 - Formazione di idrazoni

Vista l'estrema difficoltà nella liberazione del gruppo aldeidico, è stata tentata la possibilità di “spingere” l'equilibrio di rottura dell'acetale tramite sottrazione del prodotto. Aggiungendo in soluzione idrazidi di varia natura, esse avrebbero dovuto legarsi con l'aldeide appena liberata. Per quanto in piccola quantità, avrebbero potuto sottrarre prodotto all'equilibrio di liberazione dell'aldeide: esso si sarebbe quindi spostato verso i prodotti. Sono state utilizzate etanidrazide trimetilammonio cloruro (**8**, Girard reagent T) e idrazide fenilacetica (**9**), la prima molto polare a causa della carica cationica e la seconda estremamente lipofila a causa dell'anello aromatico (grafico 2.1).



Grafico 2.1

Innanzitutto è stata verificata la capacità del composto **8** nel legare l'aldeide in fase eterogenea. Dissolte le nanoparticelle **7** in cloroformio e il composto **8** in acqua, le fasi sono state riunite e acidificate a pH 5 con acido cloridrico. L'acido catalizza la rottura

dell'acetale con liberazione dell'aldeide, la quale seppur in minima quantità dovrebbe legarsi all'idrazide presente all'interfaccia tra fase organica e acquosa. Una volta formato l'idrazone, la polarità della carica ammonica dovrebbe modificare la solubilità dell'intera nanoparticella, trascinandola in acqua e sottraendola così all'equilibrio di rottura dell'acetale. Le nanoparticelle conferiscono una colorazione nera alla soluzione nella quale si trovano, e questo permette una valutazione immediata del trasferimento di fase. La reazione non è avvenuta: effettuando aggiunte maggiori di idrazide alla miscela nessun cambiamento si è manifestato. Evidentemente il gruppo aldeidico non è stato liberato in quantità tale da trasferire le AuNPs nella fase acquosa. Il residuo ottenuto dall'eliminazione della fase organica è stato quindi analizzato all'NMR con gradiente di campo. Nello spettro NMR è possibile notare la persistenza dei segnali tipici dell'acetale aldeidico (figura 2.4) a 3.4 ppm e a 5.5 ppm, oltre alla quasi totale assenza del segnale dell'idrogeno legato al carbonio idrazonico, a 8 ppm.

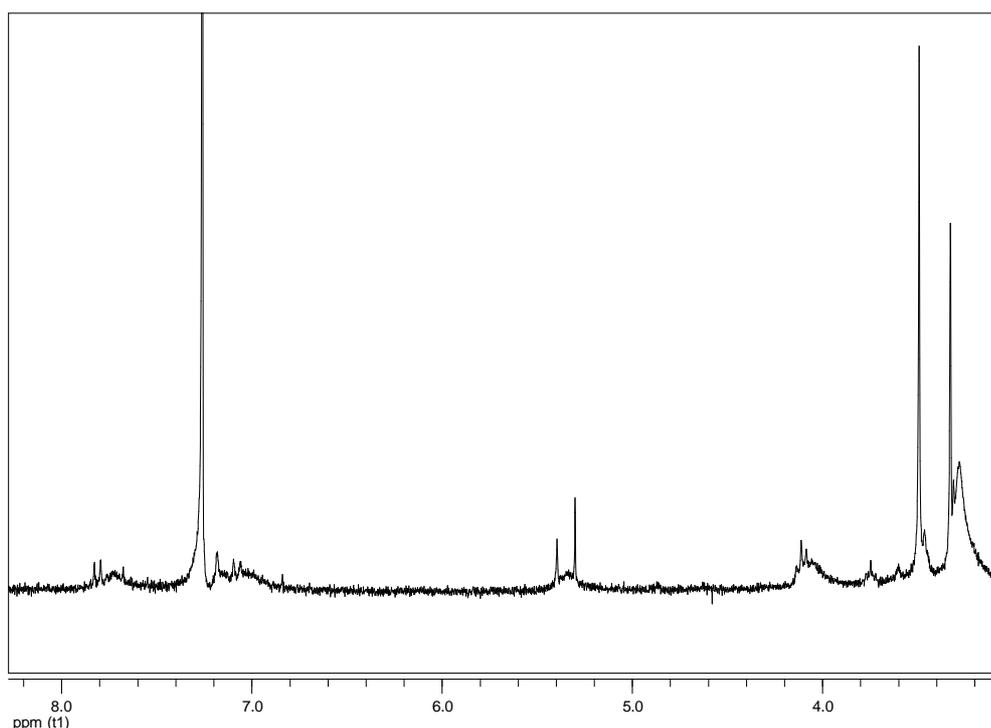


Figura 2.4: spettro ^1H -NMR delle AuNPs **7** aggiunte di composto **8** (MeOD, 300 MHz, 25°C).

È stato quindi provato l'uso della medesima idrazide, ma in fase omogenea. Nanoparticelle **7** e composto **8** sono stati entrambi dissolti in metanolo, dove sono state aggiunte successivamente alcune gocce di TFA, lasciando la miscela in agitazione. Non vi sono state variazioni macroscopiche nell'aspetto della miscela; dopo eliminazione del

solvente e analisi del residuo con NMR a gradiente di campo è stato appurato come non fosse accaduta alcuna reazione sulla superficie delle nanoparticelle.

Con idrazide fenilacetica si è proceduto in modo analogo, verificando la sua capacità nel favorire lo scambio idrazide-acetale sia in fase omogenea che in fase eterogenea.

Sono state quindi dissolte nanoparticelle **7** in diclorometano, assieme al composto **9**; dopo aggiunta di acido acetico fino al 15% dell'intero volume, la miscela è stata lasciata in agitazione per una notte a temperatura ambiente. Non sono state notate macroscopiche variazioni nel colore o nello stato delle nanoparticelle. Dopo eliminazione del solvente, le nanoparticelle sono state analizzate con NMR normale e con NMR a gradiente di campo. Dall'analisi degli spettri si è visto che effettivamente l'ambiente fortemente acido ha favorito la rottura dell'acetale e la formazione dell'idrazone fenilacetico. Questo è avvenuto solamente parzialmente, come notato dalla coesistenza nel medesimo spettro dei segnali dell'acetale (5.5 ppm) e dell'idrazone (8 ppm), suggerendo che una maggior acidità, un maggior tempo di reazione o una maggior temperatura di reazione potessero portare al risultato desiderato (figura 2.5).

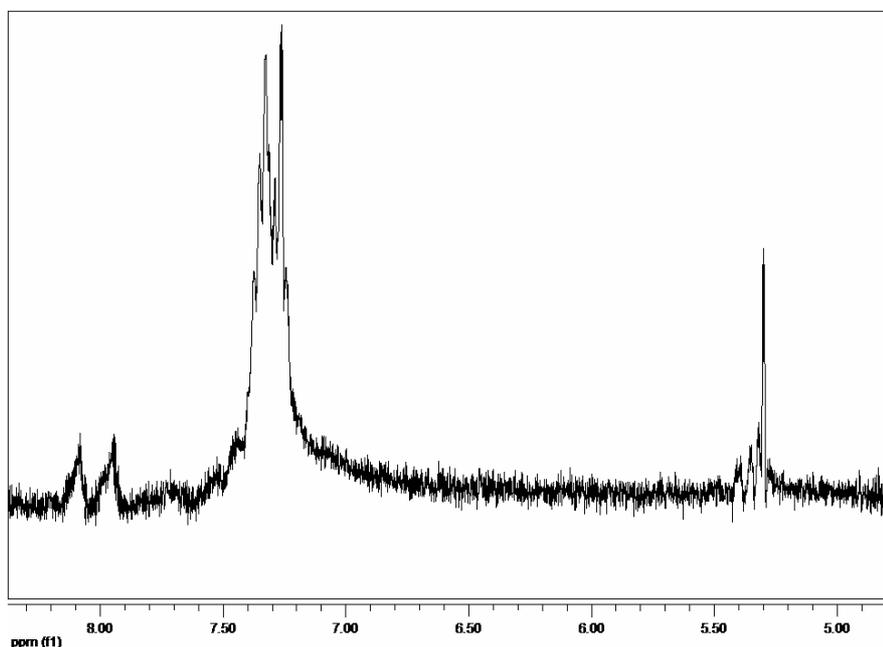


Figura 2.5: spettro ^1H -NMR delle AuNPs **10** (CDCl_3 , 300 MHz, 25°C).

Purtroppo l'analisi NMR ha anche rivelato il parziale distacco dei tioli dalla superficie delle nanoparticelle, fattore confermato anche dall'aggregazione nanoparticellare.

L'ambiente acido richiesto per superare l'elevata stabilità dell'acetale si è rivelato quindi eccessivo per la sopravvivenza del sistema oro-tiolo.

Si è quindi proceduto con l'utilizzo di idrazide fenilacetica in fase eterogenea. Tale scelta non è derivata dallo stesso principio che aveva spinto l'uso, in questo modo, del composto **8**: infatti l'idrazide fenilacetica non è così polare da trascinare le nanoparticelle, una volta legate, in acqua. Piuttosto si è tentato di sfruttare la presenza dell'idrazide e delle nanoparticelle nella medesima fase, quella organica, e l'acidità mitigata dalla preponderante solubilità dell'acido nella fase acquosa (pH 1).

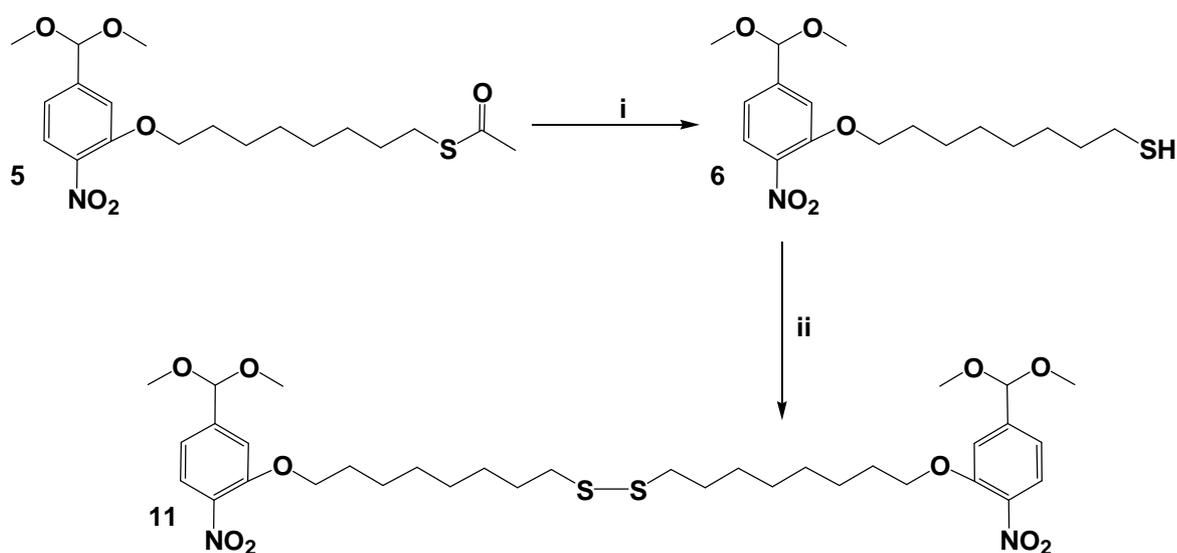
In cloroformio sono stati dissolti quindi le nanoparticelle **7** e il composto **9**, per poi aggiungere una quantità d'acqua pari al volume di fase organica. Il volume è stato poi raddoppiato tramite aggiunta di TFA, ponendolo quindi al 50% v/v totale. La miscela è stata lasciata sotto vigorosa agitazione per una notte a temperatura ambiente, per poi separare le due fasi e rimuovere il solvente organico (e l'acido disciolti) per evaporazione. Oltre al residuo nero, ripreso con cloroformio deuterato, è stata notata la formazione di una patina dorata. Questa, assieme alle evidenze ottenute tramite analisi del residuo con NMR normale ed NMR a gradiente di campo, ha certificato l'estesa disgregazione delle nanoparticelle a causa dell'eccessiva acidità, con formazione di idrazoni al posto dei gruppi acetale sui tioli ancora parzialmente legati a frammenti d'oro.

Vista l'inefficacia di questi metodi, si è pensato d'intraprendere vie differenti, passanti per la liberazione del gruppo aldeidico e l'interazione covalente dinamica con gruppi nucleofili prima della copertura tiolica delle nanoparticelle.

2.2.1.3 - Utilizzo di disolfuri

Le condizioni acide usate nel tentativo di liberare i gruppi aldeidici dai gruppi acetale si sono rivelate troppo blande per la stabilità del gruppo funzionale, oppure troppo drastiche per la stabilità delle nanoparticelle. Questo a causa del nitrogruppo, il quale è un forte elettronattrattore che rende troppo stabile l'acetale. Sono quindi richieste condizioni di forte acidità, le quali destabilizzano e distruggono inevitabilmente i nuclei d'oro. Liberando l'acetale prima della formazione delle AuNPs verrebbe evitata la disgregazione di queste ultime. Agendo in questo modo sul tiolo protetto, però, si rischierebbe anche la liberazione del gruppo SH dall'acetile legato. Conseguenza sarebbe l'attacco dello zolfo sul carbonile, con formazione di polimeri.

Come soluzione si è quindi pensato alla dimerizzazione dei tioli, con lo scopo di ottenere i corrispettivi disolfuri; in questo modo il gruppo SH sarebbe protetto in modo acido-stabile, permettendo la liberazione dei gruppi aldeidici in condizioni di acidità anche drastiche. Il tiolo **5** è stato quindi dissolto in metanolo, e alla soluzione è stata aggiunta idrazina 2 M. La miscela è stata aggiunta di iodio e lasciata in agitazione all'aria aperta, in modo che l'ambiente alcalino e ossidante liberasse il tiolo (**6**) e causasse la formazione dei disolfuri voluti (schema 2.3).



Schema 2.3: sintesi di disolfuri. i) idrazina; ii) I₂, pH 7,0.

Il gruppo acetale, protettore dell'aldeide, è stato quindi rimosso, ponendo il disolfuro **11** in una soluzione di acqua, cloroformio e TFA (1:1:2). Con il disolfuro **12** ottenuto (grafico 2.2) sono quindi state sintetizzate AuNPs col metodo Brust-Schiffin. I tioli, però, hanno polimerizzato tra loro invece di coprire i nuclei d'oro, come si è potuto evincere dall'aggregazione, dopo qualche giorno, delle nanoparticelle, nonché dall'NMR a gradiente di campo (che non ha mostrato i segnali attesi).

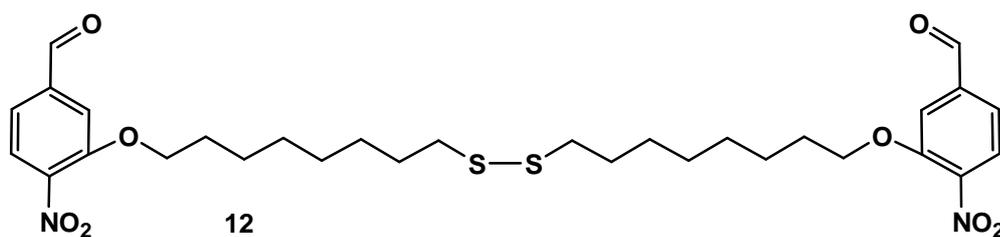
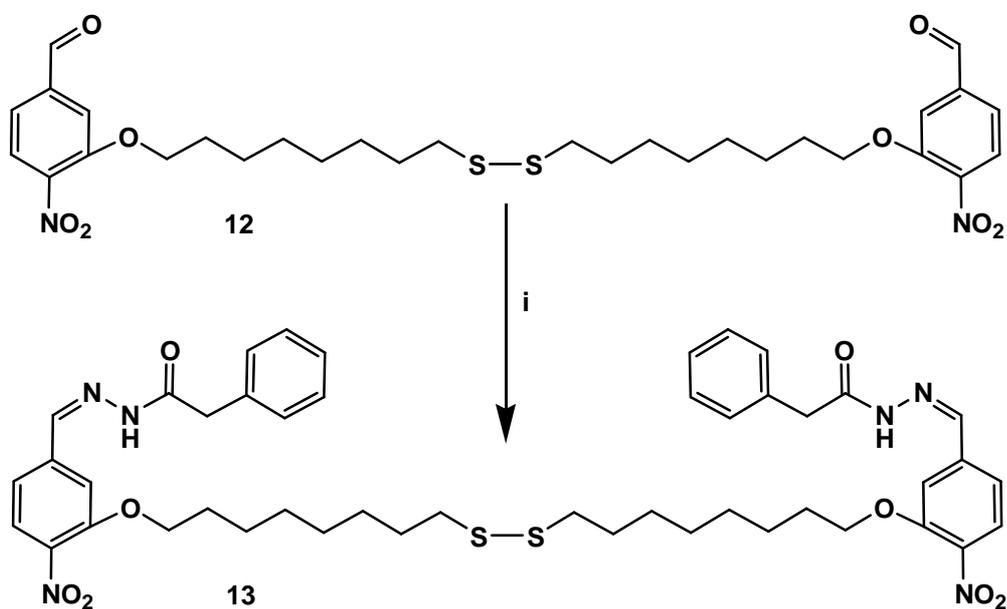


Grafico 2.2

È dunque stato chiaro che i gruppi aldeidici, oltre ad essere liberati dal gruppo protettore, dovevano anche essere fatti reagire con un gruppo funzionale che li legasse con relativa stabilità. In questo modo non sarebbero stati liberi per subire l'attacco nucleofilo da parte dello zolfo. La formazione di un idrazone permetterebbe tale "protezione transitoria", bloccando la reattività dell'aldeide. Inoltre conferirebbe la possibilità di "scambiare" la componente idrazidica con un'altra idrazide o ammina in grado di dare un'interazione di maggior stabilità complessiva.

Una porzione di disolfuro **12** è stata quindi posta in cloroformio assieme a un equivalente di idrazide fenilacetica, e la miscela è stata mantenuta a 40°C sotto agitazione per 24 ore. Il protone aldeidico, ora legato al carbonio imminico, ha visto il proprio segnale spostato da 10 a 8 ppm nello spettro NMR. Il disolfuro idrazonico **13** così ottenuto (schema **2.4**) non è però risultato utile allo scopo: utilizzato infatti per la formazione di nanoparticelle, non ha dato la copertura voluta, come verificato dall'assenza dei segnali all'NMR gradiente (dal momento che esso mostra solo quelli dei composti effettivamente legati alle nanoparticelle) e dall'aggregazione, in tempi relativamente rapidi (alcuni giorni) delle AuNPs.

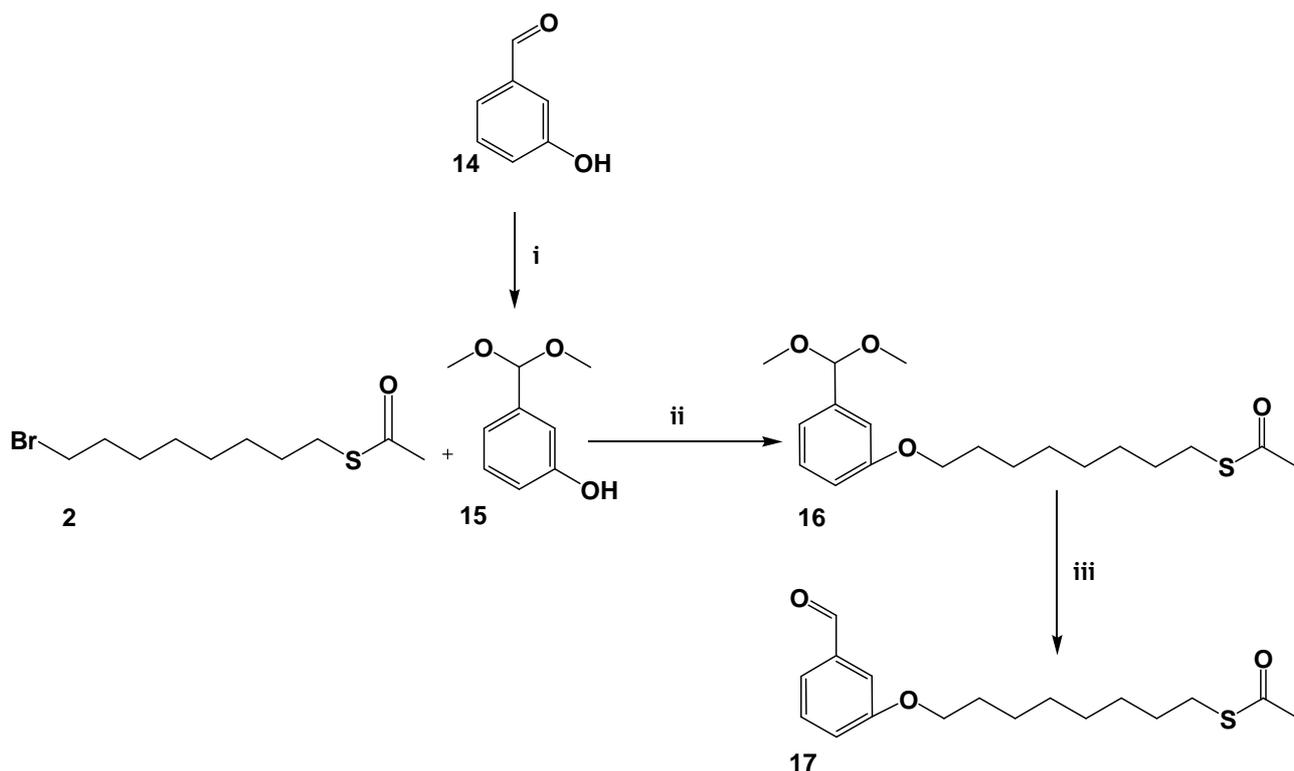


Schema **2.4**: formazione dell'idrazone fenilacetico sul gruppo aldeidico libero del disolfuro. i) idrazide fenilacetica (composto **9**).

2.2.1.4 - Rimozione del nitrogruppo

Da tutti gli esperimenti effettuati, è risultato chiaro che il tiolo usato presentava il fondamentale problema dello sblocco del gruppo protettore acetale. Erano infatti richieste condizioni incompatibili con la stabilità del sistema nanoparticellare. Si è quindi proceduto con la sintesi di un analogo del composto **6** privo del gruppo nitro.

3-Idrossi-benzaldeide (composto **14**) è stata quindi posta in metanolo in ambiente acido da HCl, ottenendo quantitativamente il composto **15** pulito. La minor stabilità dell'acetale ottenuto è stata subito notata, quando si è visto che le analisi TLC e massa effettuate su campioni prelevati direttamente dalla miscela di reazione davano per avvenuta la formazione dell'acetale benzilico, mentre le stesse analisi e lo spettro NMR effettuati sul prodotto purificato mostravano la presenza del solo gruppo benzaldeidico. Evidentemente, quindi, l'ambiente acido catalizzava la formazione dell'acetale con una reazione di equilibrio spostata verso il prodotto in modo direttamente dipendente dalla quantità stessa di acido: asportandolo per evaporazione si otteneva lo spostamento dell'equilibrio nuovamente verso i reagenti, con rottura dell'acetale e liberazione totale dell'aldeide. Per ovviare a questo inconveniente la reazione di protezione è stata effettuata nuovamente ma, prima della rimozione del solvente, la miscela è stata basificata con carbonato di potassio.



Schema 2.5: sintesi convergente di tiolo **16** con aldeide aromatica protetti, privo di nitrogruppo. i) metanolo; ii) K_2CO_3 ; iii) purificazione su gel di silice; prodotto **17** → indesiderato.

Per attacco nucleofilo del composto **15** su S-acetil-8-mercapto-1-bromooottano (composto **2**) in ambiente alcalino (schema 2.5) si sarebbe dovuto ottenere 3-(8-mercapto-ottilossi)-1-(dimetossimetil)-benzene (composto **16**), ma dopo la purificazione su gel di silice è stato invece ottenuto 3-(8-mercapto-ottilossi)-benzaldeide (composto **17**): l'acetale è stato rotto dalle blandissime condizioni acide generate dalla silice della colonna, con liberazione del gruppo aldeidico.

Il composto ottenuto era inservibile, poiché con la liberazione del tiolo dal suo gruppo protettore acetile si sarebbe ottenuta la polimerizzazione del composto, vista la rapida cinetica di tale reazione rispetto a quella per il legame Au-S. Perciò è stato effettuato un tentativo di riprotezione dell'aldeide ad acetale, sfruttando la stessa reazione già usata precedentemente. Tali condizioni fortemente acide, però, si sono rivelate essere eccessive per la stabilità dell'acetale, con conseguente rapida liberazione del tiolo e formazione di un precipitato lattiginoso bianco, risultato della polimerizzazione del composto (grafico 2.3). Per aggirare tale problema è stata verificata la possibilità di effettuare una purificazione in allumina, sostanza di carattere alcalino e quindi compatibile con il composto **16**. Essa non è stata in grado di dare buone separazioni.

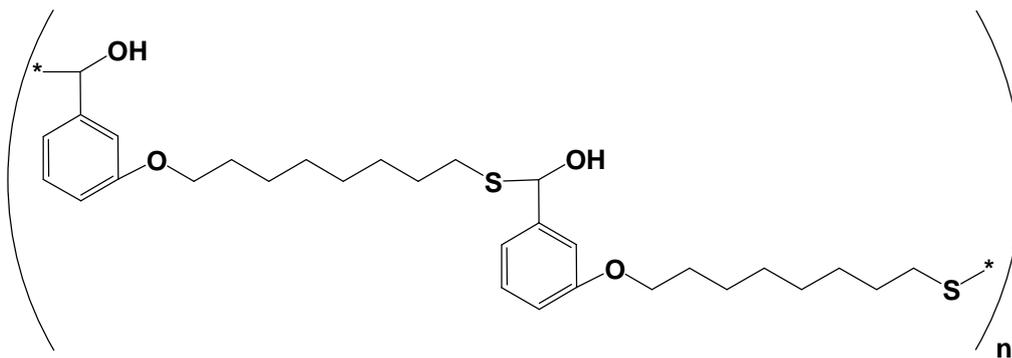


Grafico 2.3

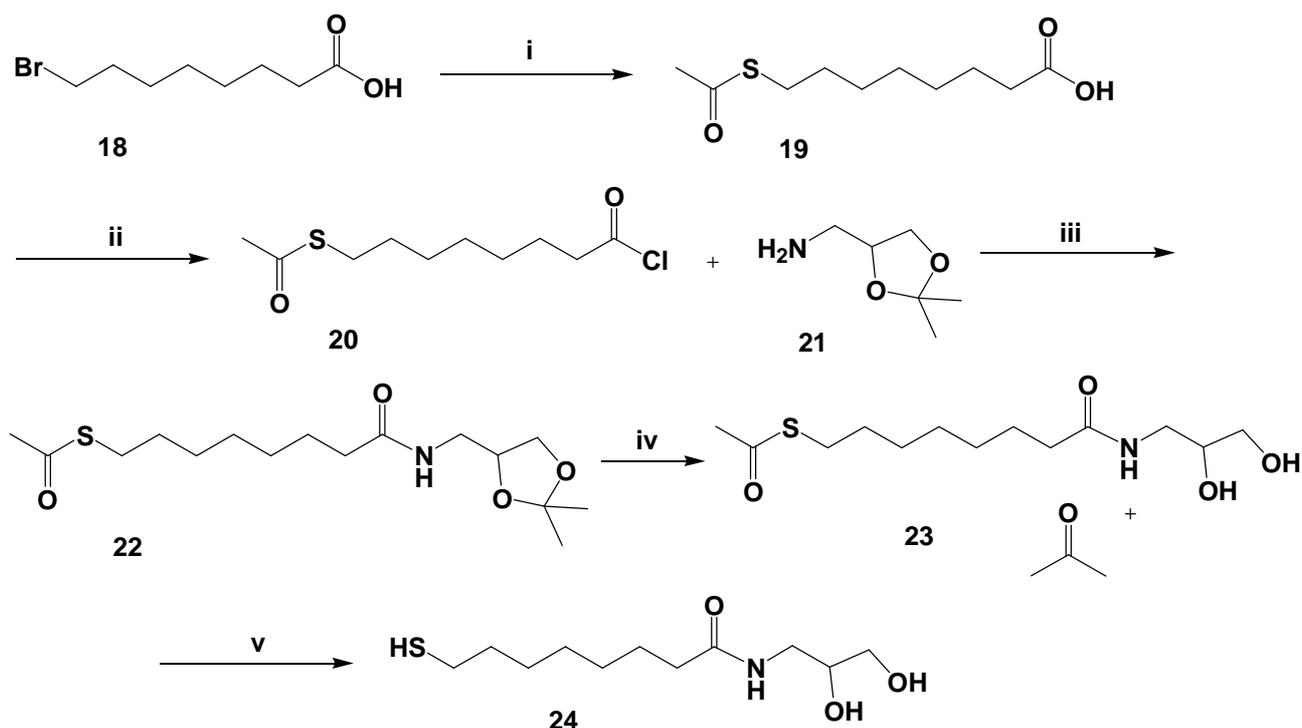
L'uso di aldeidi aromatiche è dunque stato abbandonato: per risolvere i problemi di compatibilità si è cercato di ottenere la formazione di aldeidi sulla superficie del monostato organico successivamente al suo assemblaggio attorno ai nuclei d'oro.

2.2.2 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPS con ALDEIDI LATENTI

La realizzazione di nanoparticelle portanti funzionalità aldeidiche sulla superficie del monostato organico ha incontrato diversi problemi, tutti derivanti dall'incompatibilità tra la presenza, in contemporanea e nella stessa molecola, di un tiolo nucleofilo e di un carbonile aldeidico elettrofilo. I tentativi di aggirare il problema utilizzando protezioni selettive per i due gruppi funzionali non hanno avuto successo, per questo è stato tentato un approccio di tipo differente.

2.2.2.1 - Sintesi del diolo vicinale

Il primo metodo tentato si è basato sullo sfruttamento di un diolo vicinale, il quale posto in opportune condizioni ossidative viene convertito ad aldeide *in situ*¹³⁹.

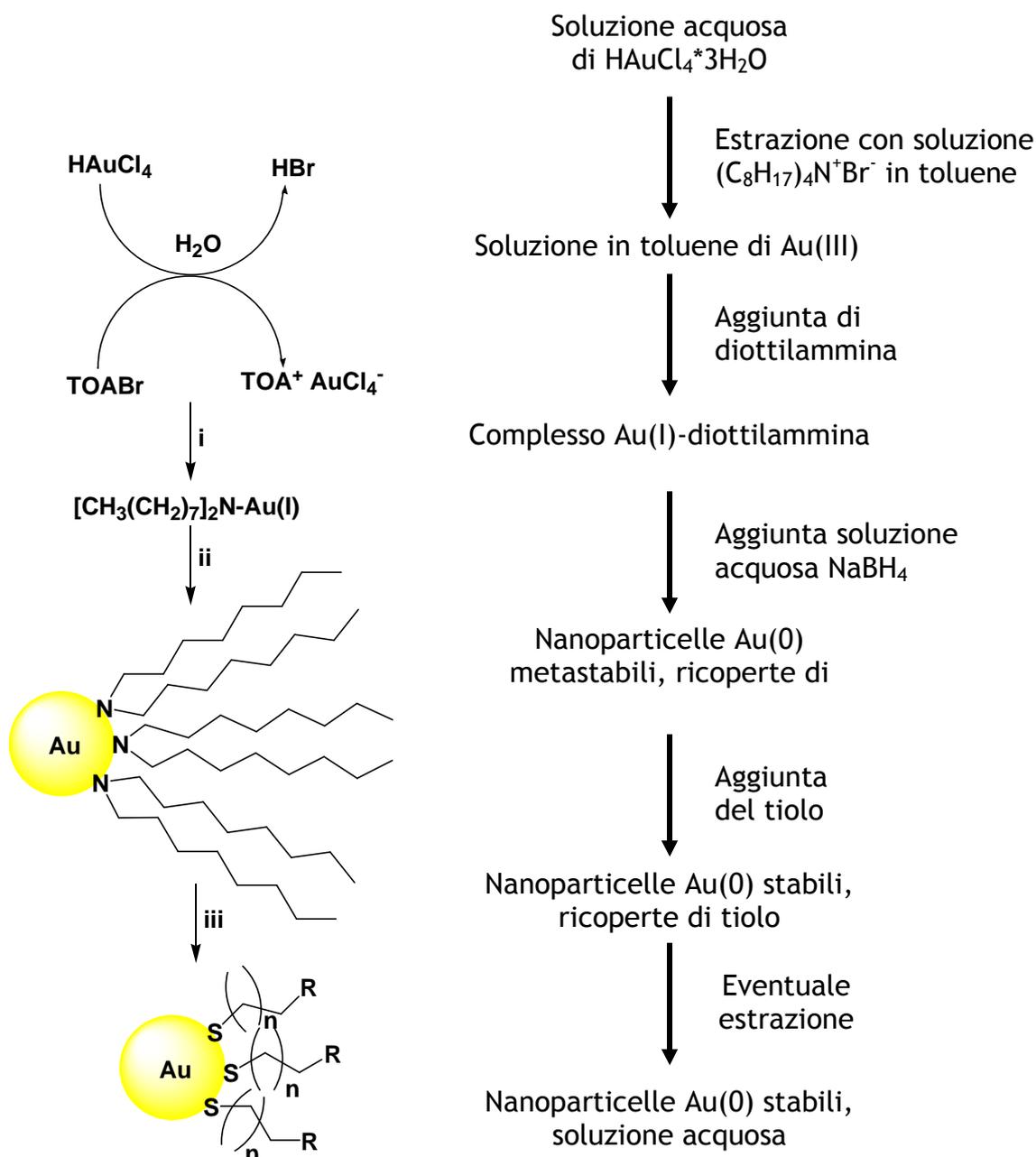


Schema 2.6: sintesi del tiolo **26** con diolo vicinale. i) tioacetato di potassio; ii) tionil cloruro; iii) TEA; iv) HCl in THF; v) t-ButO⁻K⁺.

Si è partiti ponendo acido 8-bromo-ottanoico (composto **18**) in acetone anidro assieme a tioacetato di potassio, e mantenendo la miscela al riparo dall'umidità la si è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per la notte. In questo modo è stato ottenuto il tiolo **19**. Di tale acido è stato formato il cloruro acilico con resa quantitativa, ponendolo in diclorometano anidro assieme a tionil cloruro e mantenendolo in agitazione per una notte sotto azoto (schema 2.6). Tale cloruro acilico (composto **20**) è stato fatto reagire con 2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammina (composto **21**), in modo che essa potesse effettuare una sostituzione nucleofila a livello dell'acile. È stato così ottenuta N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammide, composto **22**, il quale portava il gruppo diolico in forma protetta. Tale gruppo diolico è stato poi staccato con HCl, ottenendo il prodotto **23** (N-(2,3-diidrossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanammide). Per sintetizzare e ricoprire le nanoparticelle è stato necessario liberare il tiolo, sfruttando un ambiente fortemente alcalino usando terz-butossido di potassio, ottenendo il composto finale N-(2,3-diidrossipropil)-8-mercapto-ottanammide (composto **24**).

2.2.2.2 - Copertura AuNPs e ottenimento di aldeide alifatica

Il metodo originale, ideato da Brust-Schiffrin, prevede la riduzione di sali d'oro in toluene prima per l'aggiunta di tiolo e successivamente per l'aggiunta di sodio boroidruro, arrivando a ottenere nanoparticelle ricoperte già in solvente organico.



Schema 2.7: sintesi generale secondo il metodo di Scrimin di AuNPs: i) diottilammina; ii) NaBH_4 , iii) RSH.

Col metodo ideato da Scrimin¹⁴⁰, invece, il sale d'oro viene ridotto inizialmente per aggiunta di diottilammina, seguita dal riducente NaBH_4 (schema 2.7). Questo porta all'ottenimento di nanoparticelle ricoperte di diottilammina, la quale le stabilizza in

soluzione per un periodo limitato di tempo. Entro 24 ore, infatti, deve essere aggiunto il tiolo o la miscela di tioli col quale si vuole formare il monostrato: la solubilità di tali tioli determinerà poi la solubilità delle nanoparticelle risultanti. Differenza fondamentale è che, mentre col metodo di Brust-Schiffrin il tiolo aggiunto deve essere solubile in toluene, col metodo di Scrimin questo non è necessario: se il tiolo è solubile in ambiente organico si otterranno nanoparticelle in soluzione, altrimenti esse precipiteranno a mano a mano che si formano per poi essere estratte dal toluene con un opportuno solvente, come può essere l'acqua. Inoltre col metodo Brust-Schiffrin la quantità di tiolo utilizzata deve essere stechiometricamente doppia rispetto alle moli di sale d'oro utilizzato, mentre col metodo Scrimin deve essere sufficiente a ricoprire la superficie totale delle nanoparticelle.

Sono quindi state sintetizzate, sfruttando il metodo Scrimin, AuNPs ricoperte di diottilammina; alla miscela contenente tali nanoparticelle è stata successivamente aggiunta una soluzione in isopropanolo del tiolo **24**, lasciando il tutto in agitazione per una notte a temperatura ambiente. Le molecole di tiolo hanno sostituito la diottilammina, e le NPs così ottenute sono state recuperate per centrifugazione, risultando insolubili in toluene, solvente di reazione, e scarsamente solubili in metanolo. Sono state quindi disperse in una soluzione di periodato di sodio in tampone acetato a pH 5.5, reagente necessario all'ossidazione del diolo vicinale ad aldeide. Per quanto insolubili, lasciando le nanoparticelle in agitazione al buio in questo solvente acquoso l'ambiente ossidante avrebbe dovuto ossidare il diolo vicinale ad aldeide, con incremento della polarità e quindi della solubilità dei tioli e delle nanoparticelle loro legate. Invece, per quanto l'ossidazione sia probabilmente avvenuta, le nanoparticelle sono rimaste assolutamente insolubili, raccolte per centrifugazione ma completamente inutilizzabili (grafico 2.4).

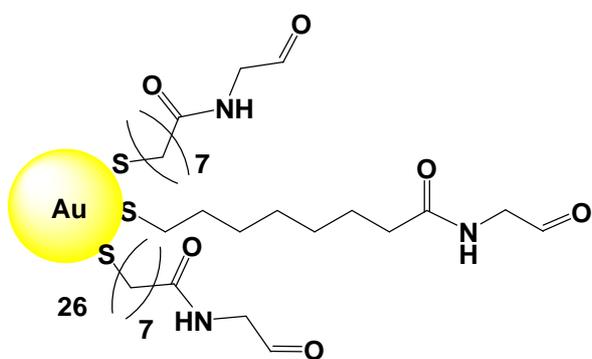
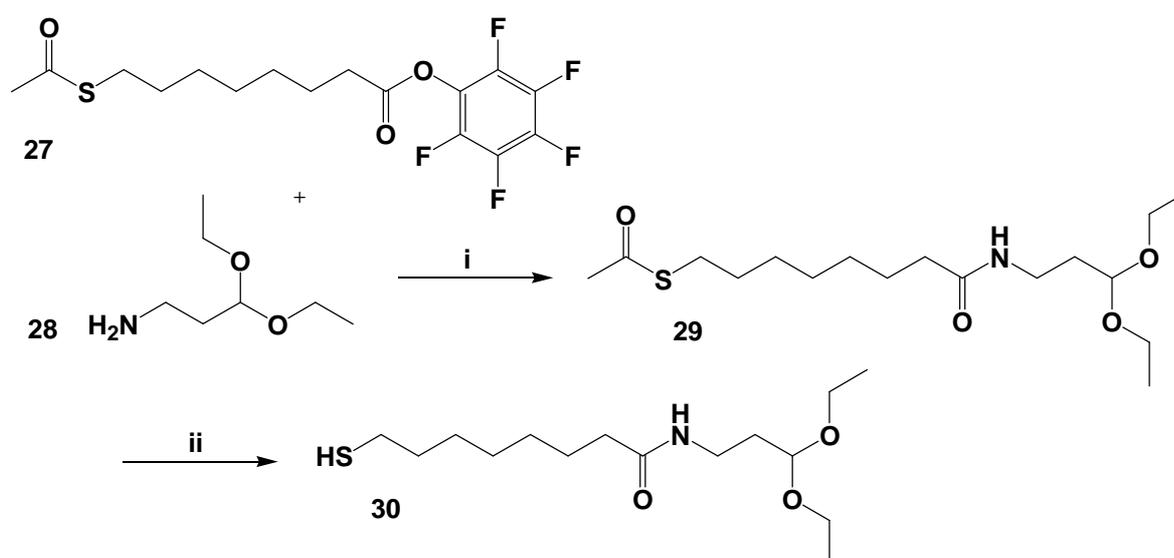


Grafico 2.4

L'assenza di solubilità sia in solventi polari che in solventi apolari, anche alla luce di evidenze successive, potrebbe essere derivata da un'elevata interazione tra i tioli del medesimo monostrato, magari sotto forma di ponti idrogeno o di deboli legami elettrostatici. Queste, forti poiché numerose e favorite dall'impaccamento dei tioli sulla superficie dei nuclei d'oro, se privilegiate rispetto alle interazioni con il solvente potrebbero aver causato la precipitazione e l'insolubilità delle NPs così ottenute. La possibilità che le condizioni ossidative fossero eccessive per la stabilità nanoparticellare non è stata considerata, poiché non vi sono stati i tipici fenomeni di aggregazione.

2.2.2.3 - Sintesi di dietilacetale e formazione di AuNPs

Cercando di ovviare al problema, e per verificare se effettivamente potesse essere questa la causa dell'inutilizzabilità delle nanoparticelle ottenute, è stato quindi deciso di utilizzare un diverso tipo di tioli, sempre portanti un gruppo aldeidico alifatico, ma stavolta protetto sotto forma di dietilacetale. Tale forma di protezione, rispetto al dimetil acetale aromatico usato in precedenza, presentava il vantaggio non trascurabile dell'estrema versatilità: stabilissimo in ambiente anche fortemente alcalino (es: NaOH 6 M), estremamente labile in ambiente lievemente acido per TFA. Esso avrebbe dunque permesso, dopo la sua sintesi, la liberazione alcalina del tiolo dal gruppo protettore seguita dalla formazione delle nanoparticelle, con successiva liberazione del gruppo aldeidico sfruttando un'acidità sufficientemente blanda da essere compatibile con la sopravvivenza dei nuclei d'oro e del monostrato ad essi legati.



Schema 2.8: sintesi del tiolo 30 con aldeide alifatica latente. i) CH_2Cl_2 , RT, 1 notte; ii) EtONa.

Per sintetizzare tale tiolo, quindi, S-acetil-8-mercapto-ottanoato di pentafluorofenile (composto **27**) è stato fatto reagire con 1-ammino-3,3-dietossipropano (composto **28**) per una notte a temperatura ambiente, ottenendo N-(3,3-dietossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanammide (composto **29**). Tramite forte alcalinizzazione dell'ambiente, per aggiunta di una soluzione di etossido di sodio, è stato rimosso il gruppo acetilico con liberazione del tiolo, lasciando intatto il dietilacetale a protezione dell'aldeide. Con l'acidificazione della miscela tramite HCl non acquoso è stato ottenuto N-(3,3-dietossipropil)-8-mercapto-ottanammide (composto **30**). Questa acidificazione, necessaria per prevenire la formazione di disolfuri con l'esposizione all'aria del tiolo libero ottenuto, non ha influenzato minimamente la stabilità dell'acetale aldeidico (schema **2.8**).

Con il prodotto ottenuto sono state quindi sintetizzate AuNPs, sfruttando il metodo Brust-Schiffin: dopo l'aggiunta del tiolo e dell'agente riducente, però, le nanoparticelle formate sono subito precipitate, insolubili in toluene, solvente di reazione. Raccolte per centrifugazione, sono risultate essere insolubili anche in qualsiasi altro solvente di varia polarità. La causa di questa insolubilità potrebbe essere stata riconducibile allo stesso motivo visto per le AuNPs **26**: anche questo tipo di molecola presentava molti siti accettori e donatori di legami idrogeno, che instaurati tra molecole interne al monostrato avrebbero potuto impedire l'interazione col solvente e, quindi, la solubilizzazione delle nanoparticelle. Aggiungendo in soluzione TFA si è verosimilmente ottenuta la liberazione del gruppo aldeidico dall'acetale (grafico **2.5**), ma questo non ha minimamente influenzato il comportamento delle nanoparticelle nei confronti del solvente, diclorometano, né di alcun altro solvente provato di maggior polarità (come acetonitrile, acqua e metanolo).

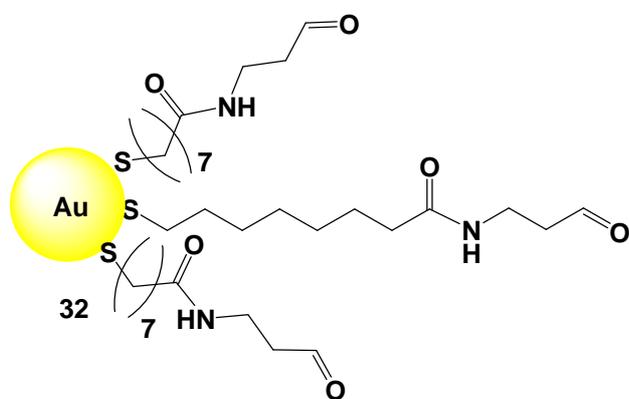
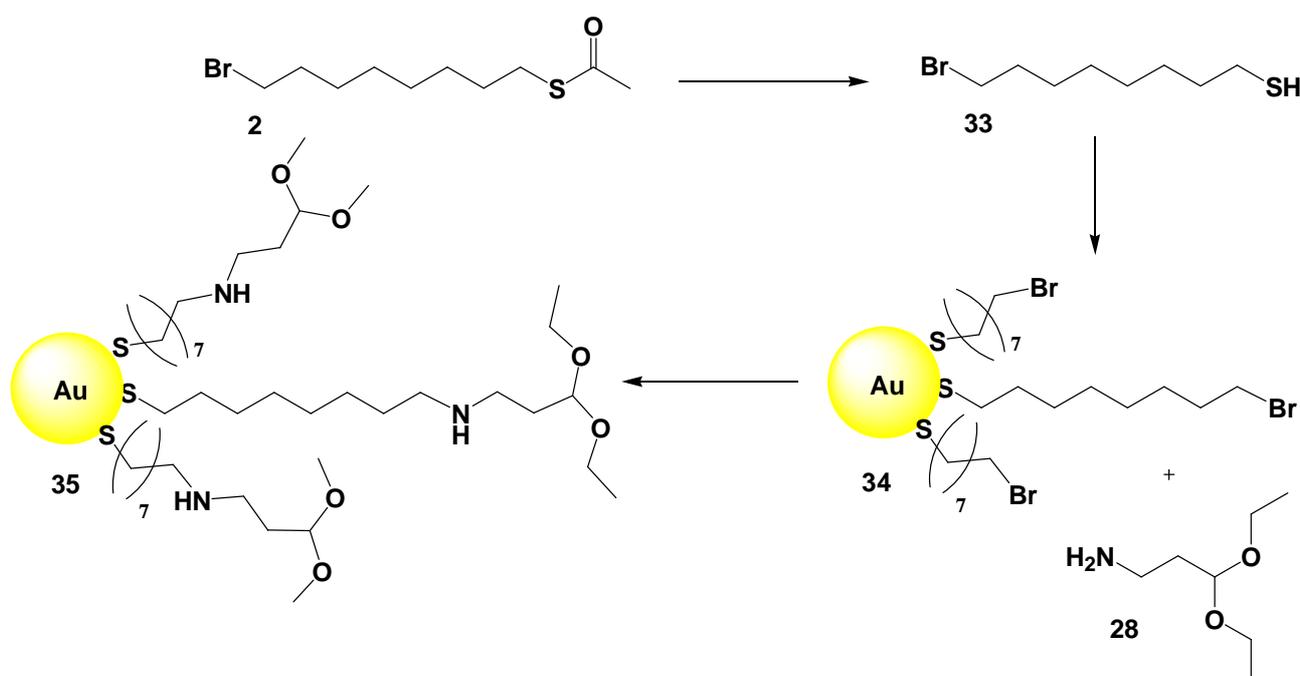


Grafico 2.5

Se tale insolubilità fosse stata causata effettivamente dall'instaurazione di ponti idrogeno, la liberazione del gruppo aldeidico avrebbe solamente ridotto di uno il numero di atomi accettori, fattore evidentemente insufficiente per ottenere la solubilizzazione delle nanoparticelle. Per quanto il monostrato veda i tioli fortemente impaccati tra loro, poi, esiste anche la possibilità che essi formassero interazioni deboli interparticellari tra diversi tioli di diversi monostrati, e che l'insolubilità fosse causata da tale formazione di macroaggregati chiaramente poco solubili.

2.2.2.4 - Ottimizzazione aldeidi alifatiche latenti

Se il problema è stato effettivamente causato dall'instaurazione di ponti idrogeno all'interno del medesimo o tra diversi monostrati, il modo per risolverlo sarebbe potuto essere la riduzione del numero di gruppi accettori o donatori di legami idrogeno.

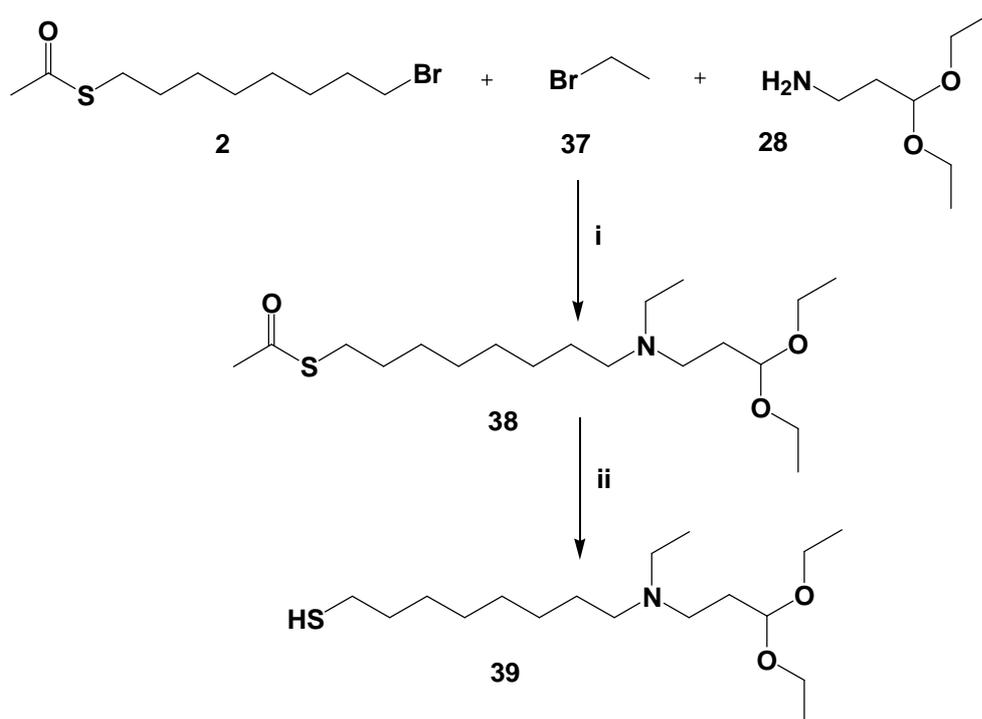


Schema 2.9: sintesi di AuNPs aldeidiche 35, con riduzione degli accettori di ponti idrogeno.

Con l'obiettivo di verificare se la presenza di legami idrogeno tra i tioli fosse la causa dell'insolubilità delle nanoparticelle, sono state sintetizzate le AuNPs 35, nei cui tioli, per ridurre gli accettori, è stato rimosso il carbonile presente all'interno della catena del composto 29. Per farlo il composto 2 è stato liberato dall'acetile protettore in ambiente acido per HBr 3 M in etanolo, ottenendo 8-bromo-ottantiolo (composto 33). Con tale tiolo sono state sintetizzate AuNPs bromurate col metodo Brust-Schiffin,

solubili nei solventi organici. Il composto **28**, successivamente aggiunto, ha dato sostituzione nucleofila sul bromuro alchilico, ottenendo le NPs **35** (schema 2.9). Mano a mano che la reazione procedeva, però, esse sono precipitate; raccolte per centrifugazione, sono risultate insolubili. Evidentemente nemmeno la rimozione del carbonile ha ridotto significativamente le interazioni tra i tioli, non riuscendo quindi ad impedire l'insolubilizzazione delle NPs. Disperse in cloroformio, sono state aggiunte di TFA e poste in agitazione a 0°C, ma nemmeno la molto probabile liberazione del gruppo aldeidico ha sortito effetti solubilizzanti sul sistema.

La riduzione degli accettori di legami a idrogeno non è stata evidentemente sufficiente, a causa dell'impossibilità della loro totale eliminazione; è stato perciò deciso di tentare con la rimozione del gruppo amminico secondario. Alchilando tale ammina si sarebbe infatti potuta eliminare ogni interazione riconducibile ai ponti a idrogeno. Per questo il composto **2** è stato dissolto in acetonitrile assieme a etilbromuro in ambiente alcalino.



Schema 2.10: sintesi di tiolo **39** con aldeide alifatica latente, eliminazione dei siti donatori di ponti idrogeno. i) K_2CO_3 ; ii) EtO^-Na^+ .

Le due molecole, presenti nella medesima soluzione in rapporto molare 1:1, sono entrambe bromuri alchilici. Dopo aver riscaldato la miscela fino agli 80°C, è stata fatta un'aggiunta di 1-ammino-3,3-dietossipropano (composto **28**), in piccolo difetto molare rispetto agli altri due reagenti. Lasciando il tutto sotto agitazione, sempre a 80°C, per

24 ore, si è ottenuta la sostituzione nucleofila dell'ammina su entrambi i bromuri, ottenendo una miscela di ammine terziarie. L'uso di un unico passaggio di reazione e l'alta temperatura sono serviti a spingere la reazione a completamento con una resa maggiore, ottenendo il composto **38**, N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-S-acetil-8-mercaptottanamina, per purificazione cromatografica. Da esso è stato poi staccato quantitativamente l'acetile, tramite dissoluzione in una soluzione di etossido di sodio 3.2 M, lasciando intatta la protezione del gruppo aldeidico (schema 2.10). Dopo la lieve acidificazione necessaria a prevenire l'ossidazione atmosferica con formazione di disolfuri, il tiolo **39** appena ottenuto è stato utilizzato per la sintesi di AuNPs con il metodo Brust-Scriffin (grafico 2.6).

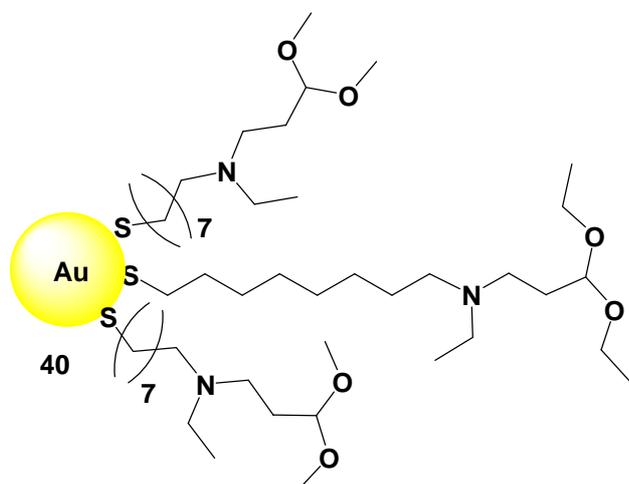


Grafico 2.6

Le nanoparticelle ottenute, a differenza delle precedenti, non sono precipitate; sono risultate solubili non solo in toluene, ma anche negli altri solventi provati (diclorometano, etanolo, metanolo, acetonitrile). Questo ovviamente non ha reso possibile la purificazione tramite precipitazione in etanolo. Il recupero delle nanoparticelle **40** è stato attuato per evaporazione del toluene, solvente di reazione. Dissolte poi in metanolo, le nanoparticelle sono state purificate dai tioli in eccesso tramite colonna ad esclusione dimensionale Sephadex LH60. Lo spettro NMR riportato in figura 2.6 certifica la presenza dei tioli sulla superficie delle nanoparticelle. Si possono notare i segnali a 5 e 3.4 ppm dell'acetale e a 2 ppm il segnale del metilene etilico legato all'azoto.

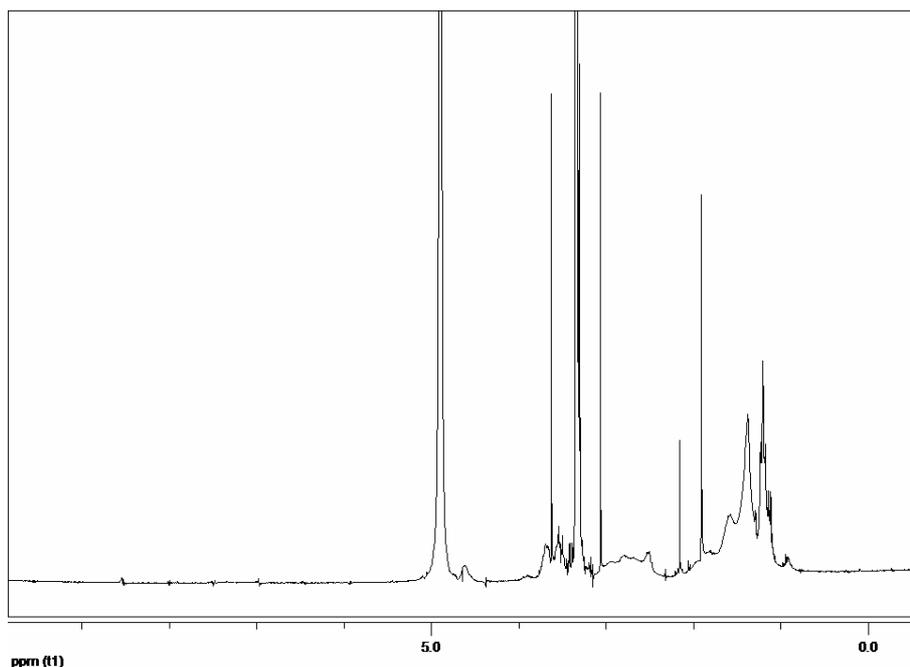


Figura 2.6: spettro $^1\text{H-NMR}$ delle AuNPs 42 (MeOD, 250 MHz, 25 °C).

Nel tentativo di rimuovere il dietilacetale (grafico 2.7) le nanoparticelle 40 sono state dissolte in cloroformio e aggiunte di TFA (25 %), mantenendo la miscela di reazione a 0 °C e in agitazione. Dopo appena 20 minuti dall'aggiunta dell'acido, però, c'è stata precipitazione delle AuNPs 40. Le nanoparticelle così precipitate sono state raccolte per centrifugazione, ma purtroppo non è stato possibile portarle in soluzione in altri solventi come metanolo, etanolo, acqua, tetraidrofurano o acetonitrile. Come ulteriore verifica, AuNPs 40 sono state poste in sospensione in acqua, dove a differenza che in cloroformio erano insolubili, e lì sono state aggiunte di TFA; questo nella speranza che interagendo direttamente con un solvente polare i gruppi aldeidici avrebbero potuto solubilizzarle le nanoparticelle. Non è avvenuto nulla di tutto ciò, le NPs sono rimaste insolubili.

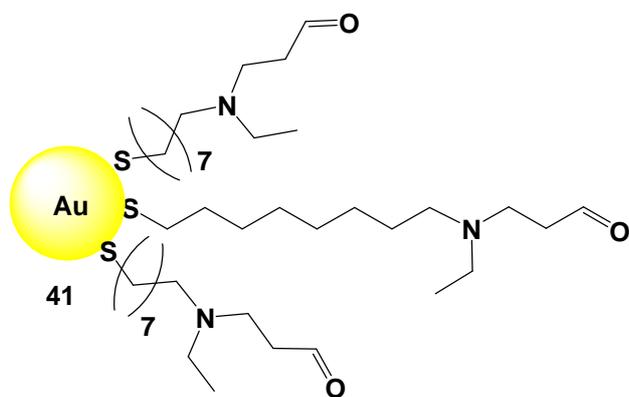


Grafico 2.7

Da altri esperimenti su nanoparticelle di diversa natura non è sembrato che le condizioni acide utilizzate fossero sufficientemente drastiche da destabilizzare le nanoparticelle facendole aggregare e dunque precipitare, ma certamente non è un'ipotesi che possa essere scartata a priori senza ulteriori approfondimenti. Dal momento che per la deprotezione del gruppo aldeidico sono comunque necessarie condizioni acide, non è stato ritenuto opportuno insistere per questa via, e tali approfondimenti non sono stati effettuati, privilegiando un cambio nella strategia.

2.2.3 - ALTRI METODI di FUNZIONALIZZAZIONE

Per cercare di ottenere dei sistemi nanoparticellari post-funzionabili sfruttando la chimica covalente dinamica sono state testate molecole dotate di gruppi amminici di vario tipo: aromatici e alifatici, fortemente o debolmente attivati, formabili *in situ*. Nessuno di questi sistemi ha dato i risultati sperati, a causa della difficile reattività o per la scarsa solubilità. Come alternativa, si è cercato di ottenere nanosistemi che fossero post-funzionalizzabili covalentemente tramite altri tipi di legame. Criterio che tale post-funzionalizzazione doveva soddisfare erano la compatibilità con la sopravvivenza delle NPs stesse.

2.2.3.1 - Funzionalizzazione tramite alchilazione

Visti i numerosi problemi di solubilità riscontrati con le aldeidi, o almeno con questo tipo di tioli aldeidici, è stata innanzitutto testata la capacità di post-funzionalizzazione delle AuNPs direttamente sui gruppi bromuro. Sono quindi state sintetizzate nanoparticelle **34**, divise in tre frazioni (figura **2.7**).

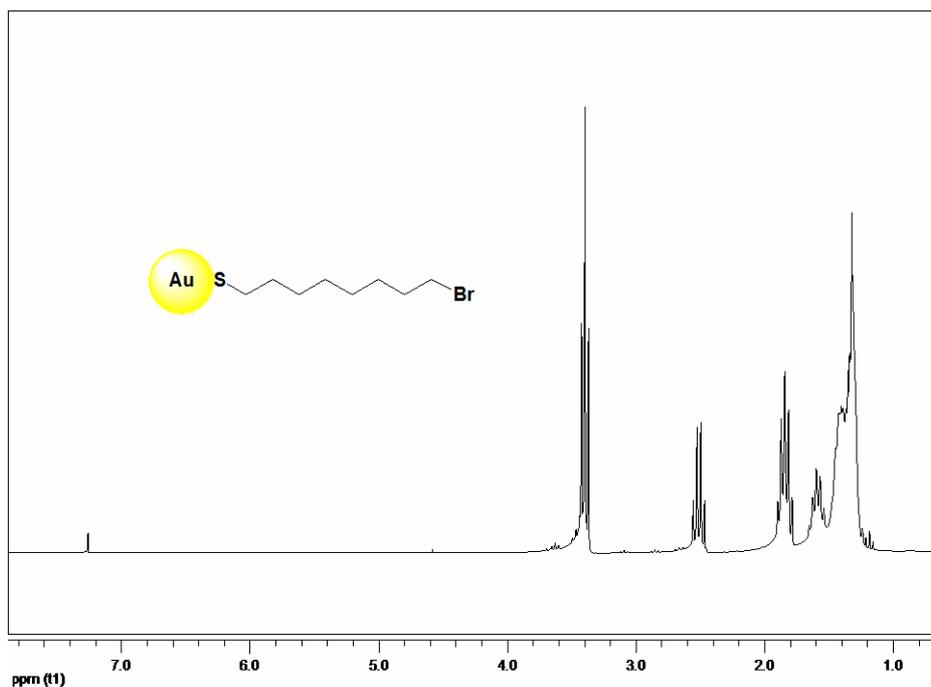
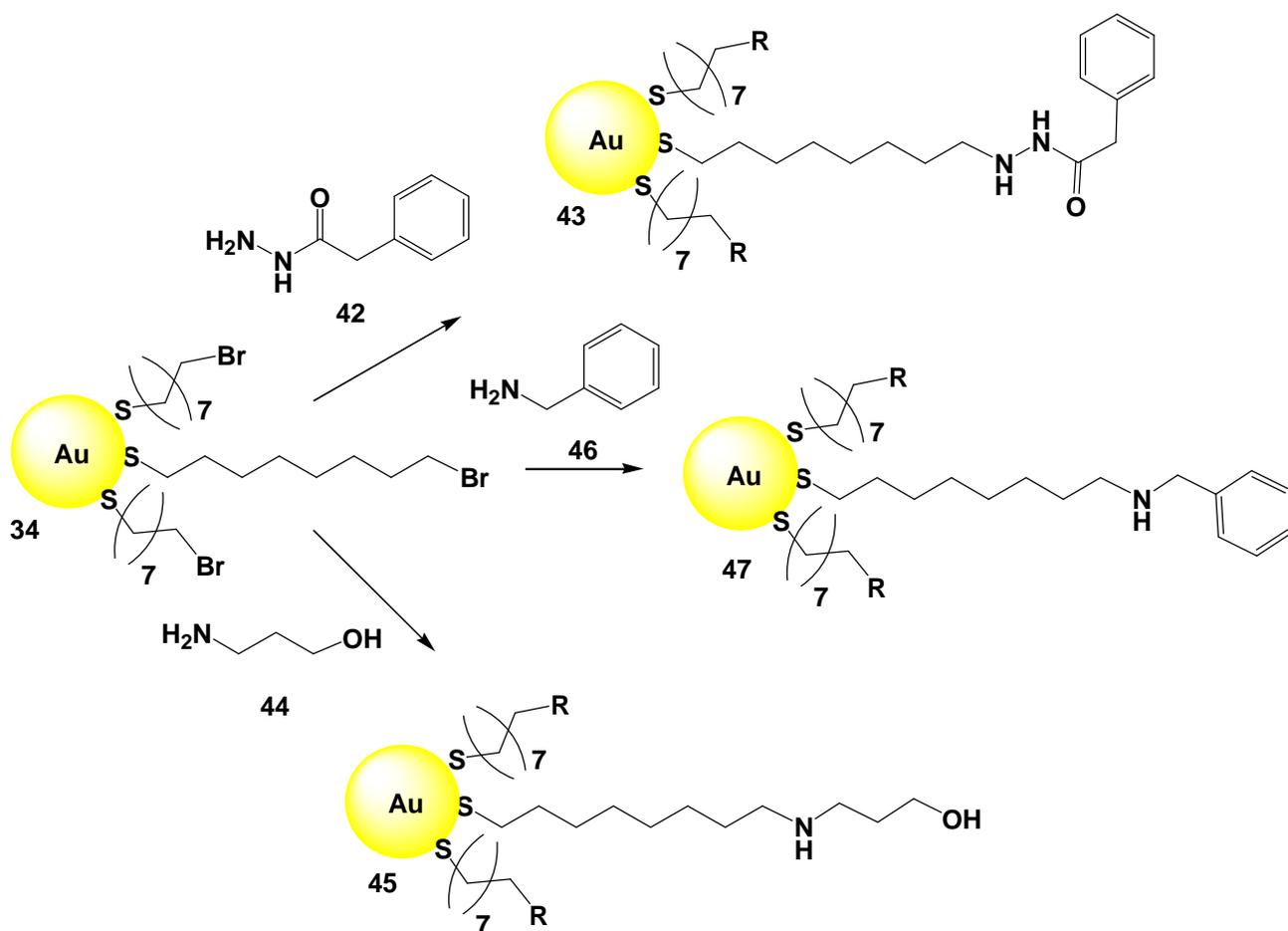


Figura 2.7: spettro $^1\text{H-NMR}$ delle AuNPs **34** (CDCl_3 , 250 MHz, 25°C).

Alla prima di queste soluzioni, preparata in diclorometano, è stata aggiunta una grande quantità di idrazide fenilacetica, e la miscela è stata lasciata in agitazione a 40°C per una notte. Il gruppo amminico libero dell'idrazide ha attuando sostituzione nucleofila sul bromuro, e le nanoparticelle così ottenute sono rimaste in soluzione. Dopo purificazione le nanoparticelle **43** sono risultate ancora molto solubili in solventi organici clorurati (schema 2.11).



Schema 2.11: post-funzionalizzazione di AuNPs bromurate.

L'avvenuta post-funzionalizzazione è stata verificata tramite NMR a gradiente di campo, nel cui spettro sono visibili sia i segnali aromatici dell'idrazone che il segnale del protone idrazonico a 8.5 ppm (figura 2.8).

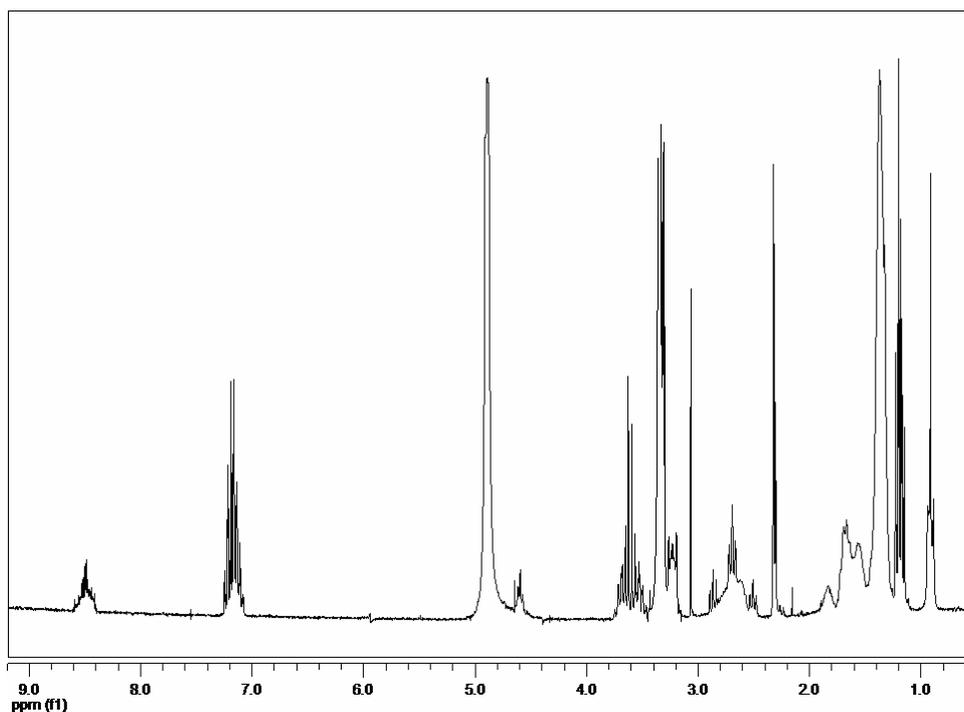


Figura 2.8: spettro 1H-NMR delle AuNPs 43 (CDCl₃, 250 MHz, 25 °C).

Le altre due soluzioni di NPs 34 sono invece state preparate in una miscela 1:1 di acetonitrile e diclorometano; nella seconda soluzione è stato aggiunto un largo eccesso di 3-idrossi-propilammina, nella terza soluzione è stata aggiunta benzilammina, sempre in largo eccesso. L'uso di un solvente misto come quello prescelto aveva lo scopo di garantire la solubilità per entrambe le ammine utilizzate e, quindi, per entrambi i tipi di nanoparticelle ottenibili. La benzilammina avrebbe dovuto dare NPs maggiormente lipofile, quindi solubili in diclorometano, mentre l'idrossi-propilammina avrebbe dovuto dare NPs maggiormente idrofiliche, solubili quindi in acetonitrile. Entrambe le miscele sono state lasciate in agitazione a 40 °C per una notte, e in entrambi i casi le nanoparticelle sono precipitate. Che la precipitazione fosse stata causata dalle ammine dopo aver dato sostituzione nucleofila sui tioli oppure in qualche altro modo non è stato provato. La motivazione dell'accaduto non è quindi stata trovata: è stata supposta l'instaurazione di ponti a idrogeno, ma questo non può essere preso come dato certo. Infatti le nanoparticelle ottenute utilizzando idrazidi, sia in questi (43) che in altri precedenti lavori, sono sempre risultate ben solubili nei solventi in cui sono state utilizzate, fossero essi più o meno polari. I gruppi idrazidici, però, presentano una maggior quantità di siti accettori o donatori di legami a idrogeno, così come di siti portatori di dipoli, e quindi non è stata considerata esaustiva la spiegazione secondo la quale l'insolubilità fosse causata da interazione interne al monostrato o tra monostrati

diversi piuttosto che col solvente. Ulteriori spiegazioni non sono state investigate. Volendo seguire le prove effettuate in precedenza coi composti **38-39**, sarebbe stato possibile rendere le ammine secondarie ottenute dalla post-funzionalizzazione a terziarie, nella speranza di aumentare la loro solubilità, ma questo avrebbe aggiunto una tale complessità alla sintesi del sistema da renderla contrastante con l'obiettivo generale della ricerca in questione.

Questa via di post-funzionalizzazione si è dunque rivelata valida solamente con l'uso di idrazidi, mentre è stata meno promettente per l'utilizzo di ammine primarie. L'utilizzo ultimo di queste nanoparticelle, ossia la loro funzionalizzazione con peptidi, avrebbe necessariamente richiesto l'uso di gruppi amminici primari, perciò questo approccio è stato abbandonato.

2.2.3.2 - Funzionalizzazione tramite gruppi carbossilici attivati

L'utilizzo di tioli aventi gruppi amminici in catena, fossero essi pre-assemblati oppure sintetizzati direttamente sulla superficie nanoparticellare, ha dato risultati poco entusiasmanti, portando alla formazione di AuNPs insolubili. Le cause di tale insolubilità è stata indagata solamente solo fino ad un certo punto, preferendo cercare altre vie per giungere alla sintesi di nanoparticelle post-funzionalizzabili con gruppi amminici.

I reagenti usati per rendere reattivi i gruppi carbossilici verso una sostituzione nucleofila a livello del carbonile hanno un comportamento non incompatibile con la stabilità delle nanoparticelle. Per questo è stato deciso di sintetizzare, col metodo Brust-Schiffin, AuNPs ricoperte con un monostrato avente, sulla superficie esterna, gruppi carbossilici, utilizzando come tiolo acido 8-mercaptottanoico. Le AuNPs **48** così formate sono risultate insolubili in qualsiasi solvente organico (grafico **2.8**).

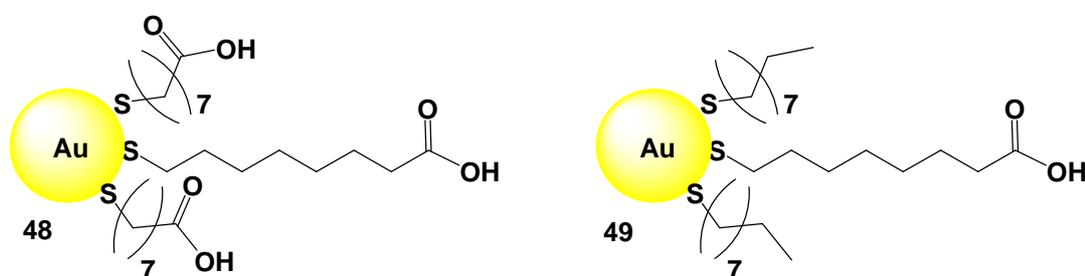


Grafico 2.8

C'è stato quindi il tentativo di aumentare la solubilità di queste nanoparticelle in

solventi diversi dall'acqua, meno polari e di certo non nucleofili. Per fare questo è stato reso misto il monostrato, sintetizzando le AuNPs **49** col metodo Brust-Schiffrin, usando una miscela di tioli composta da un terzo di acido 8-mercaptoottanoico e da due terzi di ottantiolo (grafico **2.8**). In questo modo le nanoparticelle avrebbero presentato sulla superficie meno gruppi funzionali attivabili, con conseguente riduzione di buona parte della capacità di caricamento, ma nel contempo sarebbe stata aumentata la solubilità in solventi non acquosi. Non appena formate, però, queste nanoparticelle hanno subito iniziato a precipitare; raccolte per centrifugazione, sono risultate essere completamente insolubili in qualsiasi solvente.

2.3 - CONCLUSIONI

Obiettivo di questo lavoro era quello di ottenere un sistema nel quale le nanoparticelle d'oro fossero coperte con un monostrato composto da tioli con gruppi funzionali terminali esterni facilmente post-funzionalizzabili. Perché questa post-funzionalizzazione risultasse stabile per possibili applicazioni in vivo, essa doveva essere covalente. Tra tutte le possibilità è stato inizialmente prescelto l'uso di gruppi aldeidici, i quali sono in grado di interagire con gruppi amminici di varia natura, dando luogo alla formazione di immine e idrazoni. Sono stati provati diversi tipi di gruppi aldeidici, aromatici più o meno attivati, alifatici protetti e da ottenere *in situ*: nessuno ha potuto essere veramente testato nella post-funzionalizzazione, a causa di problemi legati alla deprotezione (obbligata dalla chimica incompatibile di carbonile e tiolo) o di insolubilità delle nanoparticelle ottenute.

Altre vie covalenti tentate, sacrificando la possibilità di sfruttare la chimica covalente dinamica, hanno cercato di sfruttare l'instaurazione di legami stabili irreversibili tramite la sostituzione nucleofila su alogenuro alchilico oppure la formazione di derivati carbossilici da acidi organici attivati. Anche queste prove non hanno dato risultati accettabili, per problemi di solubilità delle nanoparticelle prima (AuNPs carbossiliche) oppure dopo (AuNPs bromurate) la post-funzionalizzazione.

Il sistema testato non è quindi risultato affidabile come previsto. La deprotezione dei gruppi funzionali ha richiesto condizioni non compatibili con la sopravvivenza delle nanoparticelle stesse. Il monostrato organico si è rivelato instabile in condizioni di blanda acidità, staccandosi con estrema facilità dai nuclei d'oro causandone aggregazione, essendo quindi incompatibile con le operazioni di post-funzionalizzazione utilizzate.

Si è pertanto deciso di cercare altre vie, le quali permettessero la post-funzionalizzazione delle nanoparticelle in modo semplice, compatibilmente con la stabilità dei nuclei d'oro. Rinunciando alla sintesi di un sistema che fosse compatibile con l'ambiente vivente, si è preferito fare un passo indietro e concentrarsi su qualcosa che potesse essere utile, ad esempio, come strumento diagnostico in vitro.

2.4 - PARTE SPERIMENTALE

2.4.1 - MATERIALI

2.4.1.1 - Reagenti e solventi

I reagenti e i solventi disponibili in commercio (Sigma-Aldrich, Fluka, Across) sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione, dove non diversamente specificato (diclorometano, acetonitrile, 2-propanolo, metanolo, etanolo).

Per la registrazione degli spettri NMR sono stati utilizzati i solventi deuterati reperibili in commercio (d_4 -metanolo, d_3 -acetonitrile, d-cloroformio).

Per le analisi di massa sono stati usati acqua Milli-Q, acetonitrile UV-grade e metanolo UV-grade, in diverse proporzioni e tutti addizionati allo 0.01% di acido formico.

Per gli esperimenti fluorimetrici e spettrofotometrici è stata usata acqua deionizzata e filtrata con sistema Milli-Q Millipore.

2.4.1.2 - Materiale per cromatografia

Le purificazioni mediante cromatografia flash sono state condotte utilizzando gel di silice Macherey-Nagel 60 con granulometria 230-400 mesh. Per la cromatografia su strato sottile (TLC) si sono utilizzate lastre Macherey-Nagel 40x80 mm poligram SIL G/UV₂₅₄ e poligram ALOX N/UV₂₅₄. Per la cromatografia a esclusione dimensionale è stata usata resina LH 60.

2.4.2 - STRUMENTAZIONE

2.4.2.1 - Spettri NMR

Per la registrazione degli spettri NMR sono stati utilizzati gli spettrometri Bruker Avance 300 (^1H : 300.13 MHz) e Bruker AC 250 (^1H : 250.13 MHz, ^{13}C : 62.9 MHz). Gli spettri ^1H -NMR e ^{13}C -NMR sono stati registrati a 25°C, i *chemical shift* (δ) dei segnali sono riportati in ppm rispetto al segnale del solvente non deuterato presente come impurezza nel solvente deuterato [per gli spettri protonici: CDCl_3 : 7.26 ppm; D_2O : 4.68 ppm; CD_3OD : 3.31 ppm; CD_3CN : 1.94 ppm].

Le costanti di accoppiamento (**J**) sono espresse in Hertz, la molteplicità dei segnali è stata indicata come: **s**: singoletto; **d**: doppietto; **t**: tripletto; **q**: quartetto; **m**: multipletto; **dd**: doppietto di doppietti; **dt**: doppietto di triplette; **tt**: tripletto di triplette; **br**: banda allargata; **sa**: singoletto allargato.

2.4.2.2 - Spettri con gradiente di campo

Per la registrazione degli spettri con gradiente di campo si è utilizzato lo strumento Bruker Avance 300 (^1H : 300.13 MHz), imponendo un gradiente di campo¹⁴¹.

2.4.2.3 - Spettri di massa

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

2.4.2.4 - Misura del pH

Si è misurato il pH dei campioni tramite misurazione con pHmetro Metrohm-605 con elettrodo di riferimento Ag/AgCl/KCl.

2.4.3 - METODOLOGIE GENERALI

2.4.3.1 - Test di Ellman qualitativo

Per verificare qualitativamente la presenza di tioli liberi in un prodotto o in una miscela di reazione, è stato effettuato il Test di Ellman. Esso prevede di prendere una piccola frazione (punta di spatola) del composto da analizzare e di dissolverlo in acetonitrile, a cui poi aggiungere tampone fosfato 0.2 M a pH 7 e reattivo di Ellman (DTNB, 5,5'-ditio-bis[acido p-nitrobenzoico] 2.0×10^{-3} M in soluzione di acetato di sodio 0.05 M). In presenza di tioli liberi la soluzione acquisisce un'intensa colorazione gialla. Per una misura quantitativa, invece, occorre effettuare una lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 412 nm, usando il coefficiente di estinzione molare del reattivo pari a $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sfruttando una retta di taratura costruita usando acetil-cisteina.

2.4.3.2 - Procedura generale per la sintesi di AuNPs col metodo Brust-Schiffin

Nelle sintesi di AuNPs effettuate ci si è generalmente affidati a un protocollo derivato strettamente dalla sintesi originale ideata dal gruppo di Brust e Schiffin⁷, usando reagenti in quantità adeguata per ottenere nanoparticelle il cui nucleo metallico misuri

2 nm di diametro. In un pallone da 100 ml sono posti 1.1 g di TOABr (6.06×10^{-4} moli) e sono dissolti in 35 ml di toluene, per poi deossigenare la soluzione tramite sonicazione in atmosfera di azoto. Separatamente, 20.5 mg di $\text{HAuCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (5.22×10^{-5} moli) sono disciolti in 1.4 ml di acqua mQ, ottenendo una soluzione gialla. Le due soluzioni sono unite e ben miscelate fino a completa decolorazione della fase acquosa, indicante il totale trasferimento dell'oro in toluene, che diviene rosso aranciato.

Rimossa la fase acquosa, il tiolo di interesse (4.94×10^{-5} moli, 0.95 eq rispetto all'Au totale), col quale si vogliono ricoprire le nanoparticelle, viene dissolto in alcuni ml di toluene ed aggiunto alla soluzione sotto agitazione. NaBH_4 (9.22 mg, 2.48×10^{-4} moli, 4.75 eq) viene dissolto in 410 μL d'acqua mQ, e tale soluzione viene poi rapidamente aggiunta alla miscela di oro e tiolo in toluene, con immediato e rapido viraggio dal rosso all'arancio al giallo fino a divenire incolore, segno della formazione di Au(I), continuando poi al viola, al marrone e al nero, segno della formazione di Au(0) e quindi delle nanoparticelle d'oro. Dopo 3 ore di agitazione, la miscela viene trasferita in un pallone da 250 ml e aggiunta di 200 ml di etanolo. Essa viene poi posta in freezer per la notte, facendo così precipitare le nanoparticelle formate, le quali vengono infine recuperate per centrifugazione. Sono poi sottoposte a purificazione su colonna ad esclusione dimensionale.

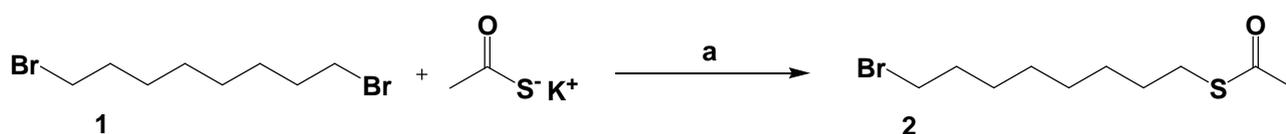
2.4.3.3 - Procedura generale per la sintesi di AuNPs col metodo Scrimin

Il protocollo messo a punto dal gruppo del Prof. Scrimin⁹ per ottenere AuNPs è una variazione derivata dal metodo Brust-Schiffin. Anche in questo caso i reagenti sono stati utilizzati in quantità tali da ottenere nuclei metallici del diametro di 2 nm. In un pallone da 100 ml sono quindi posti 1.1 g di tetraottilammonio bromuro (TOABr, 6.06×10^{-4} moli), dissolti in 35 ml di toluene a formare una soluzione che viene deossigenata sonicandola in atmosfera di azoto. Separatamente, 20.5 mg di $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (acido tetracloroaurico triidrato, 5.22×10^{-5} moli, 1 eq) sono disciolti in 1.4 ml di acqua mQ, ottenendo una soluzione gialla. Le due soluzioni vengono unite e ben miscelate, così da permettere il trasferimento dell'oro in toluene (che si colora di rosso arancione) eliminando la fase acquosa (incolore). Alla fase organica vengono quindi aggiunti 860 μL di N,N-diottilammina, e la miscela è lasciata sotto forte agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente, durante i quali essa diventa completamente incolore per formazione di Au(I). A questo punto viene aggiunta rapidamente una soluzione di 9.22 mg di NaBH_4 disciolti in 400 μL d'acqua mQ, con rapido viraggio al nero della soluzione

per formazione di nanoparticelle d'Au(0). Dopo tre ore di agitazione in atmosfera di azoto, alla soluzione di NPs viene aggiunta una soluzione di alcuni ml di isopropanolo contenente il tiolo col quale si vuole ricoprire il nucleo d'oro (1.05×10^{-4} moli, 2 eq, necessari per ricoprire la superficie delle nanoparticelle). I tioli sostituiscono rapidamente la diottilammina, con conseguente precipitazione delle NPs. La sospensione viene lasciata ad agitarsi per una notte, recuperando poi le AuNPs ottenute per centrifugazione o per estrazione con solvente acquoso. Infine vengono purificate su colonna ad esclusione dimensionale Sephadex, eliminando così i tioli in eccesso, non legati alla superficie nanoparticellare.

2.4.4 - SINTESI e APPLICAZIONI delle AuNPs 7

2.4.4.1 - Sintesi di S-acetil-8-bromooctantiolo (2)



Schema 2.12: a) acetone anidro, tubo CaCl₂, 1 notte, resa 49%.

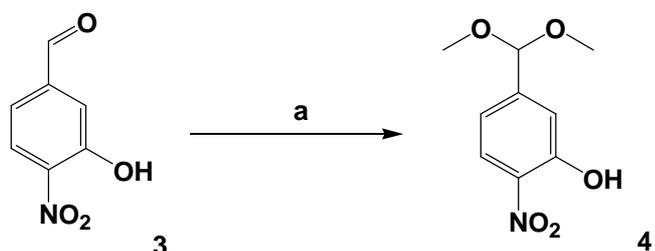
1,8-Dibromo-ottano (composto 1, 2 g, 7.35×10^{-3} moli, 1 eq), dissolto in 25 ml di acetone anidro, è subito aggiunto di tioacetato di potassio (839.4 mg, 7.35×10^{-3} moli, 1 eq). Chiuso il pallone con tubo al cloruro di calcio, la reazione è stata fatta proseguire, a temperatura ambiente sotto agitazione, per una notte. Tramite TLC (silice, CH₂Cl₂, UV) è stata verificata la scomparsa del reagente e la presenza di due prodotti, quello desiderato e il di-acetilato. Dopo filtrazione del KBr insolubile, il grezzo è stato portato a secco e successivamente ripreso con CH₂Cl₂, per essere purificato su silice in colonna cromatografica flash (eluente CH₂Cl₂). Riunite le frazioni ed eliminato il solvente, è stato ottenuto S-acetil-8-mercapto-1-bromo-ottano, liquido giallo chiaro (978.8 mg, composto 2, resa 49%).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.38 (t, 2H, J=6.8Hz), 2.83 (t, 2H, J=7.3Hz), 2.30 (s, 3H), 1.81 (tt, 2H, J=6.9Hz, J=14.5Hz), 1.53 (tt, 2H, J=6.9Hz, J=14.2Hz), 1.31 (m, 8H, J=7.2Hz).

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 60.62, 33.98, 32.71, 30.63, 29.42, 29.06, 28.87, 28.62, 28.55, 28.03.

MS (ESI+, MeOH): m/z 267.9 ([M+H⁺], calcolata 268.2).

2.4.4.2 - Sintesi di 3-idrossi-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene (4)



Schema 2.13: a) HCl 1.25 M in metanolo, 65 °C, 15 min, resa quantitativa.

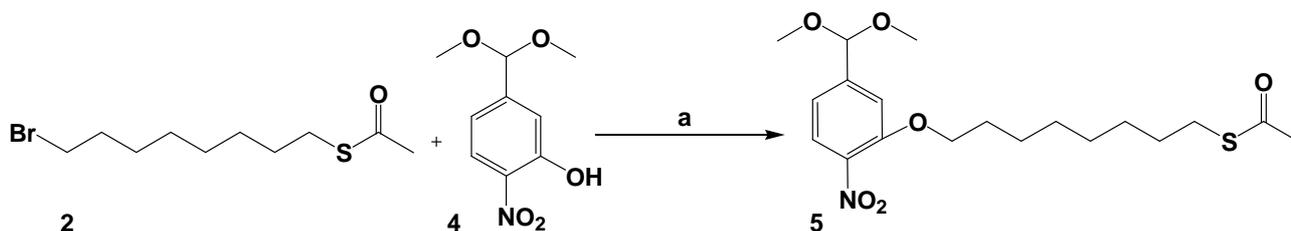
3-Idrossi-4-nitro-benzaldeide (composto 3, 2 g, 11.97×10^{-3} moli, 1 eq) è dissolta in 30 ml di metanolo; alla sospensione gialla così ottenuta è stato aggiunto 1 ml di una soluzione di HCl in metanolo 1.25 M, e la miscela (diventa una soluzione gialla limpida) è stata lasciata in agitazione per 2 minuti. Successivamente è stata riscaldata a 65 °C e lasciata in agitazione a riflusso per altri 15 minuti. Verificata l'avvenuta reazione tramite TLC (silice, CH₂Cl₂, UV), analisi di massa ed NMR, il solvente è stato rimosso ottenendo 3-idrossi-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene, olio giallo brunito che lentamente cristallizza spontaneamente in solido giallo (composto 4, resa quantitativa).

¹H-NMR (250 MHz, MeOD): δ (ppm) 8.07 (d, 1H, J=8.7Hz), 7.21 (d, 1H, J=1.6Hz), 7.08 (dd, 1H, J=1.7Hz, J=8.8Hz), 5.40 (s, 1H), 3.33 (s, 6H).

¹³C-NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 163.40, 155.34, 149.05, 126.22, 119.50, 119.16, 102.95, 53.37.

MS (ESI+, MeOH): m/z 214.0 ([M+H⁺], calcolata 214.1).

2.4.4.3 - Sintesi di 3-(S-acetil-8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene (5)



Schema 2.14: a) K₂CO₃, ACN, 50 °C, 48 h, resa 19%.

Composto 2 (836 mg, 3.13×10^{-3} moli, 1 eq) e composto 4 (667 mg, 3.13×10^{-3} moli, 1 eq) sono stati dissolti in 50 ml di acetonitrile, ottenendo una soluzione gialla. Come catalizzatore alcalino sono stati aggiunti 865 mg di K₂CO₃ (2 eq, 6.26×10^{-3} moli), e la miscela è stata posta sotto agitazione a 50 °C (sospensione rossa), seguita tramite TLC (silice, CH₂Cl₂, UV) e analisi di massa. Dopo 48 ore la reazione è stato tolto il

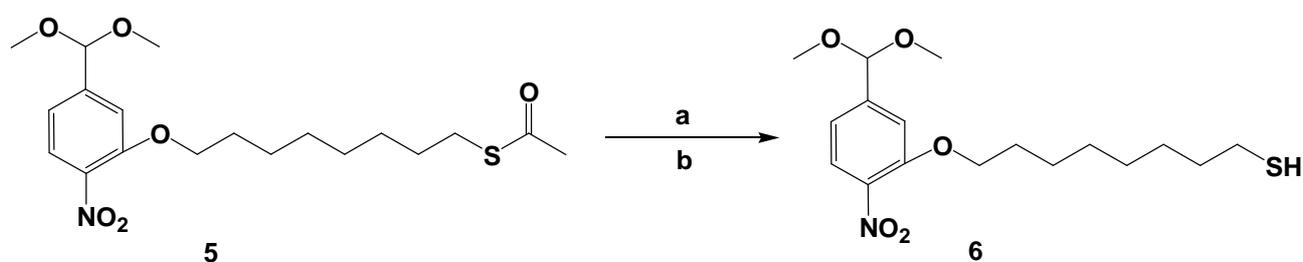
riscaldamento, il precipitato rosso scuro è stato eliminato per filtrazione e la soluzione filtrata arancione è stata portata a secco, ottenendo un solido grezzo rosso cupo. Ripreso con CH₂Cl₂, è stato purificato su silice in colonna cromatografica flash (eluente etere di petrolio + acetone 10%) ottenendo un olio verdastro, 3-(S-acetil-8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene (composto **5**, 236 mg, resa 19%).

¹H-NMR (250 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.81 (d, 1H, J=8.3Hz), 7.18 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, J=8.3Hz), 5.39 (s, 1H), 4.10 (t, 2H, J=6.3Hz), 3.32 (s, 6H), 2.86 (t, 2H, J=7.3Hz), 2.32 (s, 3H), 1.81 (dd, 2H), 1.55 (dd, 2H, J=7.1Hz, J=14.5Hz), 1.34 (m, 8H).

¹³C-NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 196.08, 152.45, 144.54, 125.39, 118.36, 112.65, 101.50, 69.57, 52.64 (s, 2C), 30.92, 30.63, 29.43, 29.08, 29.03, 28.92, 28.84, 28.64, 25.72 .

MS (ESI+, MeOH): m/z 400.8 ([M+H⁺], calcolata 400.5).

2.4.4.4 - Sintesi di 3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene (**6**)



Schema 2.15: a) idrazina 2 N in metanolo deossigenato, N₂, 45 min; b) TFA 2 N in metanolo deossigenato, N₂; resa quantitativa.

Sono state preparate tre soluzioni: metanolo, TFA 2 M in metanolo e idrazina 2 M in metanolo, deossigenate sotto flusso di azoto. Composto **5** (20 mg, 4.94 x 10⁻⁵ moli, 1 eq) è stato sigillato in pallone con tappo in gomma, posto in flusso d'azoto e poi aggiunto di 0.5 ml di metanolo deossigenato, in cui il solido si è dissolto ottenendo una soluzione verde chiaro. Sono stati quindi aggiunti 70 µL di soluzione di idrazina 2 M deossigenata (2.8 eq, 1.4 x 10⁻⁴ moli), con viraggio della miscela di reazione al giallo intenso, lasciandola sotto agitazione per 45 minuti. La soluzione, prima dell'esposizione all'aria, è stata quindi acidificata fino a pH 5 tramite aggiunta di TFA 2 M deossigenato, tornando verde-gialla, ed infine è stata portata a secchezza ottenendo un olio verde, 3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene (composto **6**, resa quantitativa).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.81 (d, 1H, J=8.3Hz), 7.18 (d, 1H, J=1.1Hz), 7.08 (dd, 1H, J=1.5Hz, J=8.4Hz), 5.39 (s, 1H), 4.11 (t, 2H, J=6.4Hz), 3.32 (s, 6H), 2.52 (dd, 2H, J=7.5Hz, J=14.6Hz), 1.96 (s, 1H), 1.81 (dd, 2H, J=6.4Hz, J=14.5Hz), 1.60 (dd, 2H, J=7.3Hz, J=14.5Hz), 1.36 (m, 8H, J=4.0Hz, J=8.4Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 152.45, 144.55, 125.40, 118.38, 112.64, 101.52, 69.58, 52.65 (s, 2C), 33.97, 32.63, 29.07, 28.88, 28.86, 28.22, 25.75, 24.61.

MS (ESI+, MeOH): m/z 358.3 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 358.5).

Test di Ellman: positivo.

2.4.4.5 - Sintesi delle AuNPs 7

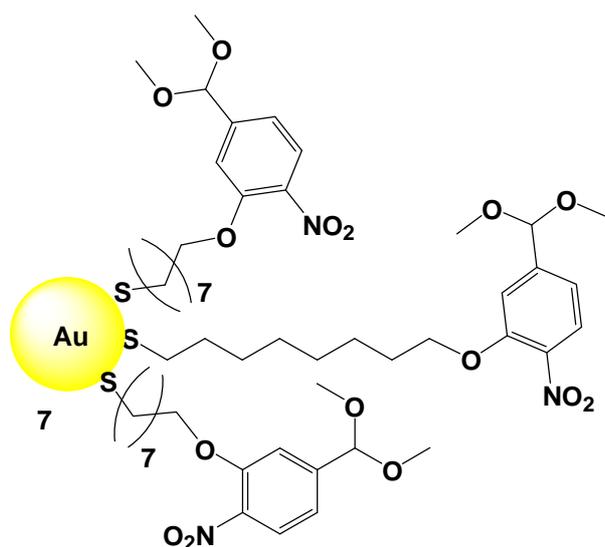


Grafico 2.9

Per la preparazione di AuNPs si è operato seguendo il metodo Burst-Schiffrin (come riportato nelle metodologie generali, **2.4.3.2**), aggiungendovi in soluzione il tiolo **6** (20 mg, 4.94×10^{-5} moli) dissolto in toluene.

Dopo precipitazione in etanolo a -18°C , sono state recuperate per centrifugazione le AuNPs **7**, risultando solubili in CH_2Cl_2 (NMR in figura **2.2**).

2.4.4.6 - Liberazione del gruppo aldeidico delle AuNPs 7

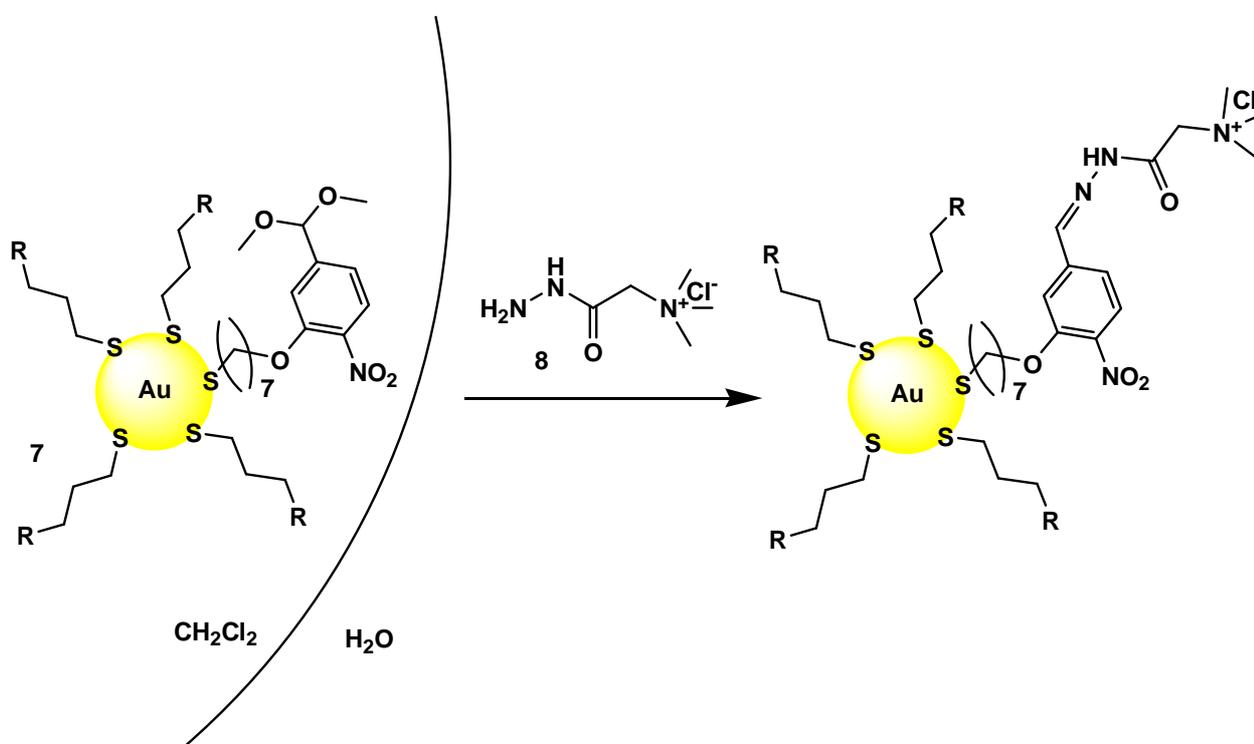
Per la rimozione del gruppo dimetil-acetale si è proceduto per diverse vie, dividendo le AuNPs in quattro porzioni analoghe da circa 5 mg ognuna:

1. una porzione di AuNPs è stata posta in 1 ml di metanolo e aggiunta di una soluzione acquosa di HCl 37% fino a pH 5, lasciando la miscela in agitazione per una notte.

- una porzione di AuNPs è stata disciolta in 750 μL di THF, al quale sono stati aggiunti 500 μL di soluzione acquosa di acido acetico al 15%, lasciando il tutto in agitazione a temperatura ambiente per una notte.
- una porzione di AuNPs è stata dissolta in 250 μL di CHCl_3 e aggiunta di 250 μL di acqua mQ e di 500 μL di TFA (CF_3COOH); l'emulsione così formata è stata posta in agitazione in bagno di ghiaccio per 90 minuti.
- una porzione di AuNPs è stata sospesa in 1 ml di n-pentano, alla quale sono stati poi aggiunti 200 μL di HCOOH (non miscibili), ottenendo la dissoluzione pressoché immediata delle NPs con passaggio dalla fase organica a quella acida. La miscela è stata posta sotto agitazione per 60 minuti a temperatura ambiente.

Da ogni porzione è stato poi eliminato il solvente (separazione delle fasi, evaporazione del solvente organico), procedendo poi all'analisi NMR.

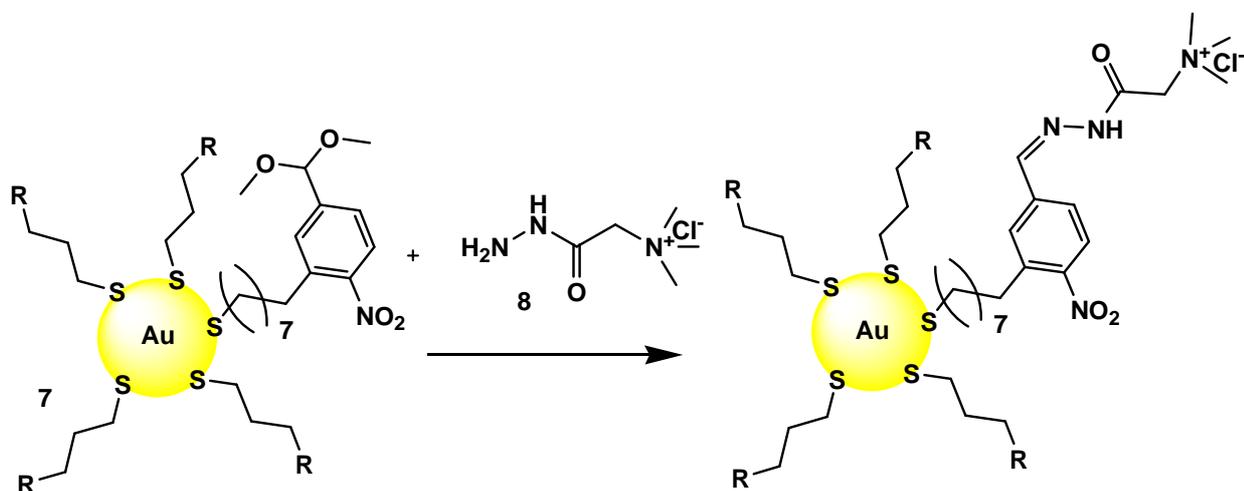
2.4.4.7 - Formazione di AuNPs- $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ in fase eterogenea



Schema 2.16: sintesi di idrazoni su monostrato superficiale di AuNPs aldeidiche, fase eterogenea (CH_2Cl_2 - H_2O).

1.4 mg di AuNPs **7** sono state dissolte in 600 μL di CH_2Cl_2 . Contemporaneamente, etanidrazide trimetilammonio cloruro (Girard Reagent T, composto **8**, 0.6 mg, 3.58×10^{-6} moli) è stata dissolta in 600 μL di acqua mQ. La fase acquosa, incolore, è stata quindi aggiunta a quella organica, nera, e la miscela eterogenea è stata posta sotto agitazione a temperatura ambiente dopo averne portato a 5 il pH per aggiunta di acido acetico. Dopo 30 minuti, 75 minuti, 24 ore e 48 ore sono state fatte aggiunte di Girard Reagent T rispettivamente di 1 mg, 1.5 mg, 7.5 mg e 16.4 mg, mantenendo la miscela di reazione a 40°C , verificando la colorazione della fase acquosa.

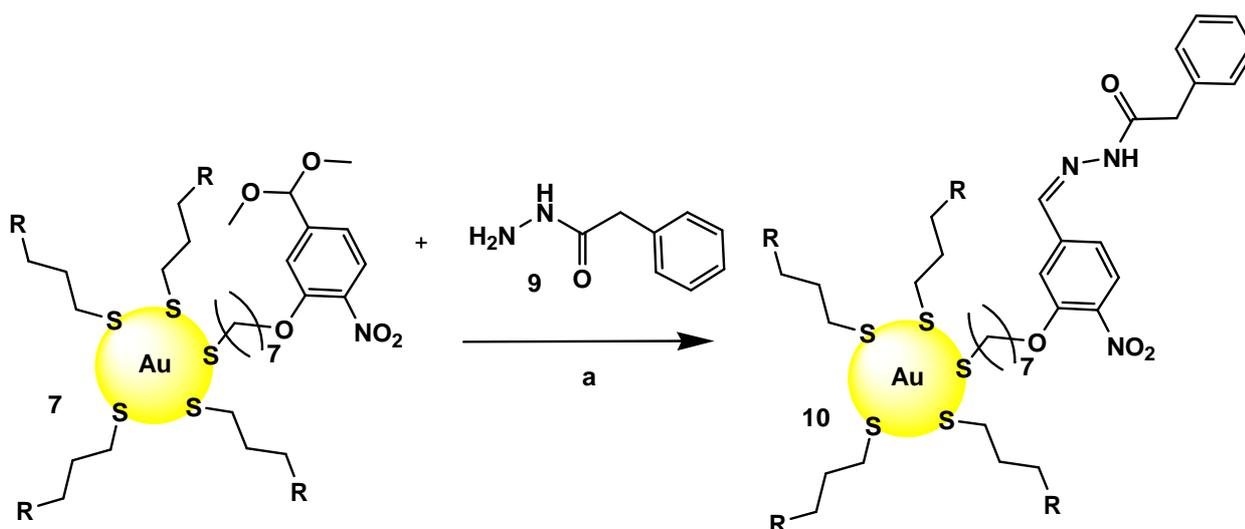
2.4.4.8 - Formazione di AuNPs- $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ in fase omogenea



Schema 2.17: sintesi di idrazoni su monostrato superficiale di AuNPs aldeidiche, fase omogenea (metanolo).

1.3 mg di AuNPs **7** sono state dissolte in 1 ml di metanolo assieme a Girard Reagent T (composto **8**, 0.8 mg, 4.77×10^{-6} moli). Dopo aggiunta di alcune gocce di TFA, la soluzione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per l'intera notte. Eliminato il solvente, il residuo è esaminato all'NMR (figura 2.4).

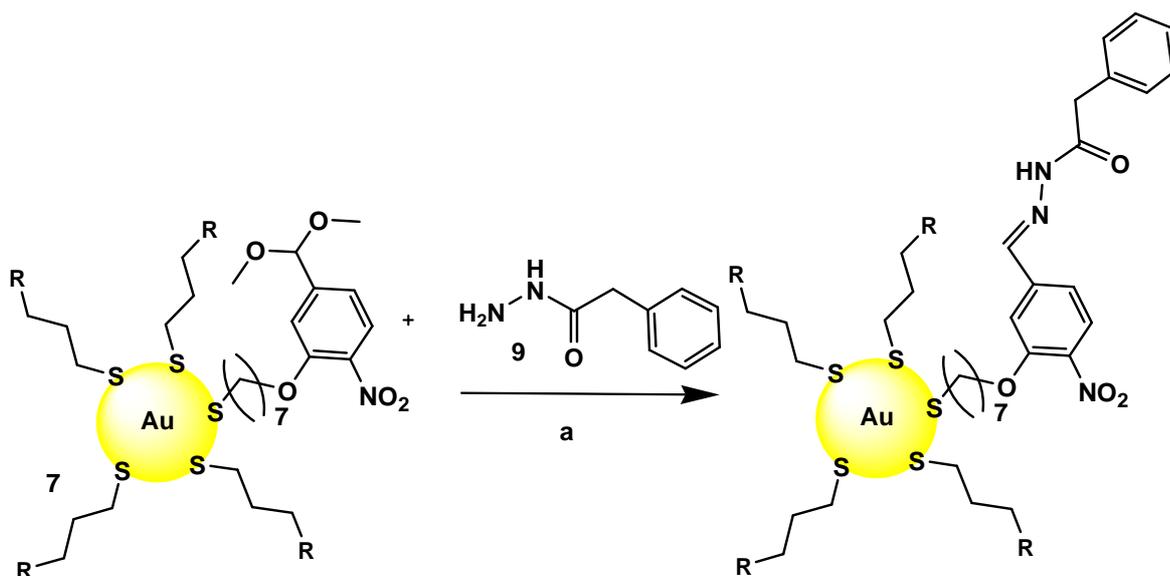
2.4.4.9 - Formazione di AuNPs-Ph in fase omogenea (10)



Schema 2.18: sintesi di idrazoni benzilici su monostrato di AuNPs aldeidiche, fase omogenea (CH_2Cl_2); a) acido acetico (concentrazione finale 15%).

1.5 mg di AuNPs (7) sono stati dissolti in 750 μL di CH_2Cl_2 , e in altrettanto CH_2Cl_2 è stata dissolta idrazide fenilacetica (composto 9, 16 mg, 1.06×10^{-4} moli). Le due frazioni sono state riunite, aggiunte di 264 μL di acido acetico (concentrazione finale 15%) e poste sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Rimosso il solvente, le AuNPs 10 sono state analizzate tramite NMR (figura 2.5).

2.4.4.10 - Formazione di AuNPs-Ph in fase eterogenea

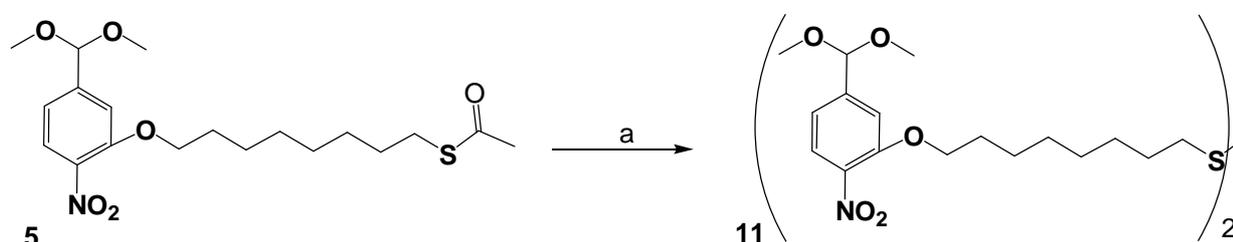


Schema 2.19: sintesi di idrazoni benzilici su monostrato di AuNPs aldeidiche, fase eterogenea (CH_2Cl_2 - H_2O); a) TFA 50%.

1.5 mg di AuNPs **7** sono stati dissolti, assieme a idrazide fenilacetica (16 mg, 1.06×10^{-4} moli), in 750 μL di CHCl_3 . A tale fase ne è stata aggiunta una seconda di 750 μL d'acqua mQ, e alle due è stata fatta un'aggiunta di 1500 μL di TFA. La miscela eterogenea è stata posta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte; dopo eliminazione del solvente per evaporazione a pressione ridotta, il residuo nero è stato esaminato all'NMR.

2.4.5 - SINTESI dei DISOLFURI

2.4.5.1 - Sintesi di [3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene] disolfuro (**11**)



Schema 2.20: a) idrazina 2 M in metanolo, tampone fosfato 0.2 M pH 7.0, I_2 , 1 notte, resa 96%.

3-(S-acetil-8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene (composto **5**, 200 mg, 5×10^{-4} moli, 1 eq) è stato dissolto in 5 ml di metanolo e aggiunto di 700 μL di soluzione d'idrazina 2 M in metanolo. Alla miscela sono stati aggiunti 5 ml di una soluzione tampone fosfato 0.2 M a pH 7, oltre a I_2 (253.8 mg, 1×10^{-3} moli, 2 eq), e il tutto è stato posto sotto agitazione per una notte e temperatura ambiente, all'aria aperta. Alla miscela è stato quindi aggiunto del carbone attivo per catturare lo iodio in eccesso, e dopo filtrazione del solido ed eliminazione del solvente dal filtrato, il grezzo è stato purificato su silice in colonna cromatografica flash (eluente CHCl_3), ottenendo [3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-1-(dimetossimetil)-benzene] disolfuro, un olio giallo (composto **11**, 173 mg, 2.4×10^{-4} moli dimero, 4.8×10^{-4} moli monomero, 0.96 eq, resa 96%).

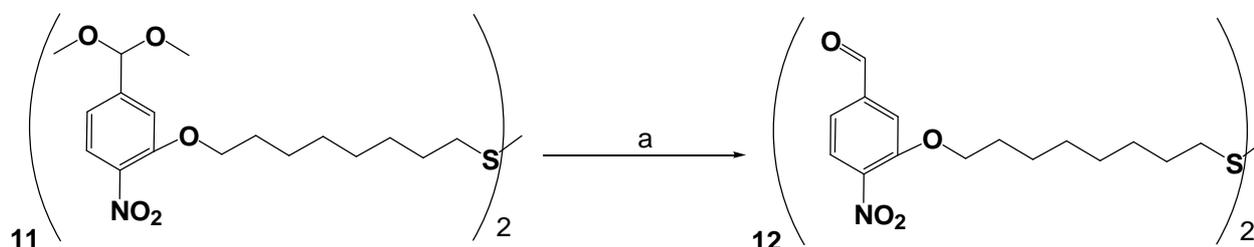
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.80 (d, 2H, $J=8.3\text{Hz}$), 7.17 (d, 2H, $J=1.2\text{Hz}$), 7.07 (dd, 2H, $J=1.3\text{Hz}$, $J=8.4\text{Hz}$), 5.38 (s, 2H), 4.10 (t, 4H, $J=6.4\text{Hz}$), 3.32 (s, 12H), 2.51 (dd, 4H, $J=7.4\text{Hz}$, $J=14.6\text{Hz}$), 1.80 (dd, 4H, $J=6.5\text{Hz}$, $J=14.6\text{Hz}$), 1.59 (dd, 4H, $J=7.4\text{Hz}$, $J=14.7\text{Hz}$), 1.35 (m, 16H, $J=3.7\text{Hz}$, $J=8.2\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 157.63, 147.57, 139.49, 130.90, 128.81, 125.74, 122.29, 121.89, 119.81, 117.12, 116.85, 113.33, 101.52, 69.97, 65.56, 52.65, 39.04, 31.91, 29.68, 25.68, 22.68, 19.16, 14.11.

MS (ESI+, MeOH): m/z 358.1 ([M+H⁺], calcolata 713.9 - frammento 358.5).

Test di Ellman: negativo.

2.4.5.2 - Sintesi di [3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-benzaldeide] disolfuro (12)



Schema 2.21: a) CHCl₃-H₂O 1:1, TFA 50%, 40 °C, 1 notte, resa 94%.

Composto 11 (173 mg, 2.4 x 10⁻⁴ moli, 1 eq) è stato dissolto in 1.5 ml di CHCl₃, e alla soluzione sono stati poi aggiunti 1.5 ml di acqua mQ. Aggiunti 3 ml di TFA alla miscela, essa è stata lasciata sotto agitazione in bagno d'olio a 40 °C per una notte. Rimossi TFA e fase organica per evaporazione, la fase acquosa è stata estratta con CHCl₃: anidrificato e rimosso per evaporazione il solvente, è stato ottenuto [3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-benzaldeide] disolfuro, olio denso rosso (composto 12, 140 mg, resa 94%).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 10.04 (s, 2H), 7.90 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.57 (d, 2H, J=1.3Hz), 7.51 (dd, 2H, J=1.5Hz, J=8.1Hz), 4.17 (t, 4H, J=6.4Hz), 2.68 (t, 4H, J=9.5Hz), 1.81 (dd, 4H, J=6.7Hz, J=12.3Hz), 1.66 (dd, 4H, J=8.3Hz, J=15.4Hz), 1.39 (d, 16H, J=15.8Hz).

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 190.39, 157.63, 147.57, 139.49, 130.90, 128.81, 125.74, 122.29, 121.89, 119.81, 117.12, 116.85, 113.33, 69.97, 65.56, 39.04, 31.91, 29.68, 25.68, 22.68, 19.16, 14.11.

MS (ESI+, MeOH): m/z 312.2 ([M+H⁺], calcolata 621.8 - frammento 312.4).

Test di Ellman: negativo.

2.4.5.3 - Sintesi di AuNPs-*p*-nitro-benzaldeide

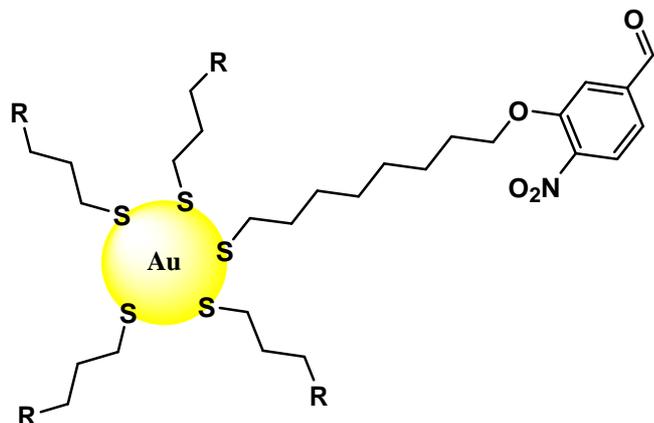
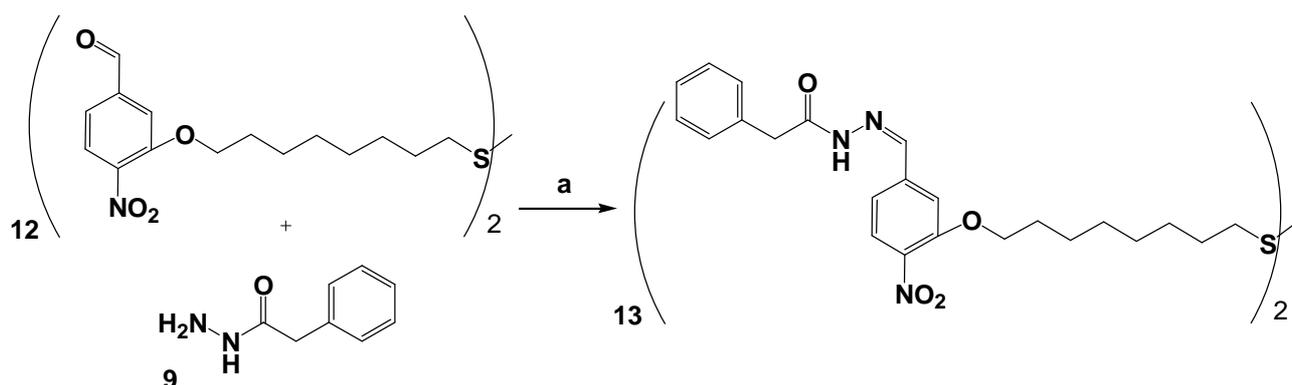


Grafico 2.10

Sono state preparate AuNPs con il metodo Brust-Schiffin, aggiungendovi una soluzione del disolfuro **12** dissolto in toluene. Raccolte le AuNPs tramite centrifugazione, esse sono state analizzate all’NMR. Invece che ricoprire le nanoparticelle, però, i tioli sono polimerizzati.

2.4.5.4 - Sintesi di N₁-[3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-benzil]-N₂-(2-fenilacetil)-idrazone disolfuro (**13**)



Schema 2.22: a) 40 °C, 24 ore, resa 87 %.

Disolfuro **12** (33 mg, 5.3×10^{-5} moli, 1 eq) è stato dissolto in 10 ml di CHCl₃, e successivamente è stato aggiunto di idrazide fenilacetica (8 mg, 5.3×10^{-5} moli, 1 eq). La miscela di reazione è stata posta in agitazione a 40 °C per 24 ore. Eliminato il solvente per evaporazione, è stato ottenuto, N₁-[3-(8-mercapto-ottilossi)-4-nitro-benzil]-N₂-(2-fenilacetil)-idrazone disolfuro, un solido rosso (composto **13**, 41 mg, 1 eq, resa 87%).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.80 (s, 2H), 7.76 (s, 2H), 7.29 (d, 2H, J=5.0Hz), 7.26 (d, 2H, J=1.5Hz), 7.23 (dd, 2H, J=2.8Hz, J=5.8Hz), 7.15 (d, 4H, J=1.2Hz), 7.04 (dd, 4H, J=1.4Hz, J=8.4Hz), 5.36 (s, 2NH), 4.08 (t, 4H, J=6.4Hz), 3.30 (s, 4H), 2.83 (t, 4H, J=7.3Hz), 1.78 (tt, 4H, J=6.4Hz, J=14.6Hz), 1.52 (tt, 4H, J=6.7Hz, J=14.2Hz), 1.31 (m, 16H, J=16.2Hz).

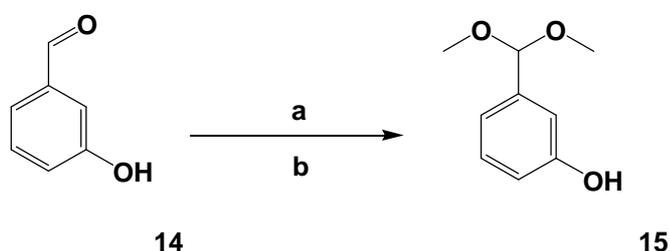
¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 179.55, 159.70, 152.13, 148.67, 146.12, 139.47, 135.90, 131.80, 130.75, 129.82, 128.79, 127.42, 125.72, 123.25, 120.51, 119.14, 117.76, 116.42, 113.33, 70.26, 65.56, 41.84, 39.54, 31.82, 29.58, 25.68, 22.47, 19.16, 14.32.

MS (ESI+, MeOH): m/z 466.5 ([M+Na⁺], calcolata [M+H⁺], 886.1 - frammento 444.6).

Test di Ellman: negativo.

2.4.6 - SINTESI di AuNPs-BENZALDEIDE

2.4.6.1 - Sintesi di 3-idrossi-1-(dimetossimetil)-benzene (15)



Schema 2.23: a) HCl 1.25 M in metanolo, 65 °C, 1 notte; b) K₂CO₃; resa quantitativa.

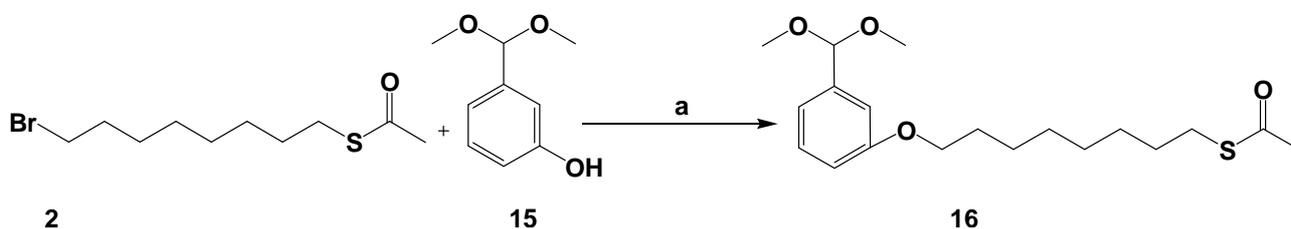
3-Idrossi-benzaldeide (composto **14**, 2 g, 16.4×10^{-3} moli, 1 eq,) è stata dissolta in 45 ml di metanolo e aggiunta di 2 ml di HCl 1.25 M in metanolo. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione e riscaldata a riflusso (65 °C) per una notte, passando da incolore a gialla. Successivamente è stato aggiunto K₂CO₃ fino a completa alcalinizzazione della soluzione, e dopo sua eliminazione per filtrazione il solvente è stato eliminato per evaporazione lasciando un olio caramellato nero, 3-idrossi-1-(dimetossimetil)-benzene (composto **15**, 2.75 g, resa quantitativa).

¹H-NMR (250 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.14 (t, 1H, J=7.8Hz), 6.86 (d, 1H, J=2.0Hz), 6.81 (s, 1H), 6.74 (dd, 1H, J=1.6Hz, J=8.1Hz), 5.26 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 3.29 (s, 6H).

¹³C-NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 159.66, 140.76, 130.17, 118.22, 116.94, 115.08, 104.83, 53.27.

MS (ESI+, MeOH): m/z 169.3 ([M+H⁺], calcolata 169.2).

2.4.6.2 - Sintesi di 3-(8-mercapto-ottilossi)-1-(dimetossimetil)-benzene (16)



Schema 2.24: a) K₂CO₃, acetonitrile, 50 °C, 48 h.

S-acetil-8-mercapto-1-bromooottano (composto **2**, 730 mg, 2.73×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto in 50 ml di acetonitrile e aggiunto di 3-idrossi-benzil-dimetilacetale (composto **15**, 505 mg, 3×10^{-3} moli, 1.1 eq) e K₂CO₃ (755 mg, 5.46×10^{-3} moli, 2 eq). La miscela gialla brunita così ottenuta è stata posta sotto agitazione e riscaldata a 50 °C per due

giorni: la sospensione è stata quindi filtrata, eliminando il precipitato rosa scuro, ottenendo una limpida soluzione arancione. Dopo eliminazione per evaporazione del solvente è stato ottenuto un solido rosso scuro, grezzo di reazione contenente 3-(8-mercapto-ottilossi)-1-(dimetossimetil)-benzene (composto **16**). Dalla purificazione tramite cromatografia flash su silice sono uscite diverse frazioni, ma in nessuna di esse era presente il composto **16** puro, bensì 3-(8-mercapto-ottilossi)-benzaldeide (composto **17**).

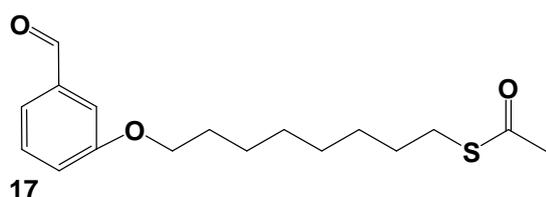


Grafico 2.11

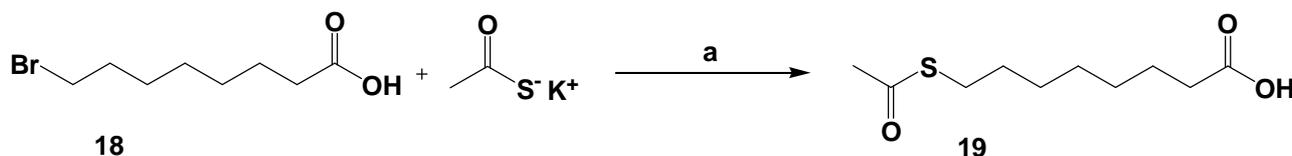
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.96 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, J=1.5Hz), 7.37 (d, 1H, J=1.7Hz), 7.16 (dd, 1H, J=2.6Hz, J=6.7Hz), 4.00 (t, 2H, J=6.5Hz), 2.86 (t, 2H, J=7.2Hz), 2.31 (s, 3H), 1.80 (dd, 2H, J=7.1Hz, J=13.8Hz), 1.55 (dd, 2H, J=7.3Hz, J=14.5Hz), 1.33 (m, 8H, J=9.3Hz).

MS (ESI+, MeOH): m/z 309.4 ([M+H⁺], calcolata 309.4).

Test di Ellman: negativo.

2.4.7 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs con ALDEIDI LATENTI da DIOLO VICINALE

2.4.7.1 - Sintesi di acido S-acetil-8-mercapto-ottanoico (**19**)



Schema 2.25: a) acetone anidro, N₂, 1 notte, RT, tubo CaCl₂, resa 84%.

Acido 8-bromo-ottanoico (2 g, 9 x 10⁻³ moli, 1 eq, composto **18**) è stato dissolto in 25 ml di acetone anidro, mantenendo l'ambiente in atmosfera di azoto. È quindi stato aggiunto tioacetato di potassio (1.1 g, 9 x 10⁻³ moli, 1 eq), e la miscela di reazione è stata posta sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente, proteggendola dall'umidità tappando il pallone con tubo ripieno di CaCl₂. Verificato l'ottenimento del prodotto con TLC (silice, CH₂Cl₂, UV, I₂), dalla miscela è rimosso il precipitato salino

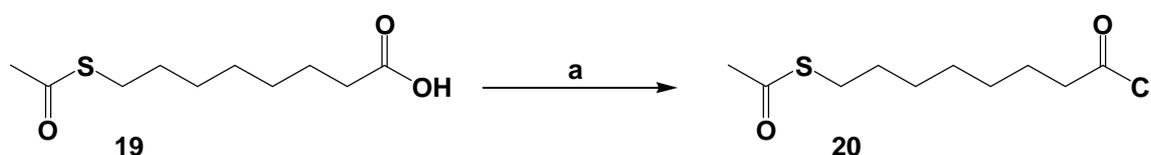
insolubile per filtrazione; solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta, ottenendo un olio giallo arancio, acido S-acetil-8-mercapto-ottanoico puro (1.69 g, composto **19**, resa 84 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD): δ (ppm) 2.86 (t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.30 (s, 3H), 2.26 (t, 2H, $J=7.4\text{Hz}$), 1.58 (dd, 4H, $J=7.1\text{Hz}$, $J=14.3\text{Hz}$), 1.37 (m, 6H, $J=15.9\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 197.61, 177.80, 35.03, 30.73, 30.56, 30.11, 29.91, 29.84, 29.66, 26.06.

MS (ESI+, MeOH): m/z 219.2 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 219.3).

2.4.7.2 - Sintesi di S-acetil-8-mercapto-ottanoil cloruro (**20**)



Schema 2.26: a) CH_2Cl_2 anidro, N_2 , SOCl_2 , 1 notte, RT, resa quantitativa.

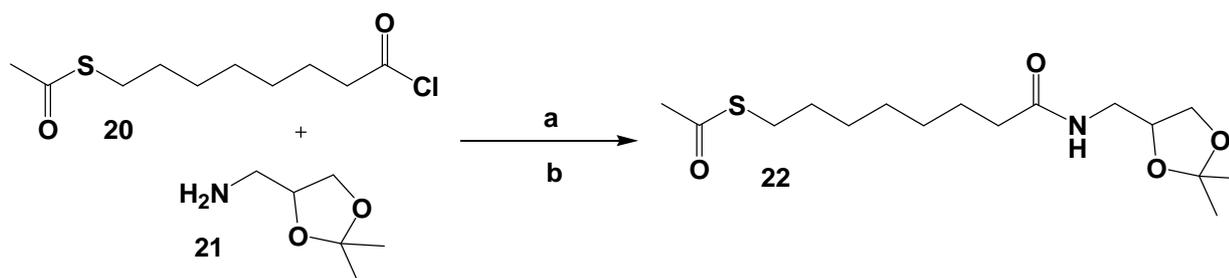
Acido S-acetil-8-mercapto-ottanoico (composto **19**, 400 mg, 1.83×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto in 20 ml di CH_2Cl_2 anidro, in atmosfera di azoto. Dopo l'aggiunta di tionil cloruro (266 μl , 435 mg, 3.66×10^{-3} moli, 2 eq), la miscela incolore è stata lasciata in atmosfera di azoto sotto agitazione per l'intera notte. Divenuta rosata, la miscela è stata portata a secco per eliminazione del solvente, ottenendo un olio giallo arancione bruno, S-acetil-8-mercapto-ottanoil cloruro (composto **20**, 430 mg, resa quantitativa).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.85 (t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.72 (s, 3H), 2.29 (t, 2H, $J=7.4\text{Hz}$), 1.65 (dd, 4H, $J=7.1\text{Hz}$, $J=14.3\text{Hz}$), 1.39 (m, 6H, $J=15.9\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 193.22, 172.48, 41.52, 32.62, 31.47, 30.31, 29.95, 29.54, 28.54, 26.26.

Test di Ellman: negativo.

2.4.7.3 - Sintesi di N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammide (22)



Schema 2.27: a) CH₂Cl₂ anidro, TEA, flusso N₂, RT, no hv, 48 h; b) diluizione CHCl₃, lavaggio con H₃PO₄ 0.1 M ed NaHCO₃ saturo, resa 97%.

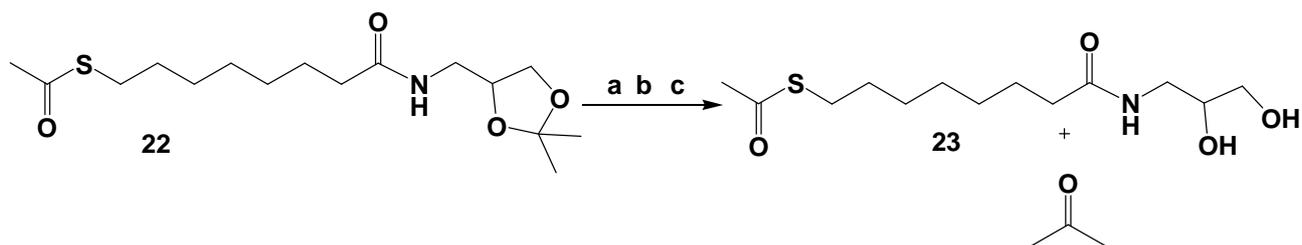
Il composto **20** (430 mg, 1.83×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto, in atmosfera di azoto, in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro (soluzione arancione chiaro). La miscela è stata poi aggiunta di 2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammia (composto **21**, 486 μ l, 492 mg, 3.75×10^{-3} moli, 2.05 eq) e di TEA (790 μ l, 574 mg, 5.67×10^{-3} moli, 3.1 eq), ottenendo una soluzione gialla limpida. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione in atmosfera di azoto due giorni, al riparo dalla luce. Verificata la scomparsa del reagente tramite TLC (silice, CH₂Cl₂, UV), la miscela è stata diluita con 30 ml di CHCl₃, posta in imbuto separatore e lavata rispettivamente con una soluzione acquosa di H₃PO₄ 0.1 M (20 ml x 3) e con una soluzione acquosa di NaHCO₃ saturo (20 ml x 3). Dopo anidrifcazione con Na₂SO₄, il solvente è stato eliminato per evaporazione ottenendo un olio giallo, N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammide (composto **22**, 586 mg, resa 97%).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.84 (s, 1NH), 4.22 (dd, 1H, J=3.4Hz, J=6.3Hz), 4.03 (d, 2H, J=2.0Hz), 3.61 (t, 2H, J=2.1Hz), 3.27 (dd, 2H, J=6.5Hz, J=13.7Hz), 2.50 (t, 2H, J=7.4Hz), 2.20 (dd, 2H, J=5.8Hz, J=13.0Hz), 2.00 (s, 3H), 1.61 (dd, 2H, J=7.5Hz, J=14.9Hz), 1.42 (s, 6H), 1.33 (m, 6H, J=5.1Hz).

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 190.58, 173.33, 109.29, 74.63, 66.63, 41.72, 36.64, 33.88, 29.08 (s, 3C), 28.72 (s, 2C), 28.12, 26.76, 25.11.

MS (ESI+, MeOH): m/z 332.3 ([M+H⁺], calcolata 332.5).

2.4.7.4 - Sintesi di N-(2,3-diidrossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanamide (23)



Schema 2.28: a) THF + HCl 1:1, 2 h, RT; b) lavaggio con NaOH 10%; c) liofilizzazione; resa 95%.

N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-2,2-dimetil-1,3-diossolan-4-metanammide (composto 22, 586 mg, 1.77×10^{-3} moli) è stata dissolta in 15 ml di THF, ai quali sono stati poi aggiunti 15 ml di una soluzione acquosa di HCl 1 M: la miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per due ore. Eliminato il solvente organico per evaporazione, la fase acquosa è stata alcalinizzata con NaOH 10%, con viraggio della soluzione incolore fino al giallo e poi all'arancione, per poi essere posta a liofilizzare. La polvere bianca ottenuta è stata triturrata in etanolo e CH_2Cl_2 : dopo filtrazione ed evaporazione del solvente è rimasto un solido rosato, N-(2,3-diidrossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanamide (composto 23, 490 mg, resa 95%).

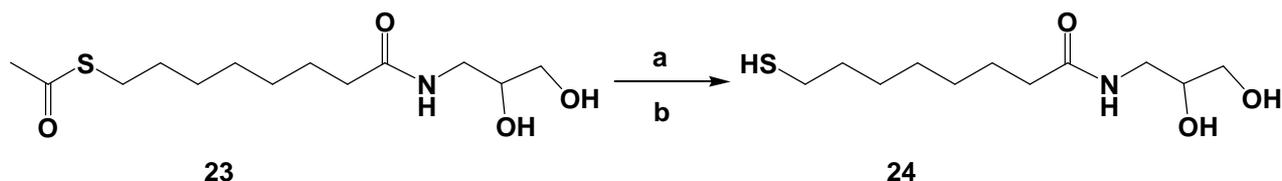
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD): δ (ppm) 8.54 (s, 1NH) 3.68 (dd, 1H, $J=5.4\text{Hz}$, $J=11.9\text{Hz}$) 3.58 (dd, 2H, $J=5.7\text{Hz}$, $J=12.7\text{Hz}$) 3.49 (dd, 2H, $J=3.2\text{Hz}$, $J=7.0\text{Hz}$) 2.68 (t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$) 2.22 (t, 2H, $J=7.5\text{Hz}$) 1.97 (s, 2OH) 1.89 (s, 3H) 1.66 (dd, 4H, $J=6.9\text{Hz}$, $J=14.0\text{Hz}$) 1.36 (m, 6H, $J=1.4\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 175.03, 143.07, 111.82, 70.73, 63.44, 36.17, 33.67, 28.95, 28.59, 27.95, 25.49, 24.37.

MS (ESI+, MeOH): m/z 292.2 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 292.4).

Test di Ellman: negativo.

2.4.7.5 - Sintesi di N-(2,3-diidrossipropil)-8-mercapto-ottanamide (24)



Schema 2.29: a) t-ButOK, MeOH anidro, CH_2Cl_2 anidro, N_2 , RT, no hv, 1 h; b) diluizione con HCl 1 M, estrazione CH_2Cl_2 ; resa 25%.

N-(2,3-diidrossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanammide (composto **23**, 490 mg, 1.65×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto in 20 ml di metanolo anidro e in 5 ml di CH_2Cl_2 anidro, in atmosfera di azoto. Alla soluzione sono stati aggiunti 1.18 g di terz-butossido di potassio (9.6×10^{-3} moli, 5.8 eq) pre-dissolti in alcuni ml di analogo solvente anidro. La miscela è stata posta sotto agitazione per 1 ora a temperatura ambiente e al buio, per poi essere diluita con 20 ml di HCl 1 M ed estratta con CH_2Cl_2 . Il grezzo così ottenuto è stato purificato su colonna di silice flash (eluente CH_2Cl_2 :EtOH 93:7), ottenendo N-(2,3-diidrossipropil)-8-mercapto-ottanammide come solido bianco (composto **24**, 102.4 mg, 4.1×10^{-4} moli, resa 25%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD): δ (ppm) 6.12 (s, 1NH), 3.65 (tt, 1H, $J=4.2\text{Hz}$), 3.46 (dd, 2H, $J=12.3\text{Hz}$), 3.08 (dd, 2H, $J=2.9\text{Hz}$), 2.80 (s, 2OH), 2.51 (dt, 2H, $J=7.4\text{Hz}$, $J=14.6\text{Hz}$), 2.22 (t, 2H, $J=7.5\text{Hz}$), 1.61 (tt, 4H, $J=6.7\text{Hz}$, $J=13.7\text{Hz}$), 1.33 (m, 6H, $J=7.7\text{Hz}$), 1.27 (s, 1SH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 175.02, 70.98, 63.53, 41.99, 38.50, 36.28, 29.30, 28.93, 28.63, 28.43, 25.51.

MS (ESI+, MeOH): m/z 250.6 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 250.4).

Test di Ellman: positivo.

2.4.7.6 - Sintesi di AuNPs 25

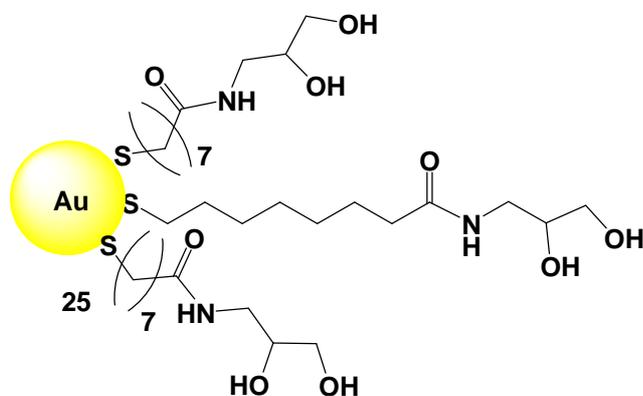
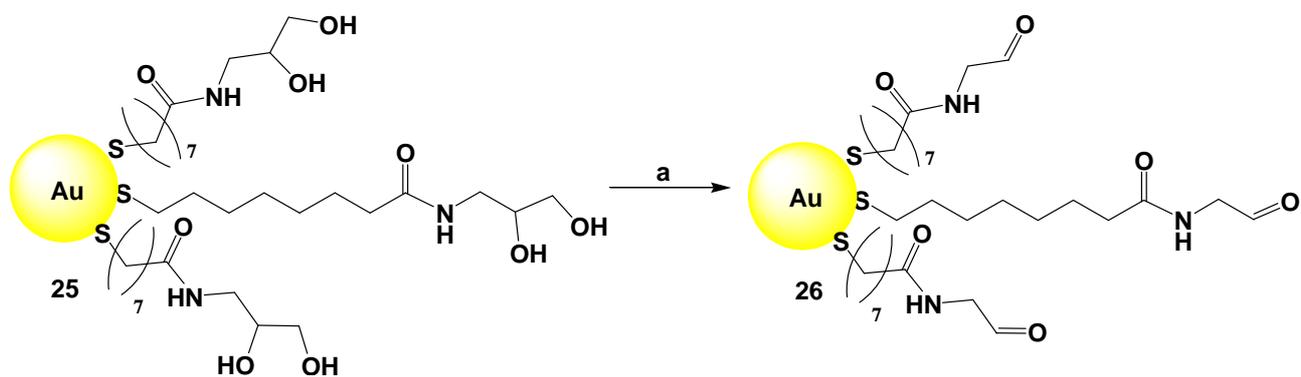


Grafico 2.12

Sono state preparate AuNPs col metodo Scrimin, aggiungendovi successivamente una soluzione in alcuni ml di isopropanolo di composto **24** (26 mg, 1.05×10^{-4} moli). Dopo una notte sotto agitazione a temperatura ambiente, le NPs (**25**) sono state recuperate per centrifugazione, scarsamente solubili in metanolo.

2.4.7.7 - Sintesi di AuNPs 26

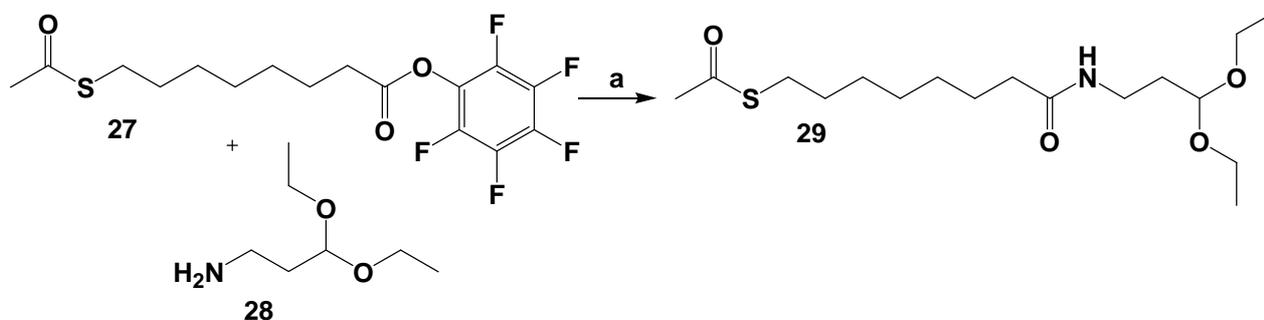


Schema 2.30: a) NaIO_4 , tampone acetato pH 5.5, 1 h, no hv, RT.

Le AuNPs 25 sono state disperse in una soluzione di NaIO_4 5×10^{-2} M in tampone acetato 0.1 M a pH 5.5, lasciando la miscela in agitazione a temperatura ambiente e al buio per un'ora. Dopo eliminazione del surnatante rosa, sono state recuperate le NPs 26, completamente insolubili in acqua e solventi organici.

2.4.8 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs con ALDEIDI ALIFATICHE PROTETTE

2.4.8.1 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanamide (29)



Schema 2.31: a) CH_2Cl_2 , 1 notte, RT; resa 91%.

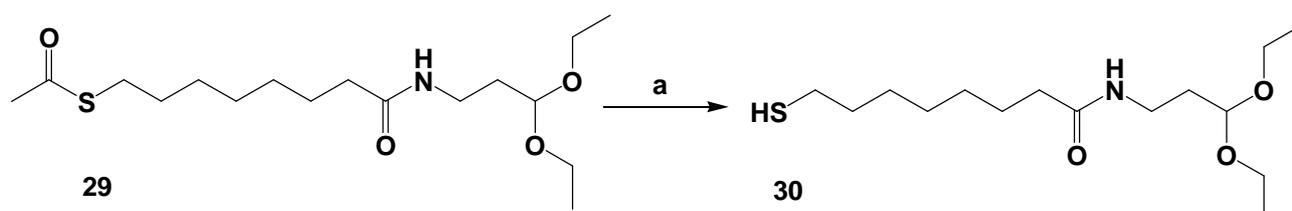
S-acetil-8-mercapto-ottanoato di pentafluorofenile (composto 27, 384 mg, 1×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto in 30 ml di CH_2Cl_2 , mescolato a 1-ammino-3,3-dietossipropano (composto 28, 134 μL , 147 mg, 1×10^{-3} moli, 1 eq) e posto sotto agitazione per una notte RT. Purificato il grezzo di reazione tramite colonna cromatografica flash su silice (eluente CH_2Cl_2), è stato ottenuto N-(3,3-dietossipropil)-S-acetil-8-mercapto-ottanamide come solido giallo (composto 29, 315 mg, resa 91%).

¹H-NMR (250 MHz CDCl₃): δ (ppm) 6.14 (s, 1H), 4.56 (t, 1H, J=5.0Hz), 3.72 (q, 4H, J=7.0Hz), 3.50 (dt, 2H, J=7.1Hz, J=9.3Hz), 2.52 (dt, 2H, J=5.7Hz, J=9.3Hz), 2.28 (s, 3H), 2.14 (t, 2H, J=6.2Hz), 1.82 (dt, 2H, J=5.2Hz, J=12.4Hz), 1.61 (tt, 4H, J=7.0Hz, J=14.0Hz), 1.34 (m, 6H, J=7.7Hz), 1.24 (t, 6H, J=7.1Hz).

¹³C-NMR (300 MHz CDCl₃): δ (ppm) 175.03, 143.07, 120.51, 57.13, 37.84, 36.17, 33.67, 33.53, 28.95, 28.59, 27.95, 25.49, 24.37, 18.05.

MS (ESI+, MeOH): m/z 348.5 ([M+H⁺], calcolata 348.5).

2.4.8.2 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-8-mercapto-ottanammide (30)



Schema 2.32: a) EtOH, EtONa, N₂, 1.5 h, RT; b) HCl 1.25 M in MeOH; resa quantitativa.

Il composto **29** (45 mg, 1.3×10^{-4} moli, 1 eq) è stato dissolto in EtOH e aggiunto di 140 μ L (2.6×10^{-4} moli, 2 eq) di una soluzione 1.84 M di etossido di sodio, lasciando la miscela sotto agitazione in atmosfera di azoto per 1,5 ore RT. Verificato l'andamento della reazione tramite analisi di massa, l'ambiente alcalino della miscela è stato acidificato lievemente per aggiunta di HCl 1.25 M in MeOH, ottenendo N-(3,3-dietossipropil)-8-mercapto-ottanammide (composto **30**, 39 mg, resa quantitativa).

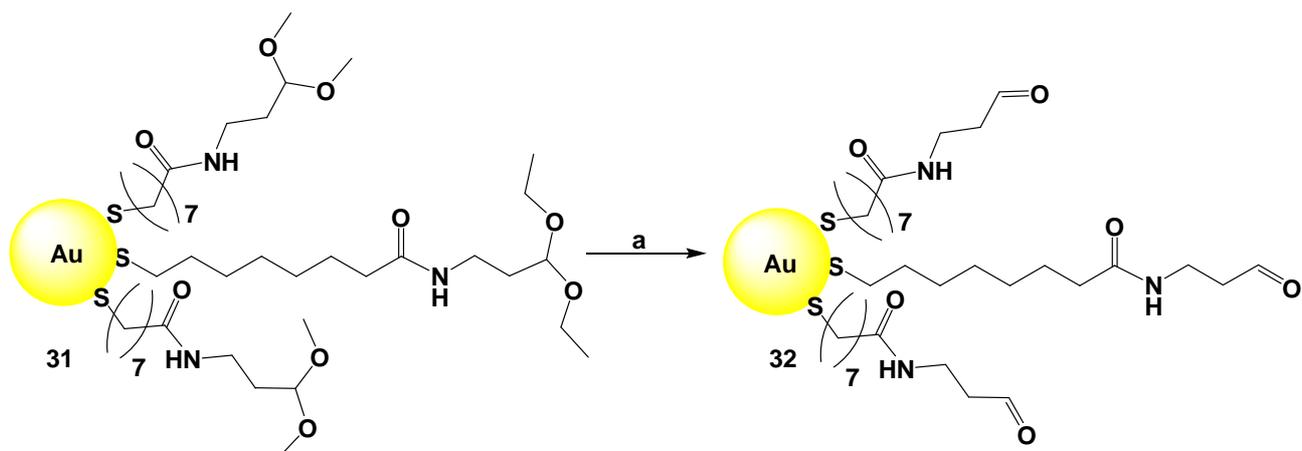
¹H-NMR (250 MHz CDCl₃): δ (ppm) 6.14 (s, 1H), 4.56 (t, 1H, J=5.0Hz), 3.72 (q, 4H, J=7.0Hz), 3.50 (dt, 2H, J=7.1Hz, J=9.3Hz), 2.52 (dt, 2H, J=5.7Hz, J=9.3Hz), 2.32 (s, 1SH), 2.14 (t, 2H, J=6.2Hz), 1.82 (dt, 2H, J=5.2Hz, J=12.4Hz), 1.61 (tt, 4H, J=7.0Hz, J=14.0Hz), 1.34 (m, 6H, J=7.7Hz), 1.24 (t, 6H, J=7.1Hz).

¹³C-NMR (300 MHz CDCl₃): δ (ppm) 144.37, 118.20, 57.13, 37.84, 36.17, 34.57, 33.67, 28.78, 27.39, 25.93, 25.49, 18.05.

MS (ESI+, MeOH): m/z 306.5 ([M+H⁺], calcolata 306.5).

Test di Ellman: positivo.

2.4.8.3 - Sintesi di AuNPs 32

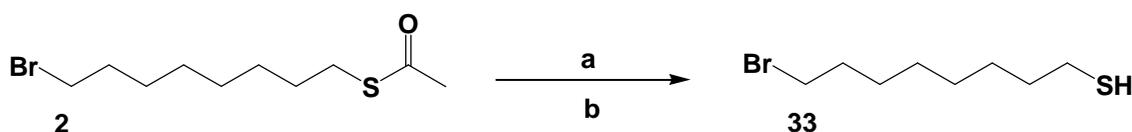


Schema 2.33: a) TFA 50% in CH₂Cl₂.

Sono state sintetizzate AuNPs col metodo Brust-Schiffin, usando 12.5 mg di HAuCl₄ (3.18×10^{-5} moli) e 650 mg di TOABr, iniettandovi il composto **30** (22.5 mg, 7.4×10^{-5} moli) dissolto in pochi ml di toluene prima della rapida aggiunta del NaBH₄ (6 mg) in 400 μ l di acqua mQ. Sono state ottenute NPs insolubili (**31**), precipitate e raccolte per centrifugazione. Disperse in una soluzione di TFA 50% in CH₂Cl₂, sono rimaste insolubili (**32**).

2.4.9 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs tramite ALCHILAZIONE con ALDEIDI PROTETTE

2.4.9.1 - Sintesi di 8-bromo-ottantiolo (**33**)



Schema 2.34: a) HBr, EtOH, 85°C, 2 h; b) CHCl₃; resa 95%.

Il composto **2** (100 mg, 3.7×10^{-4} moli) è stato posto in pallone da 10 ml e aggiunto di 4 ml di soluzione di HBr 3 M in etanolo, ponendo la miscela in agitazione a 85°C per 2 ore. Dalla soluzione arancione risultante è stato rimosso il solvente per evaporazione, e dal residuo acquoso il prodotto 8-bromo-ottantiolo, solido arancione, è stato estratto con CHCl₃ (composto **33**, 80 mg, resa 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 3.40 (t, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 2.51 (dt, 2H, $J=7.3\text{Hz}$, $J=14.0\text{Hz}$), 1.83 (tt, 2H, $J=7.0\text{Hz}$, $J=14.4\text{Hz}$), 1.58 (tt, 2H, $J=7.2\text{Hz}$, $J=14.5\text{Hz}$), 1.39 (m, 8H, $J=17.6\text{Hz}$), 1.32 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): δ (ppm) 33.89, 32.66, 28.80, 28.56, 28.50, 28.16, 28.01, 24.56.

MS (ESI+, MeOH): m/z 226.0 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 226.2).

Test di Ellman: positivo.

2.4.9.2 - Sintesi di AuNPs 34

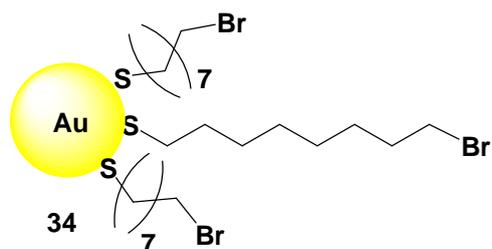


Grafico 2.13

Sono state sintetizzate AuNPs (**34**) col metodo Brust-Schiffin, aggiungendovi il composto **33** (50 mg, 2.2×10^{-4} moli). Dopo precipitazione, sono state recuperate per centrifugazione (NMR in figura 2.9).

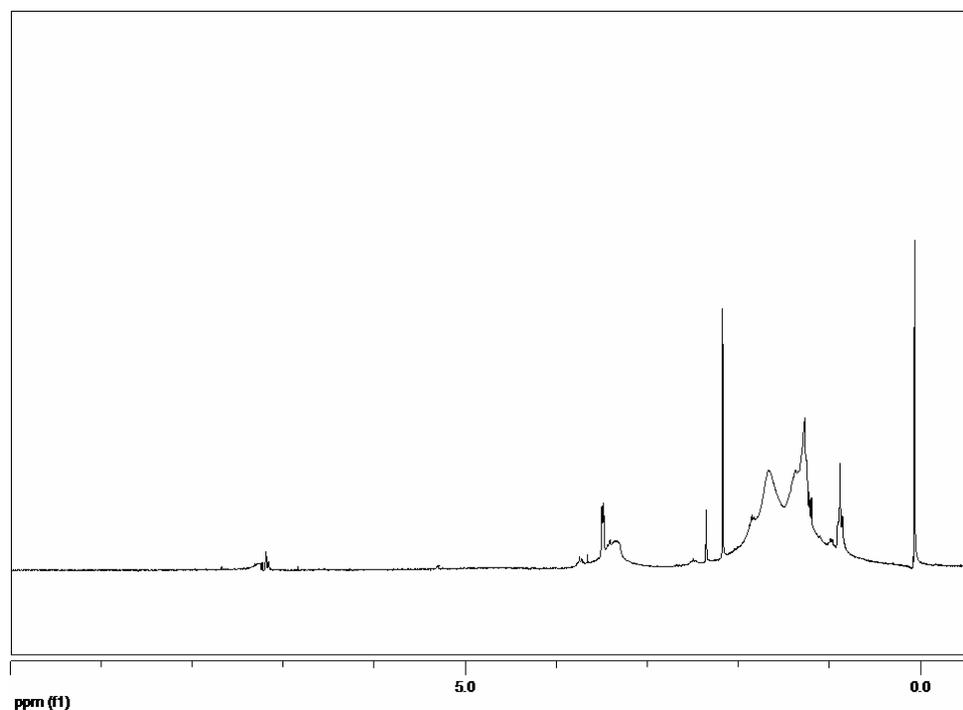
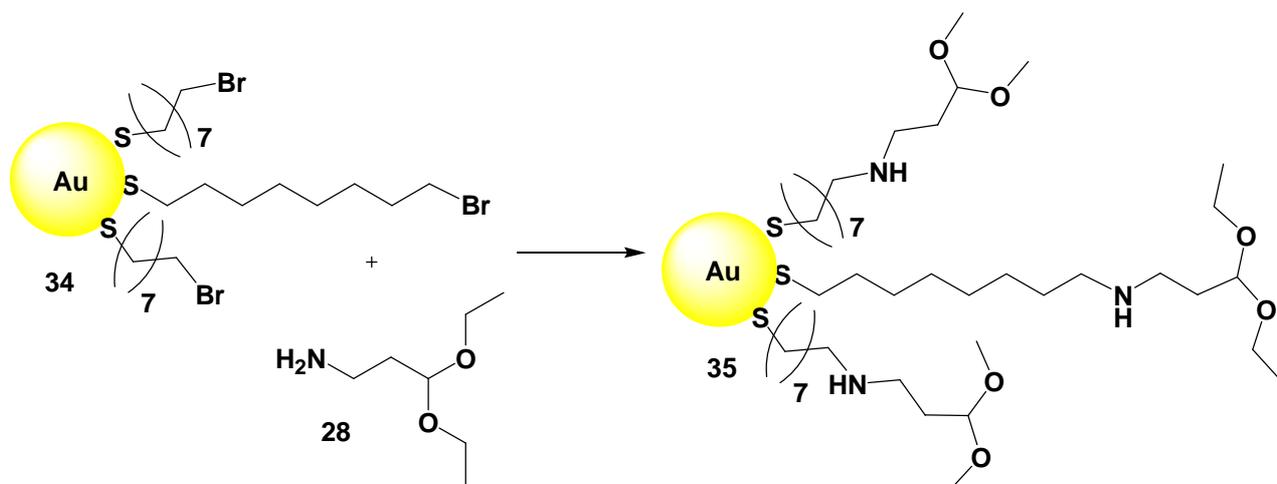


Figura 2.9: spettro NMR delle AuNPs 35.

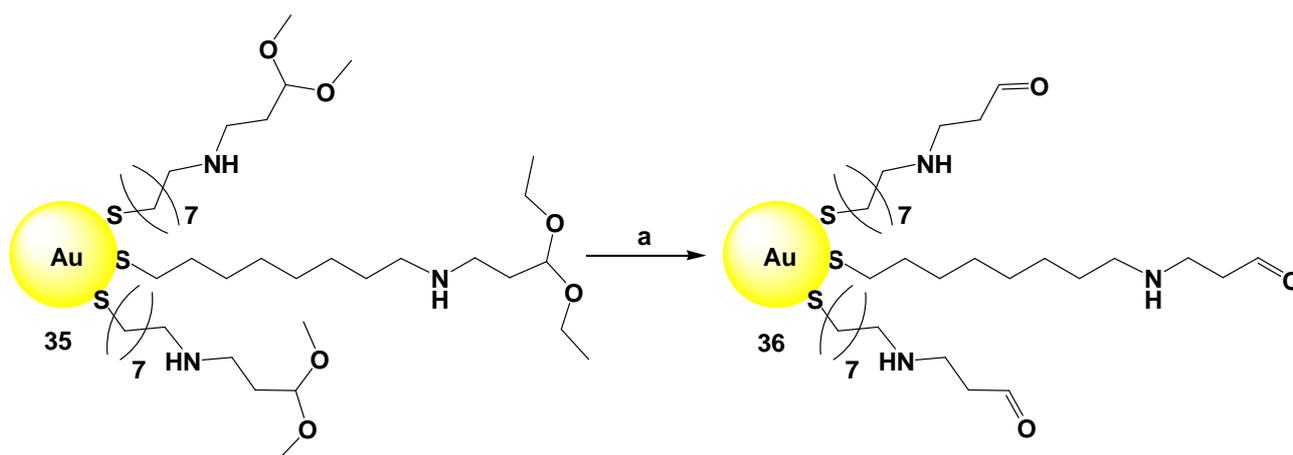
2.4.9.3 - Sintesi di AuNPs 35



Schema 2.35: ACN:CH₂Cl₂ 1:1.

Le NPs **34** (5.2×10^{-5} moli d' Au, 1 eq) sono state dissolte in una soluzione composta da 10 ml di acetonitrile e da 10 ml di CH₂Cl₂; a tale soluzione è stata aggiunta 1-ammino-3,3-dietossipropano (composto **28**, 115 mg, 7.8×10^{-4} moli, 15 eq). Sono così state ottenute le NPs (**35**), che sono però risultate insolubili.

2.4.9.4 - Sintesi di AuNPs 36

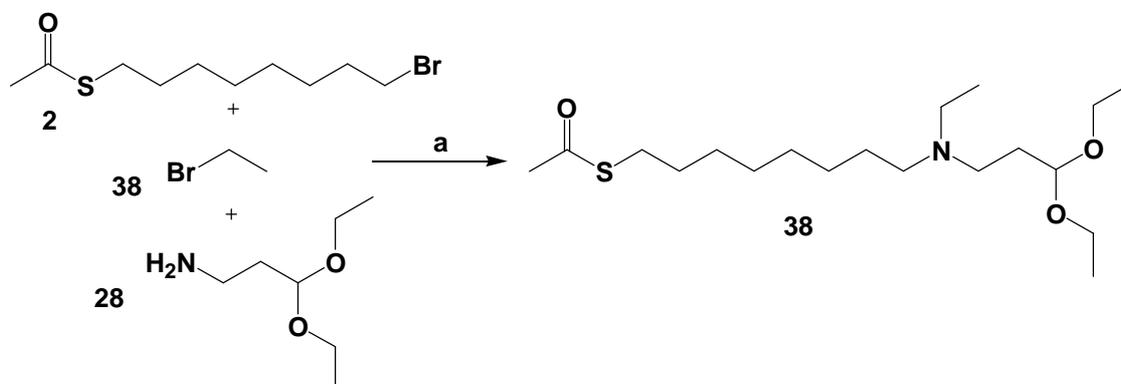


Schema 2.36: a) TFA in CHCl₃, 90 min, 0 °C.

Le AuNPs **35** sono state disperse in 10 ml di CHCl₃, e alla sospensione sono stati aggiunti 3.5 ml di TFA. Lasciata la miscela in agitazione per 90 minuti a 0 °C, sono state ottenute le AuNPs (**36**). Esse sono risultate però insolubili.

2.4.10 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs con TIOLO 40

2.4.10.1 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-S-acetil-8-mercapto-ottanamina (38)



Schema 2.37: a) acetonitrile, K_2CO_3 , $80^\circ C$, 24 ore, resa 67%.

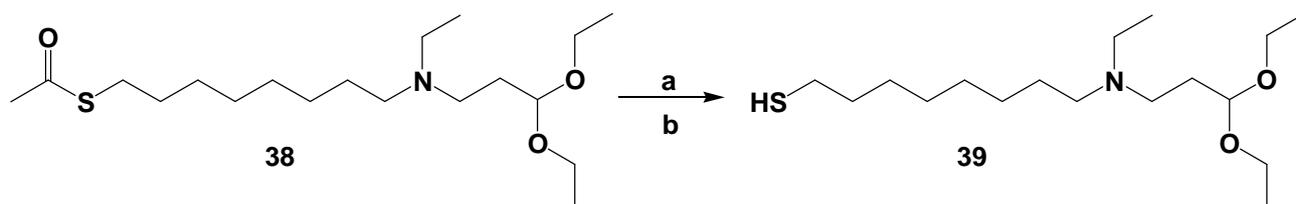
S-acetil-8-mercapto-1-bromoottano (composto 2, 311 mg, 1.16×10^{-3} moli, 1 eq) è stato posto in soluzione in ACN con etilbromuro (composto 37, 87 μ l, 126 mg, 1.16×10^{-3} moli, 1 eq) e con K_2CO_3 (610 mg, 4.41×10^{-3} moli, 3.8 eq). La miscela è stata posta in agitazione a $80^\circ C$ e, non appena raggiunta la temperatura, è stata aggiunta di 1-ammino-3,3-dietossipropano (composto 28, 178 μ l, 162 mg, 1.10×10^{-3} moli, 0,95 equivalenti), lasciando la reazione procedere sotto agitazione per un giorno ed una notte. Il prodotto è stato purificato con colonna cromatografica flash su silice (eluente CH_2Cl_2 e $CH_2Cl_2 + MeOH$ 10%), ottenendo N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-S-acetil-8-mercapto-ottanamina (composto 38, 280 mg, resa 67%).

1H -NMR (250 MHz $CDCl_3$): δ (ppm) 6.25 (s, 1H), 4.49 (t, 1H, $J=5.0$ Hz), 3.76 (q, 4H, $J=7.0$ Hz), 3.51 (dt, 2H, $J=7.1$ Hz, $J=9.3$ Hz), 2.52 (dt, 2H, $J=5.7$ Hz, $J=9.3$ Hz), 2.42 (q, 2H, $J=7.0$ Hz), 2.28 (s, 3H), 2.14 (t, 2H, $J=6.2$ Hz), 1.82 (dt, 2H, $J=5.2$ Hz, $J=12.4$ Hz), 1.61 (tt, 4H, $J=7.0$ Hz, $J=14.0$ Hz), 1.48 (t, 3H, $J=7.0$ Hz), 1.34 (m, 6H, $J=7.7$ Hz), 1.24 (t, 6H, $J=7.1$ Hz).

^{13}C -NMR (300 MHz $CDCl_3$): δ (ppm) 176.43, 121.42, 57.13, 53.96, 47.15, 44.35, 36.34, 33.67, 31.68, 28.95, 28.64, 27.95, 24.37, 18.05, 13.78.

MS (ESI+, MeOH): m/z 362.4 ($[M+H]^+$, calcolata 362.6).

2.4.10.2 - Sintesi di N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-8-mercapto-ottanamina (39)



Schema 2.38: a) EtO⁻Na⁺, etanolo, 1 h, RT; b) TFA; resa quantitativa.

Il composto **38** (72 mg, 2×10^{-4} moli, 1 eq) è stato dissolto in etanolo, e alla soluzione sono stati aggiunti 125 μ l di etossido di sodio 3.2 M (4×10^{-4} moli, 2 eq), lasciando la miscela in agitazione per 1 ora RT in atmosfera di azoto. Dopo acidificazione, il solvente è stato eliminato ottenendo N-(3,3-dietossipropil)-N-etil-8-mercaptoottanamina (composto **39**, resa quantitativa).

¹H-NMR (250 MHz CDCl₃): δ (ppm) 6.25 (s, 1H), 4.49 (t, 1H, J=5.0Hz), 3.76 (q, 4H, J=7.0Hz), 3.51 (dt, 2H, J=7.1Hz, J=9.3Hz), 2.52 (dt, 2H, J=5.7Hz, J=9.3Hz), 2.42 (q, 2H, J=7.0Hz), 2.35 (s, 1SH), 2.14 (t, 2H, J=6.2Hz), 1.82 (dt, 2H, J=5.2Hz, J=12.4Hz), 1.61 (tt, 4H, J=7.0Hz, J=14.0Hz), 1.48 (t, 3H, J=7.0Hz), 1.34 (m, 6H, J=7.7Hz), 1.24 (t, 6H, J=7.1Hz).

¹³C-NMR (300 MHz CDCl₃): δ (ppm) 121.42, 57.13, 53.96, 47.15, 44.35, 36.34, 34.54, 31.68, 29.66, 28.75, 25.97, 24.37, 18.05, 13.78.

MS (ESI⁺, MeOH): m/z 320.5 ([M+H⁺], calcolata 320.6).

Test di Ellman: positivo.

2.4.10.3 - Sintesi di AuNPs 40

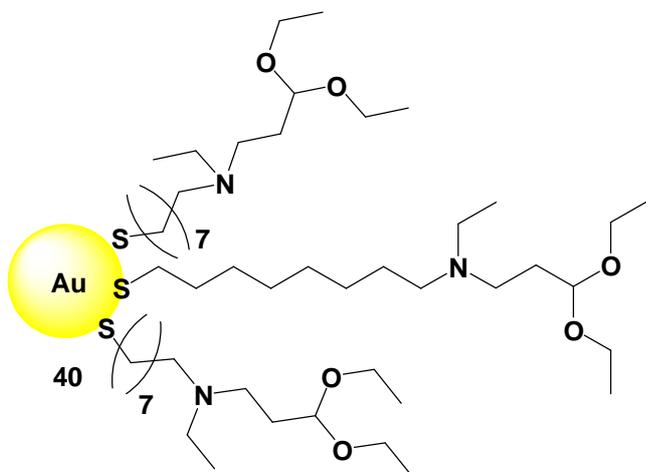
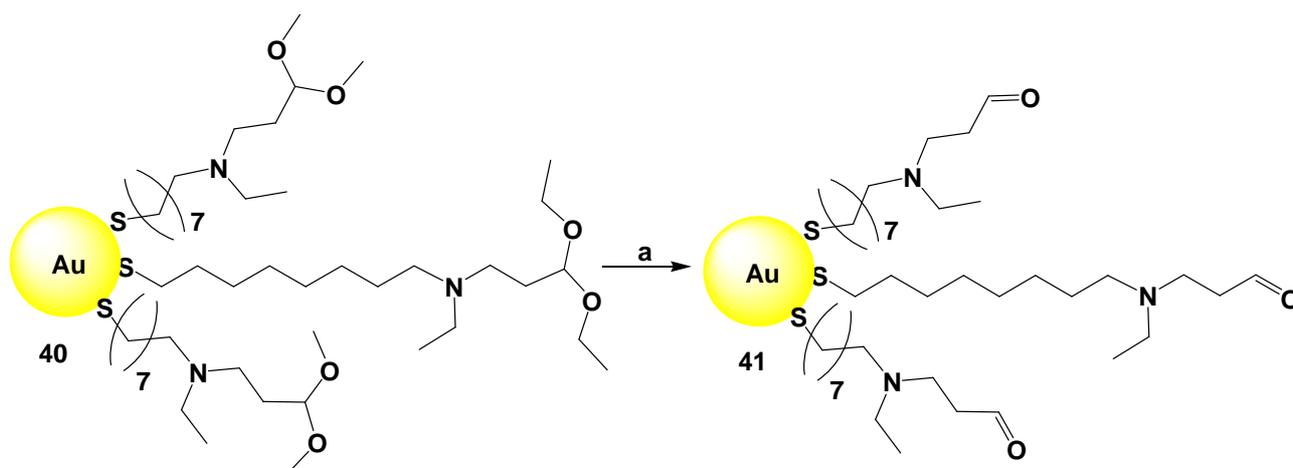


Grafico 2.14

Sfruttando il metodo Brust-Schiffin, sono state sintetizzate AuNPs utilizzando il composto **39** (63 mg, 1.97×10^{-4} moli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione RT per 3 ore, al termine delle quali il solvente è stato eliminato per evaporazione, riprendendo il residuo nero con metanolo. Le AuNPs **40** sono risultate molto solubili, purificate su colonna ad esclusione dimensionale Sephadex LH60 in metanolo (spettro NMR in figura 2.6)

2.4.10.4 - Sintesi di AuNPs 41

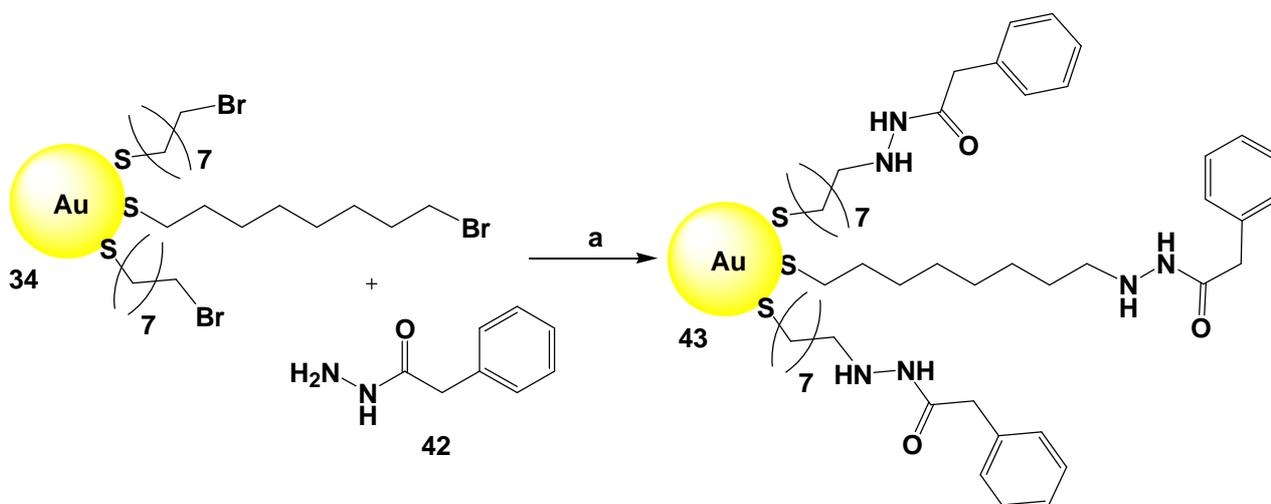


Schema 2.39: a) CHCl_3 , TFA, 0°C , 20 minuti.

Le nanoparticelle **40** sono state dissolte in 3 ml di CHCl_3 , e a tale soluzione è stato aggiunto 1 ml di TFA. Mantenendo la miscela di reazione a 0°C in agitazione, dopo appena 20 minuti c'è stata precipitazione delle AuNPs **41**, insolubili in qualsiasi solvente.

2.4.11 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs tramite TIOLI BROMURATI

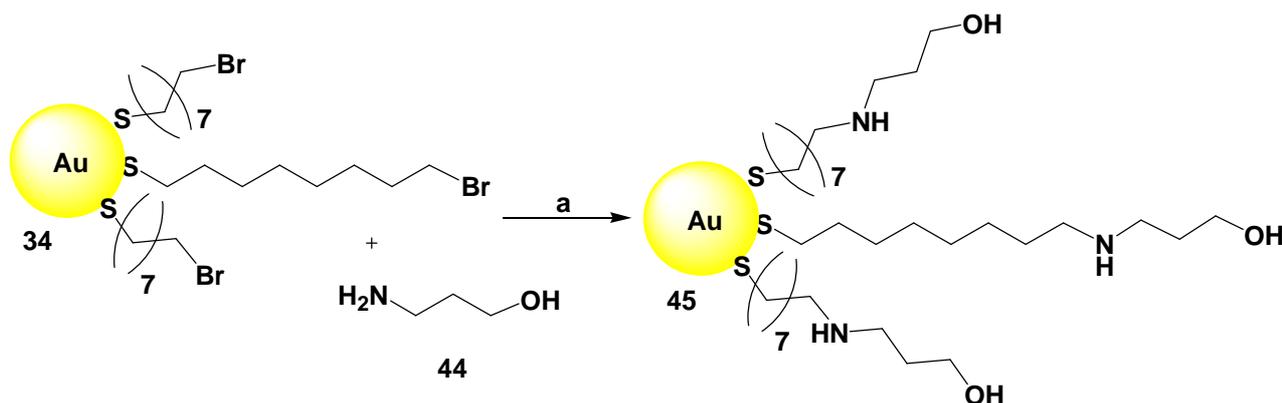
2.4.11.1 - Sintesi di AuNPs 43



Schema 2.40: a) CH_2Cl_2 , 40°C , 1 notte.

Le AuNPs **34** (5.22×10^{-5} moli d'Au, 2.24×10^{-5} moli tiolo, 1 eq) sono state dissolte in CH_2Cl_2 (10 ml), e vi sono stati aggiunti 15 eq di idrazide fenilacetica (composto **42**, 3.4×10^{-4} moli, 51 mg), lasciando la miscela sotto agitazione per una notte a 40°C . Le AuNPs **43** sono state purificate in colonna ad esclusione dimensionale, portate a secco per evaporazione del solvente e sottoposte ad analisi tramite NMR con gradiente di campo.

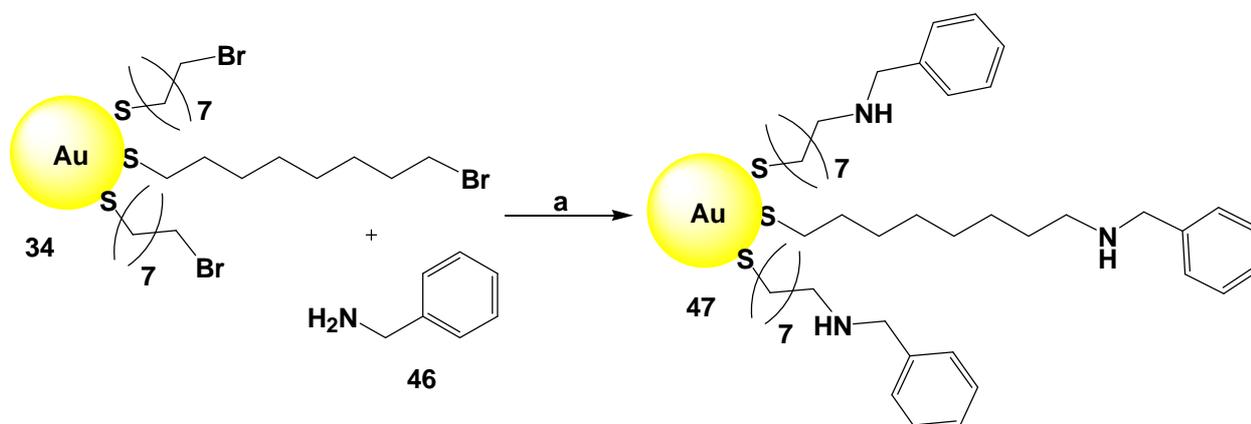
2.4.11.2 - Sintesi di AuNPs 45



Schema 2.41: a) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}$ 1:1, 40°C , 1 notte.

Le AuNPs **34** (5.2×10^{-5} moli d'Au, 2.24×10^{-5} moli tiolo, 1 eq) sono state dissolte in 5 ml di CH_2Cl_2 e 5 ml di acetonitrile, aggiungendovi poi 30 eq di 3-idrossi-propilammina (composto **44**, 6.7×10^{-4} moli, 50 mg), lasciando la miscela sotto agitazione per una notte a 40°C . Al termine della reazione le AuNPs **45** sono risultate precipitate e insolubili.

2.4.11.3 - Sintesi di AuNPs 47



Schema 2.42: a) CH₂Cl₂/ACN 1:1, 40°C, 1 notte.

Le AuNPs 34 (5.2×10^{-5} moli d' Au, 2.24×10^{-5} moli tiolo, 1 eq) sono state dissolte in 5 ml di CH₂Cl₂ e 5 ml di acetonitrile, aggiungendovi poi 30 eq di benzilammina (composto 46, 6.7×10^{-4} moli, 72 mg), lasciando la miscela sotto agitazione per una notte a 40°C. Al termine della reazione le AuNPs 47 sono risultate precipitate e insolubili.

2.4.12 - FUNZIONALIZZAZIONE di AuNPs tramite CARBOSSILI ATTIVATI

2.4.12.1 - Sintesi di AuNPs 48

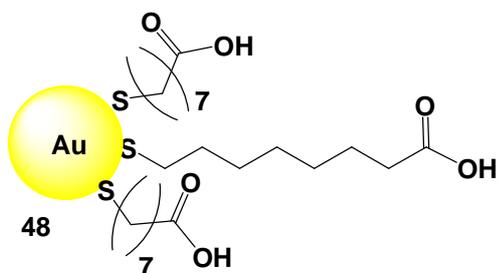


Grafico 2.15

Sono state sintetizzate AuNPs col metodo Brust-Schiffin, con 50 mg di H₂AuCl₄ x 3 H₂O (1.3×10^{-4} moli, 1 eq), 2.5 g di TOABr e 23 mg di NaBH₄, in 50 ml di toluene. Per formare il monostrato, prima dell'agente riducente è stato aggiunto acido 8-mercaptotetanoico (66 µl, 69 mg, 3.9×10^{-4} moli, 3 eq). Le AuNPs 48 così formate sono state lasciate in agitazione per 3 ore in atmosfera di azoto, per poi essere portate a secco per evaporazione de toluene. Sono quindi risultate insolubili in qualsiasi solvente.

2.4.12.2 - Sintesi di AuNPs 49

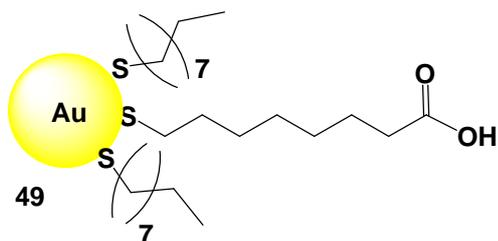


Grafico 2.16

Sono state sintetizzate AuNPs col metodo Brust-Schiffin, con 50 mg di $\text{HAuCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (1.3×10^{-4} moli, 1 eq), 2.5 g di TOABr e 23 mg di NaBH_4 , in 50 ml di toluene. Per formare il monostrato sono stati aggiunti, prima dell'agente riducente, acido 8-mercaptototanoico (40 μl , 42.5 mg, 2.4×10^{-4} moli, 1.85 eq) e ottantiolo (45 mg, 3.1×10^{-4} moli, 2.38 eq). Sono state ottenute le AuNPs 49, lasciate in agitazione in atmosfera di azoto e subito precipitate. Raccolte per centrifugazione, sono risultate insolubili in qualsiasi solvente.

3 - STUDI sulla FUNZIONALIZZAZIONE di NANOPARTICELLE d'ORO tramite INTERAZIONI IONICHE

3.1 - INTRODUZIONE

In questo capitolo si andrà a descrivere un metodo alternativo per la funzionalizzazione di nanoparticelle d'oro: anziché cercare di ottenere AuNPs “universali” tramite la post-funzionalizzazione mediante legami covalenti, si è cercato di farlo mediante legami non covalenti. Questo permetterebbe di sfruttare una chimica più semplice, di certo compatibile con la stabilità delle nanoparticelle. L'uso di legami non covalenti per la formazione di supramolecole assemblate attorno ai nuclei d'oro, poi, renderebbe possibile lo sfruttamento dell'auto-assemblaggio. Il semplice mescolamento dei componenti, nella medesima miscela e nelle opportune proporzioni, porterebbe all'ottenimento spontaneo del sistema multivalente. L'uso di legami di questo tipo, però, diminuisce notevolmente la stabilità termodinamica del sistema, rendendolo conseguentemente inutile in vivo. È stato fatto pertanto un passo indietro, concentrandosi sull'uso in vitro del sistema, dove potrebbe trovare applicazioni diagnostiche interessanti per Xeptagen Spa.

3.2 - RISULTATI e DISCUSSIONE

3.2.1 - AuNPs CATIONICHE LEGATE a PEPTIDI

Il gruppo di Scrimin ha studiato AuNPs ricoperte da tioli terminanti con un gruppo triazaciclononano (TACN). Tali eterocicli, con i loro tre atomi di azoto, sono in grado di complessare cationi di vario tipo, in particolare ioni Zn^{2+} . La complessazione di Zn^{2+} da parte di gruppi TACN incorporati nel monostrato nanoparticellare si traduce in un reciproco posizionamento ravvicinato dei complessi¹⁴². In questo modo essi, con un meccanismo cooperativo, acquisiscono un'elevata attività catalitica nell'idrolisi di HPNPP (p-nitrofenil-2-idrossipropil-fosfato), composto modello per l'RNA. Queste stesse AuNPs, ricoperte da tioli TACN- Zn^{2+} , presentano anche elevata affinità per molecole cariche negativamente. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato come la capacità catalitica di queste nanoparticelle venga inibita con l'aggiunta di molecole anioniche come ATP^{4-} , ADP^{3-} o il peptide Ac-DDD-OH, in grado di legarsi al monostrato cationico. Infatti molecole oligoanioniche sono state utilizzate per la rilevazione e l'amplificazione dell'attività enzimatica¹⁴³ nonché per un'analisi semplice ed economica della morfologia

del monostrato organico autoassemblato su AuNPs¹⁴⁴. Vista la relativa semplicità sintetica e la buona solubilità in acqua, sono quindi state sintetizzate AuNPs ricoperte con un monostrato di tioli terminanti con un gruppo carico positivamente: un gruppo ammonio¹⁴⁵ oppure il triazaciclononano (TACN) complessante Zn²⁺. Si è voluto quindi innanzitutto provare che è possibile assemblare multiple copie di molecole anioniche sulla superficie del monostrato cationico delle nanoparticelle. Il modo col quale lo si è voluto fare è stato tramite l'utilizzo di due diverse molecole, in grado di dare un segnale fluorescente quando legate assieme in stretta vicinanza sulla superficie cationica, tramite FRET (fluorescent resonance Energy transfer).

3.2.1.1 - Sintesi dei tioli cationici

Innanzitutto è stato necessario sintetizzare i tioli con gruppo terminale positivamente caricato. Sono quindi state selezionate due molecole adatte allo scopo: la prima (composto **51**) la cui carica dipendeva dalla presenza di un gruppo ammonico quaternario, la seconda (composto **63**) con, invece, un gruppo TACN (grafico 3.1).

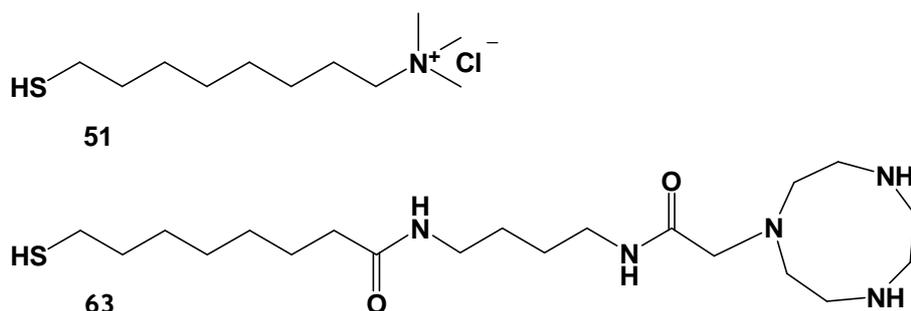
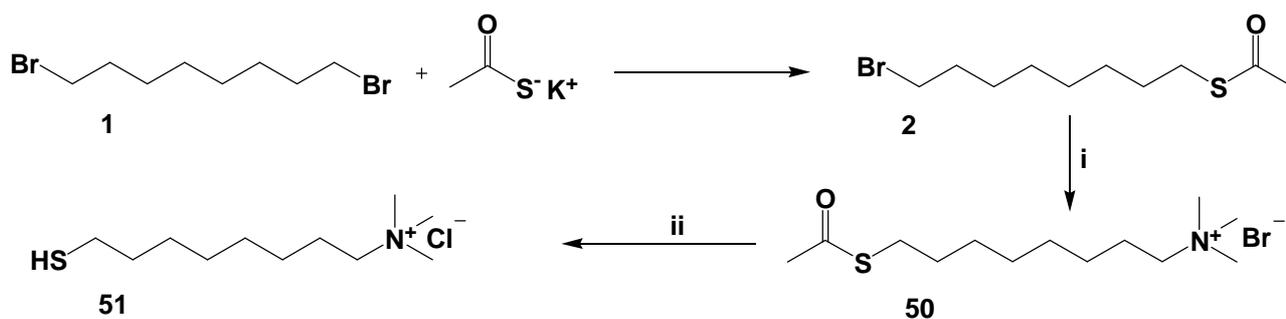


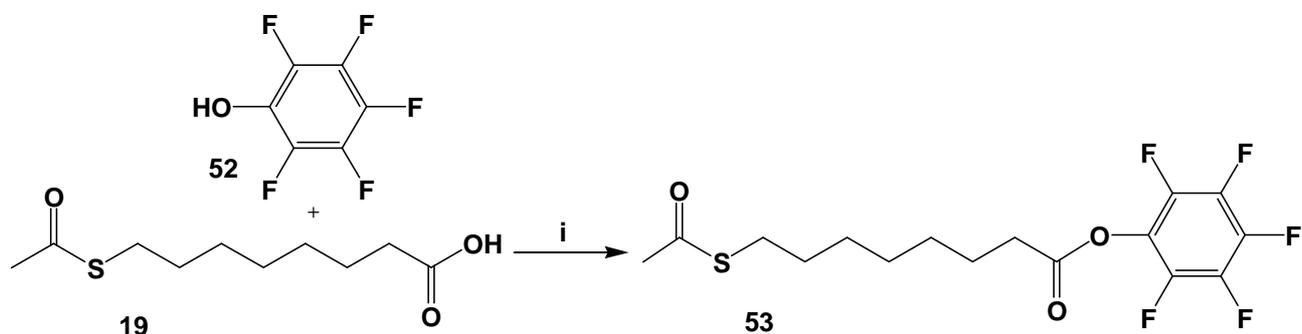
Grafico 3.1

La sintesi del tiolo ammonico (**51**) è stata effettuata acetilando il composto **1** a un'estremità con potassio tioacetato, ed effettuando sostituzione nucleofila con trimetilammina all'altra estremità. In ambiente acido per HCl il tiolo è infine stato deprotetto (schema 3.1).



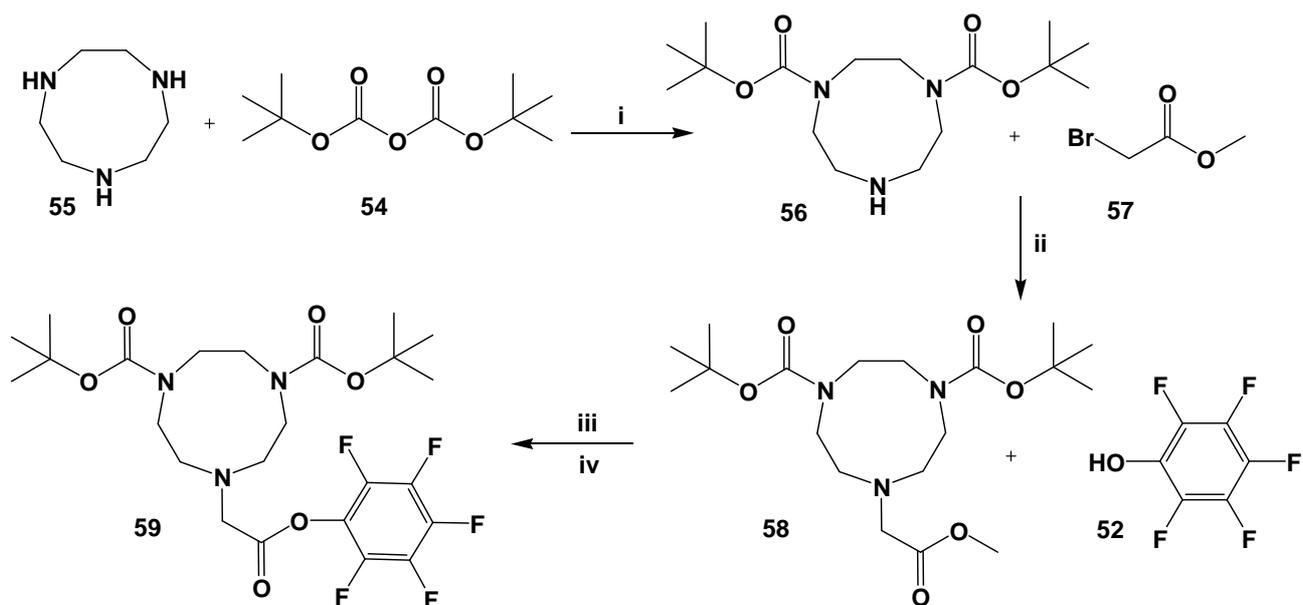
Schema 3.1: sintesi del tiolo ammonico 51. i) TEA; ii) HCl.

L'altro tiolo utilizzato, il composto 63, è stato invece ottenuto tramite sintesi convergente, ossia sintetizzando separatamente i suoi tre frammenti. Si è partiti dall'acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (composto 19), ottenuto dalla tio-acetilazione dell'acido 8-mercaptoottanoico. Dissolto in diclorometano, è stato mantenuto sotto flusso di azoto a 0°C e aggiunto di pentafluorofenolo (composto 52) ed EDC. Quest'ultima ha permesso l'attacco da parte dell'idrossile del fenolo, ottenendo il composto 53, S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil-pentafluorofenilestere (schema 3.2).



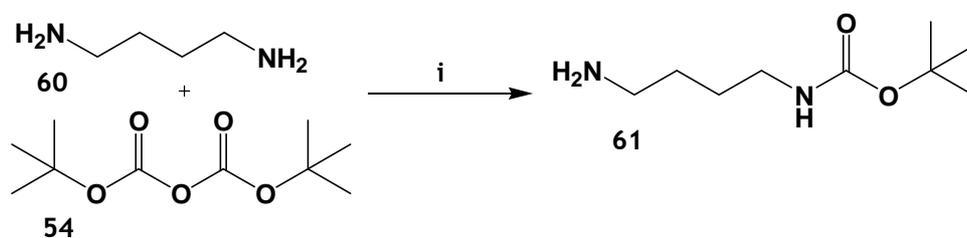
Schema 3.2: sintesi primo frammento del tiolo TACN 63: i) EDC.

Contemporaneamente (schema 3.3), di-terz-butil-dicarbonato (composto 54) è stato fatto reagire con TACN (composto 55) in presenza di DBU, introducendo il gruppo Boc a livello di due delle tre ammine secondarie del TACN. Il composto 56 ottenuto ha dato sostituzione nucleofila sul composto 57, dando il composto 58; l'estere metilico è stato quindi idrolizzato con idrossido di litio ottenendo l'acido carbossilico corrispondente. Con pentafluorofenolo (composto 52) ed EDC, infine, è stato ottenuto l'estere attivato 59.



Schema 3.3: sintesi del secondo frammento del tiolo TACN 63. i) DBU; ii) K_2CO_3 ; iii) LiOH; iv) pentafluorofenolo, EDC.

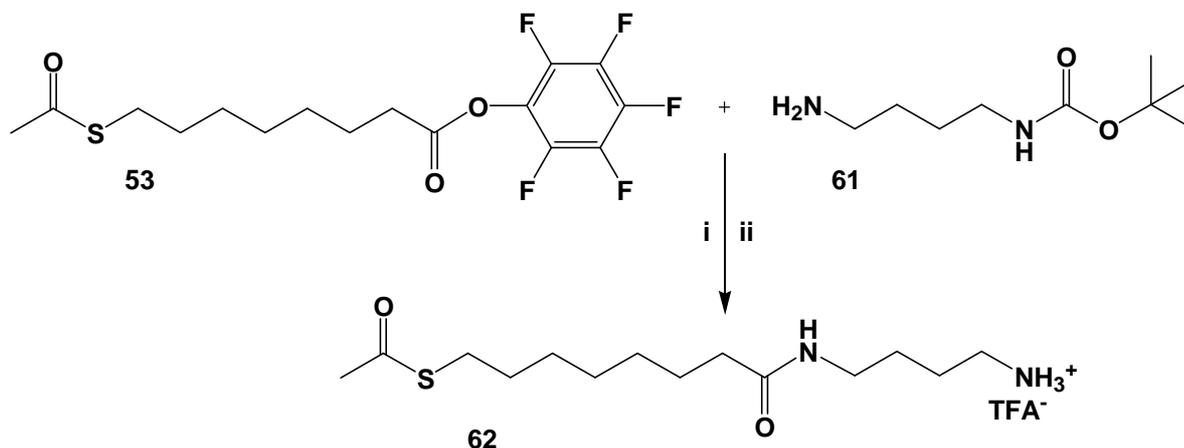
Per la sintesi del terzo frammento (schema 3.4), 1,4-diamminobutano (composto 60) è stato fatto reagire con Boc-anidride (composto 54) in ambiente alcalino, ottenendo N-Boc-diamminobutano, composto 61.



Schema 3.4: sintesi terzo frammento del tiolo TACN 63. i) K_2CO_3 .

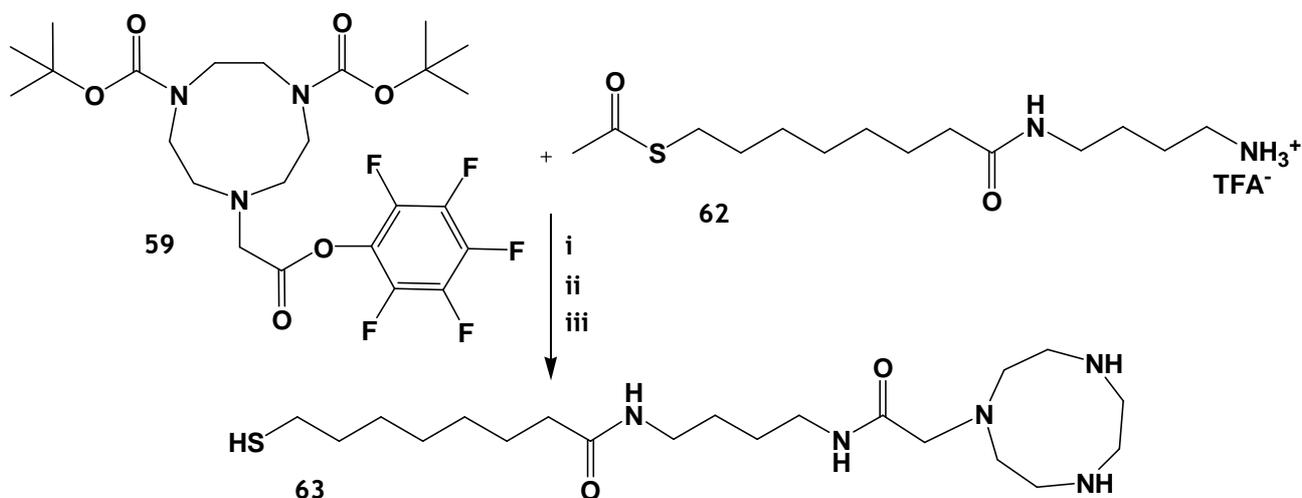
A questo punto il primo e il terzo frammento del composto finale sono stati assemblati (schema 3.5): il composto 61 è stato dissolto in diclorometano anidro e posto a $0^\circ C$ in atmosfera di azoto, e la soluzione così formata è stata alcalinizzata fino a pH 9 per aggiunta di carbonato di potassio. Successivamente, è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione del composto composto 53 in diclorometano, lasciando la miscela ottenuta sotto agitazione per due ore. Il gruppo amminico libero del composto 61 ha effettuato, facilitato dall'ambiente alcalino, un attacco nucleofilo a livello dell'estere attivato, causando l'eliminazione del gruppo uscente pentafluorofenato e la sintesi del composto 62. Dopo eliminazione, per filtrazione, del sale insolubile, il filtrato organico

è stato lavato con bicarbonato di sodio e con sodio cloruro, eliminando così i reagenti in eccesso. L' N-Boc-N'-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-butilendiammina, rimasta nella fase organica, è stata aggiunta quindi di TFA, in modo da causare la rottura del gruppo uretanico con distacco del terz-butil carbonato. È stato così ottenuto l' N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-butilendiammonio trifluoroacetato.



Schema 3.5: unione del primo e del terzo frammento del tiolo TACN 63. i) K_2CO_3 ; ii) TFA.

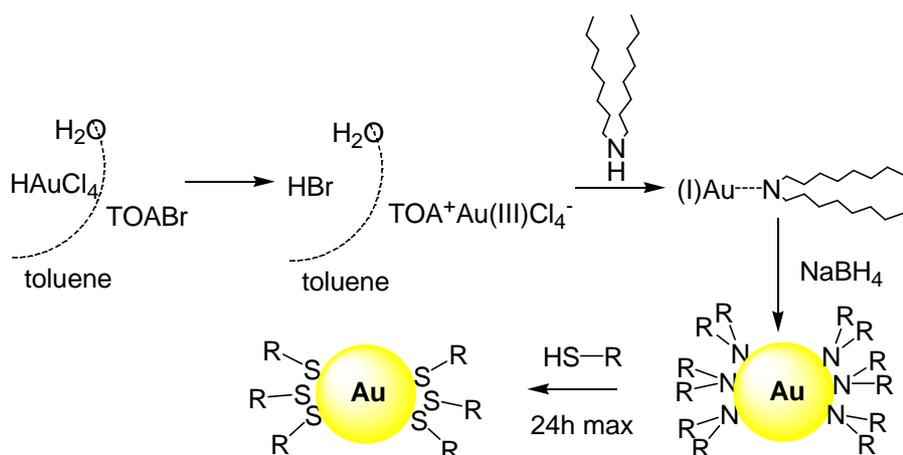
Infine è stato necessario unire, al composto 62, anche l'ultimo frammento sintetizzato (schema 3.6). I composti 62 e 59 sono stati posti a reagire in presenza di DIPEA. I gruppi protettori BOC sono stati quindi rimossi con TFA, l'acetile è stato invece staccato successivamente HCl in etanolo, liberando il tiolo e ottenendo il composto 63.



Schema 3.6: unione del terzo frammento e sintesi finale del tiolo TACN 63. i) DIPEA; ii) TFA; iii) HCl.

3.2.1.2 - Procedimento di sintesi e copertura di AuNPs-TACN e AuNPs-NH₄⁺

Sintetizzati i tioli, è stato necessario produrre i diversi campioni di nanoparticelle da utilizzare negli esperimenti successivi. Per ottenerle, è stato seguito il protocollo messo a punto dal gruppo del Professor Scrimin³¹, ottimo per AuNPs solubili in solvente acquoso. Tale procedimento è stato descritto precedentemente nel capitolo 2, utilizzando per la copertura il tiolo **51** o il tiolo **63** in eccesso 2:1 rispetto all'oro superficiale (formula minima della nanoparticelle Au₂₁₄S₉₂, schema 3.7).



Schema 3.7: sintesi generale di nanoparticelle d'oro col metodo Scrimin.

Per verificare l'effettiva copertura e le dimensioni delle AuNPs, sono state sottoposte ad analisi di spettroscopia NMR, spettrofotometria UV-visibile, TEM e DLS.

L'analisi NMR ha verificato la presenza dei picchi corrispondenti ai protoni dei due tioli nei diversi campioni di nanoparticelle; essi erano allargati, come normalmente ci si aspetta a causa della vicinanza dei nuclei metallici (figura 3.1). Questo ha certificato che tali tioli erano effettivamente legati all'oro, e non liberi in soluzione.

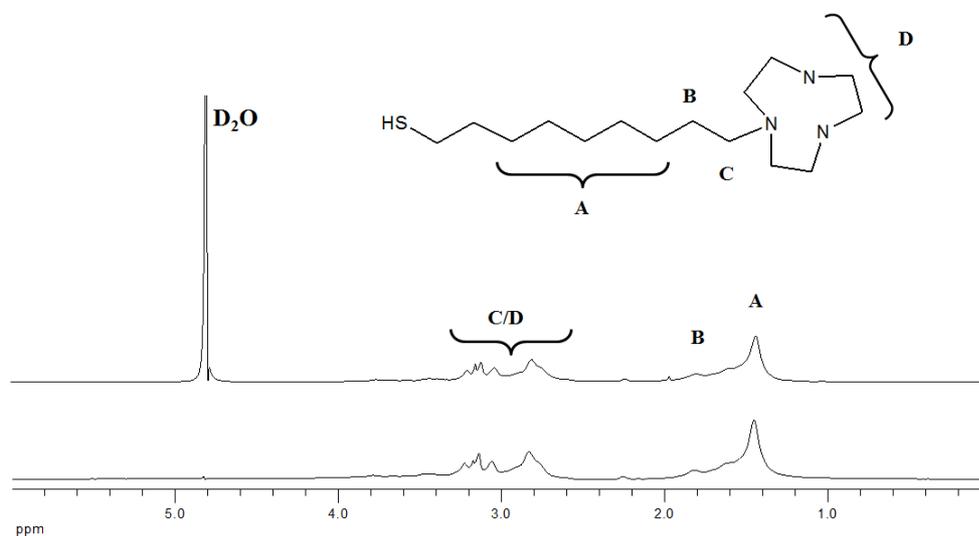
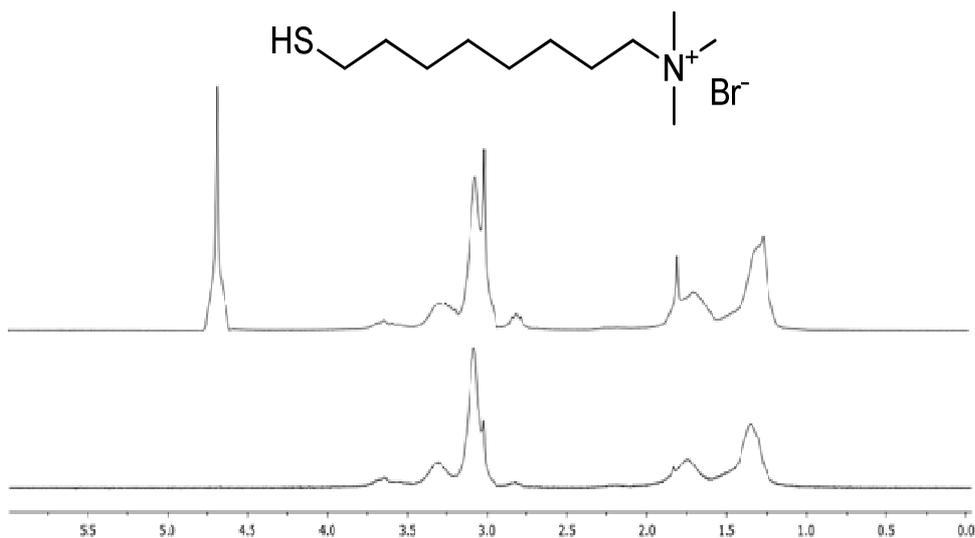
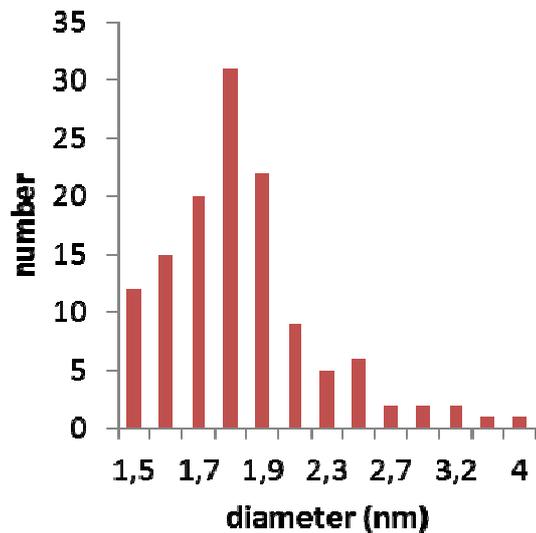
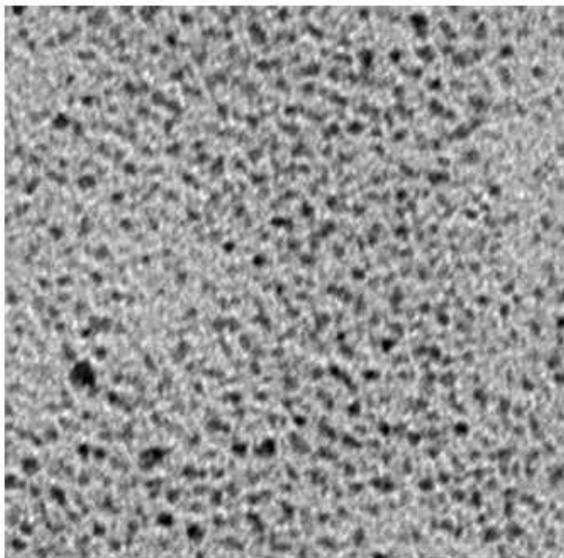
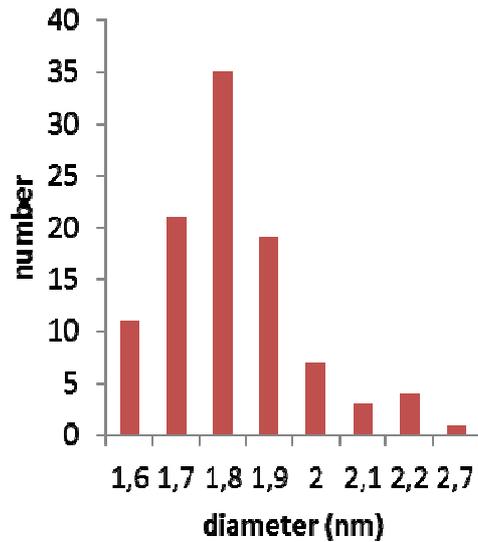
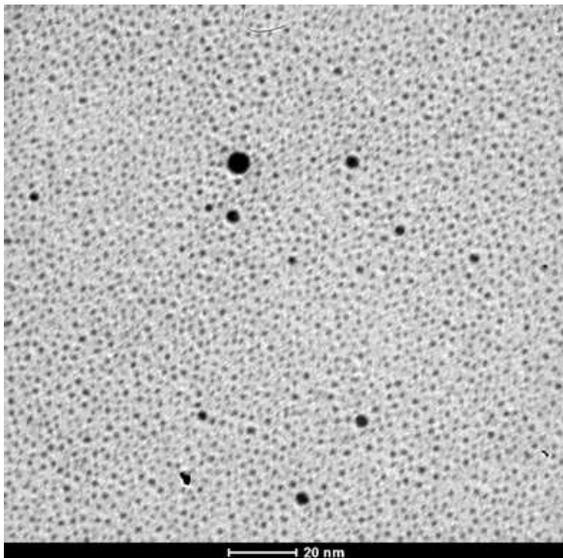


Figura 3.1: spettro NMR di AuNPs ricoperte col tiolo **51** (sopra) e col tiolo **63** (sotto). Si possono notare i picchi protonici allargati dovuti alla vicinanza con l'oro metallico.

Per conoscere precisamente le dimensioni dei nuclei d'oro, sono state effettuate analisi TEM. Con tale tecnica sono state ottenute fotografie dettagliate dei nuclei metallici, potendo quindi misurarne le dimensioni precise. Tali dimensioni si sono distribuite tra valori di diametro compresi tra 1.6 e 2 nm, con un picco massimo a 1.8 nm (figura 3.2).



— 10 nm

Figura 3.2: immagini e spettro TGA di AuNPs ricoperte col tiolo 51 (sopra) e col tiolo 63 (sotto). I valori, espressi in nm, si riferiscono al diametro del nucleo metallico.

Infine, per avere un quadro definitivo delle nanoparticelle ottenute, tramite DLS è stata ricavata la distribuzione dei valori di diametro idrodinamico, con un picco a circa 8 nm (figura 3.3). Tale valore corrisponde al volume idrodinamico totale delle AuNPs ricoperte col monostrato organico, dato quindi sia dal nucleo metallico che dal volume dei tioli che lo avvolgono.

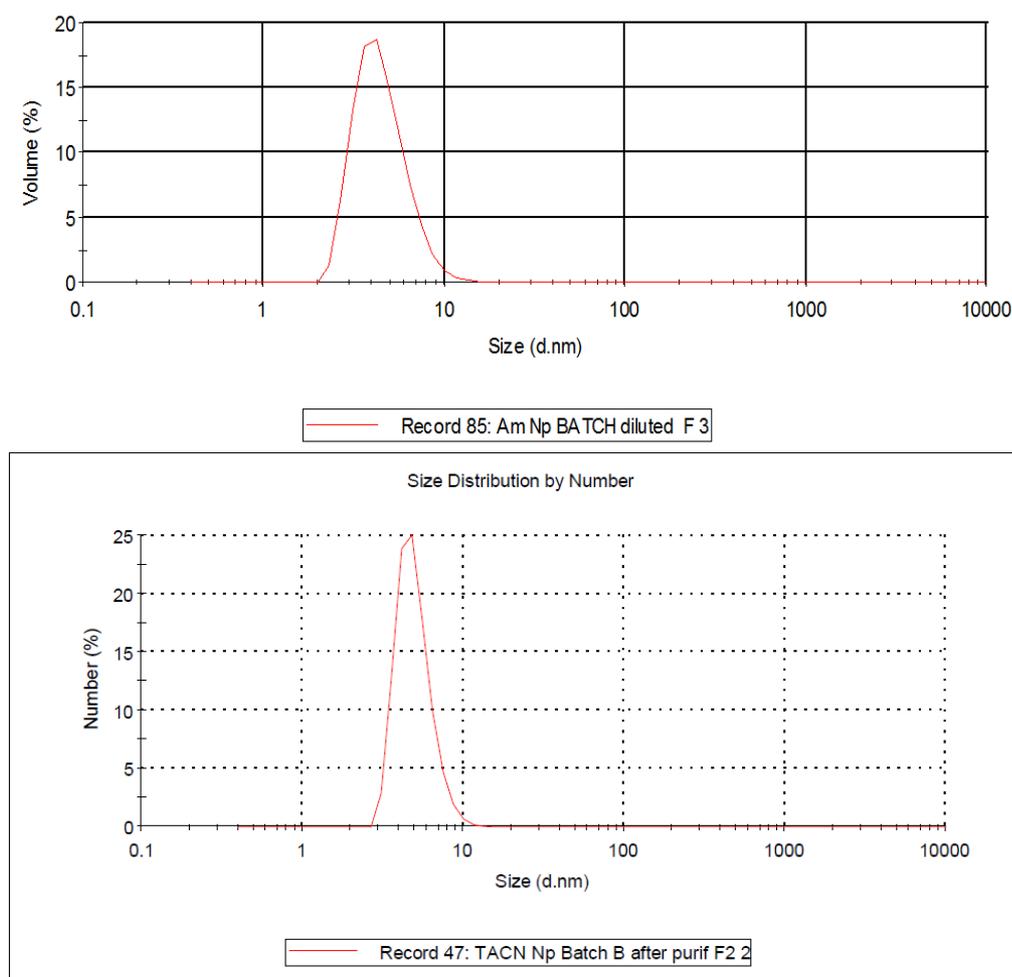


Figura 3.3: spettro DLS di AuNPs ricoperte col tiolo **51** (sopra) e col tiolo **63** (sotto). I valori del idrodinamico, espressi in nm, si riferiscono al diametro idrodinamico totale incluso il monostrato organico.

3.2.1.3 - Sintesi di peptidi oligoanionici fluorescenti

Dopo aver ottenuto le nanoparticelle è stato necessario verificare se e come le interazioni elettrostatiche potessero permettere la loro post-funzionalizzazione stabile. Sono stati quindi sintetizzati oligoanioni con un diverso numero di cariche negative, in modo che ognuno di essi interagisse diversamente col monostrato cationico. In questo modo sarà possibile determinare qual'è la migliore ancora anionica da utilizzare per la funzionalizzazione del monostrato cationico. Come sistema di rivelazione dell'interazione è stata scelta la fluorescenza, sfruttando la proprietà dell'oro metallico di smorzare quella emessa da molecole postegli vicine¹⁴⁷.

Sono quindi stati sintetizzati quattro diversi peptidi oligoanionici, dotati rispettivamente di 2, 3, 4 e 5 cariche negative (**65**, **66**, **67** e **68**), ognuno legato a cumarina 343

($\lambda_{\text{eccitazione}}$ 450 nm, $\lambda_{\text{emissione}}$ 492 nm). Per farlo, è stata sfruttata la sintesi peptidica in fase solida.

Sono stati quindi utilizzati resina Wang e amminoacidi protetti sia alla catena laterale che all'estremità N-terminale, in questo caso tramite gruppo Fmoc. Alla resina è possibile ancorare amminoacidi tramite la loro estremità C-terminale, formando legami esterei stabili. Il primo amminoacido da legare alla resina, un acido aspartico, ha richiesto un trattamento particolare. A causa della difficoltà del legame in fase eterogenea è stata necessaria un'attivazione preventiva dell'amminoacido, usando un notevole eccesso sia suo che dei reagenti di coupling (HOBT, DIC e DIEA, 5 equivalenti rispetto alla capacità di caricamento della resina). La reazione è stata lasciata proseguire per oltre due ore, eliminando poi i reagenti in eccesso e lavando la resina con DMF e diclorometano, per poi ricoprire i siti aspecifici di legame tramite acetilazione. La resina è stata suddivisa in quattro porzioni, in ognuna delle quali si è proseguito con l'accrescimento di un diverso peptide, composto rispettivamente da 1, 2, 3 e 4 acidi aspartici, legati a cumarina 343 tramite una molecola di glicina come spaziatore. Prima di ogni coupling i gruppi amminici terminali sono stati liberati dal gruppo protettore Fmoc con una soluzione composta da piperidina al 20% in DMF. Successivamente, tutti i coupling sono avvenuti ponendo l'amminoacido e i reagenti (HOBT, HBTU e DIEA) in eccesso di 3:1 rispetto al caricamento della resina, per un tempo di circa un'ora. Dopo ogni procedimento la resina veniva lavata con DMF e diclorometano, rimuovendo così ogni reagente in eccesso, e veniva anche sottoposta a Kaiser test, per verificare la presenza o l'assenza dei gruppi amminici liberi.

Infine i peptidi sono stati staccati dalla resina con una soluzione di TFA 95% in acqua. Tale soluzione ha generato un ambiente sufficientemente acido per la rottura dei legami esterei tra peptidi e resina nonché dei gruppi protettori dei carbossili laterali, pur senza rompere l'anello lattonico della cumarina.

Infine i peptidi sono stati fatti precipitare in etere etilico freddo (0°C), per poi purificarli tramite HPLC preparativa. Sono stati così ottenuti (grafico 3.2) i peptidi MonoAsp⁽²⁻⁾-Cum 343 (composto **65**), DiAsp⁽³⁻⁾-Cum 343 (composto **66**), TriAsp⁽⁴⁻⁾-Cum 343 (composto **67**) e TetrAsp⁽⁵⁻⁾-Cum 343 (composto **68**).

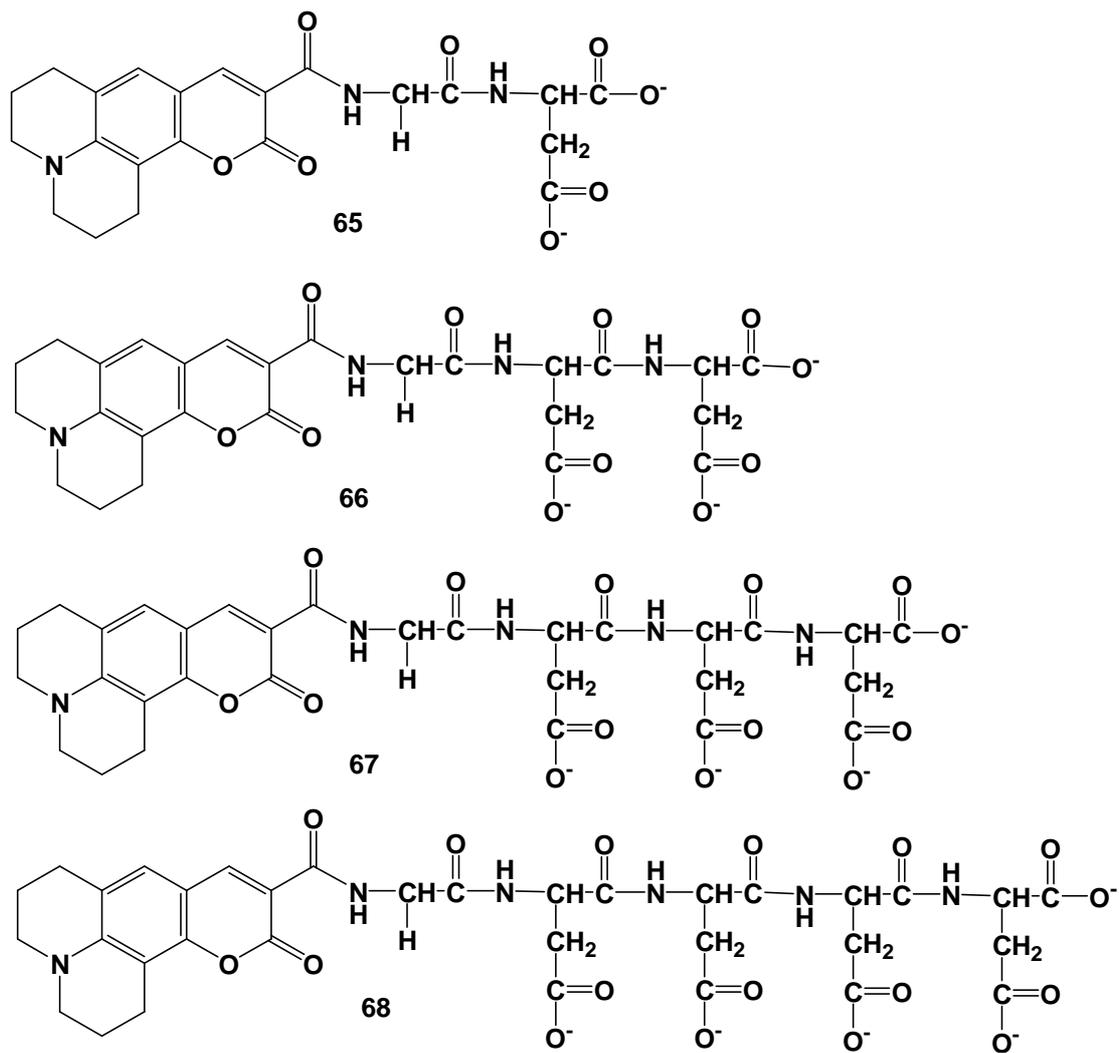
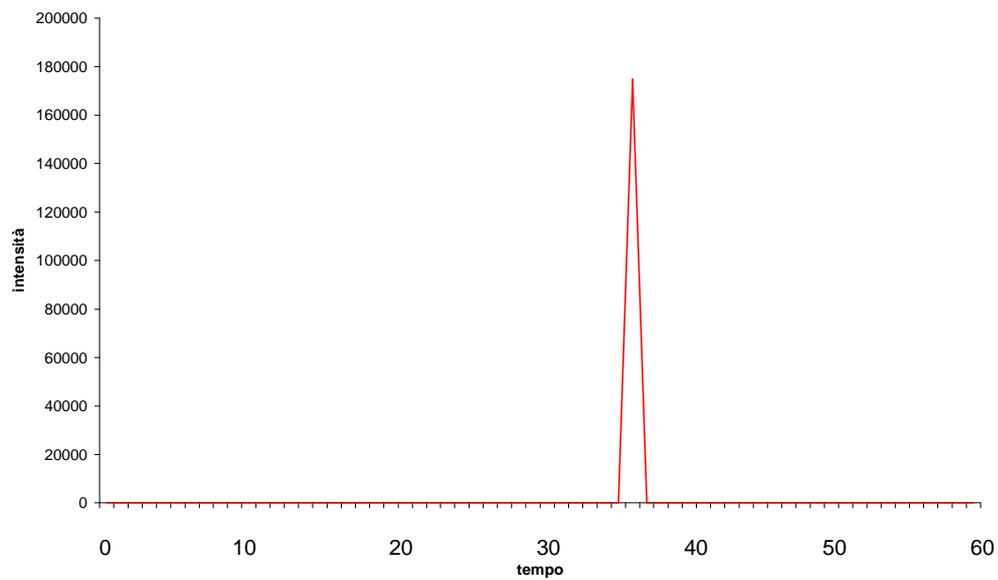
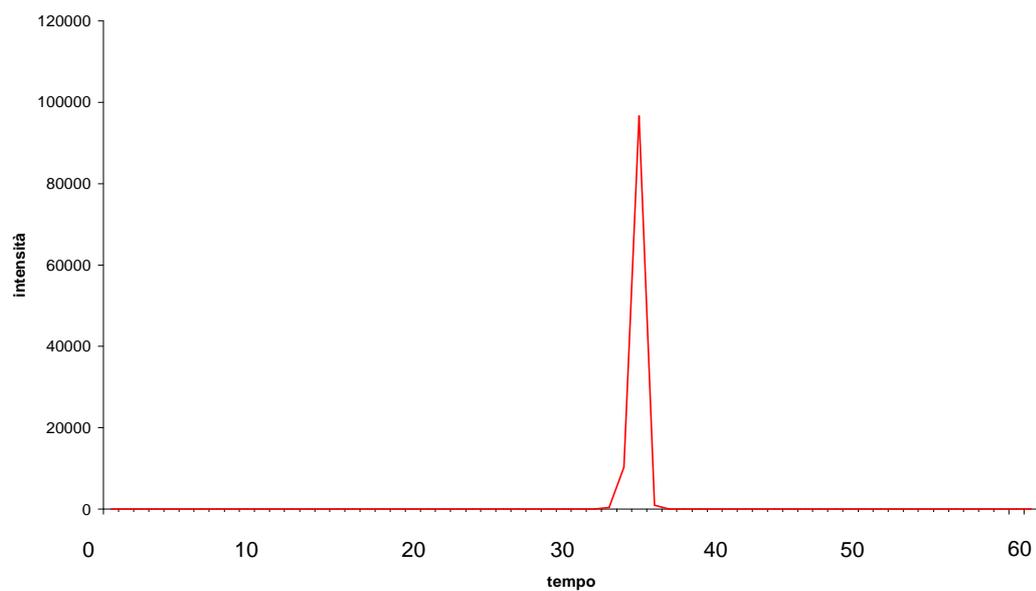


Grafico 3.2

MonoAsp



DiAsp



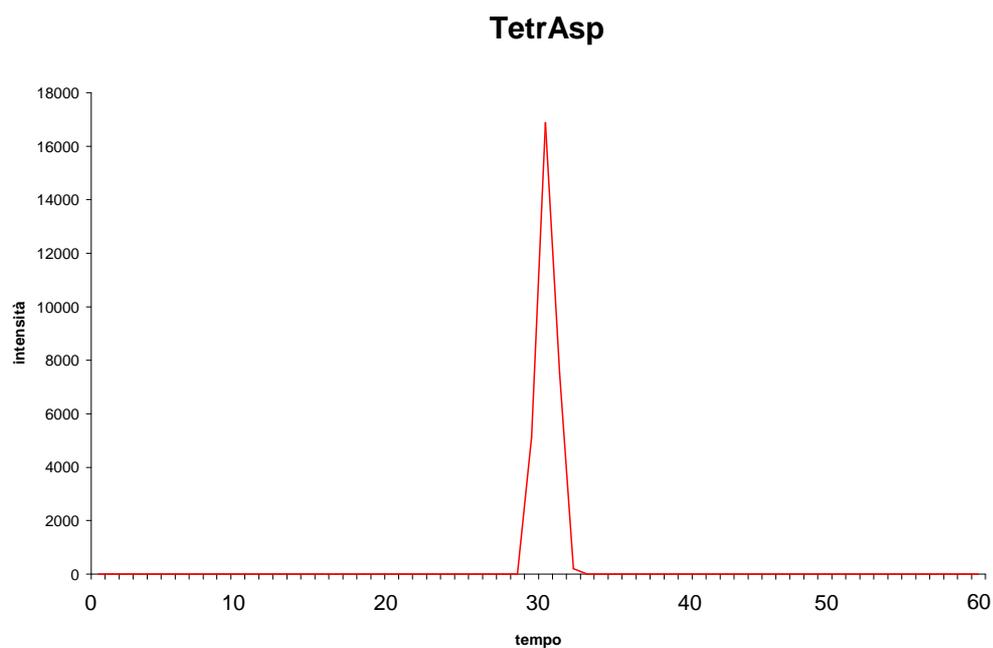
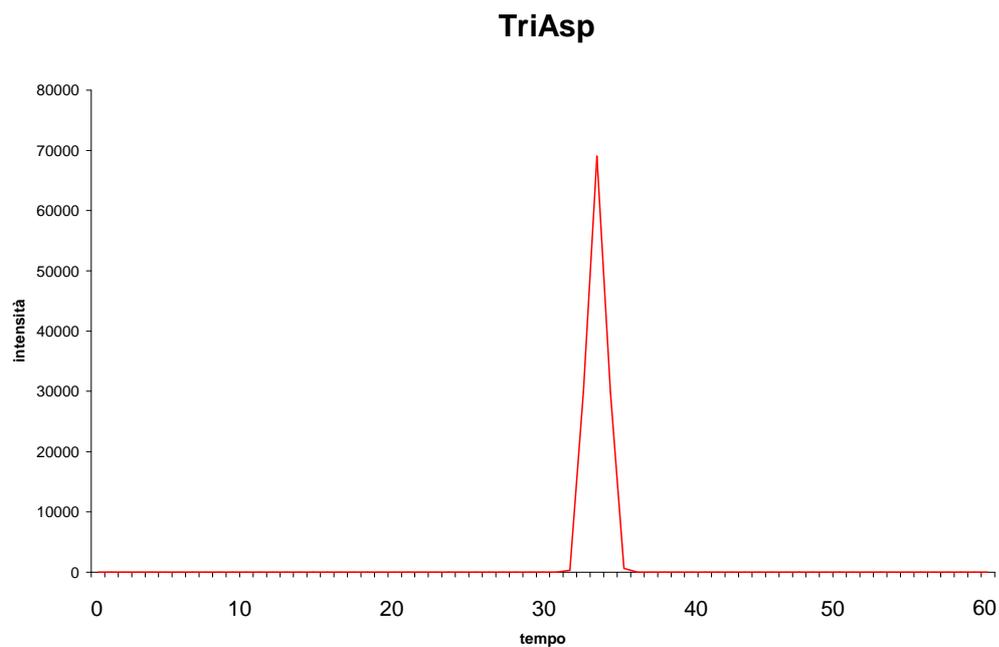


Figura 3.4: cromatogrammi HPLC dei prodotti purificati MonoAsp²⁻-Cum343, DiAsp³⁻-Cum343, TriAsp⁴⁻-Cum343 e TetrAsp⁵⁻-Cum343. Gradiente: ACN+TFA 0.1% dal 10 al 90 % in H₂O+TFA 0.1% in 30 min, lettura in uscita a 443 nm (massimo d'assorbimento della cumarina 343).

3.2.1.4 - Analisi fluorimetriche del legame tra peptidi cationici e fluorescenti

Sintetizzate le nanoparticelle col monostrato cationico e sintetizzati gli oligoanioni fluorescenti, è stato possibile andare a valutare la loro interazione elettrostatica. Sono

pertanto stati effettuati degli studi di fluorescenza, sfruttando la capacità dell'oro metallico di smorzarla quando la sonda emittente gli si trova vicino¹⁴⁷ (figura 3.5).

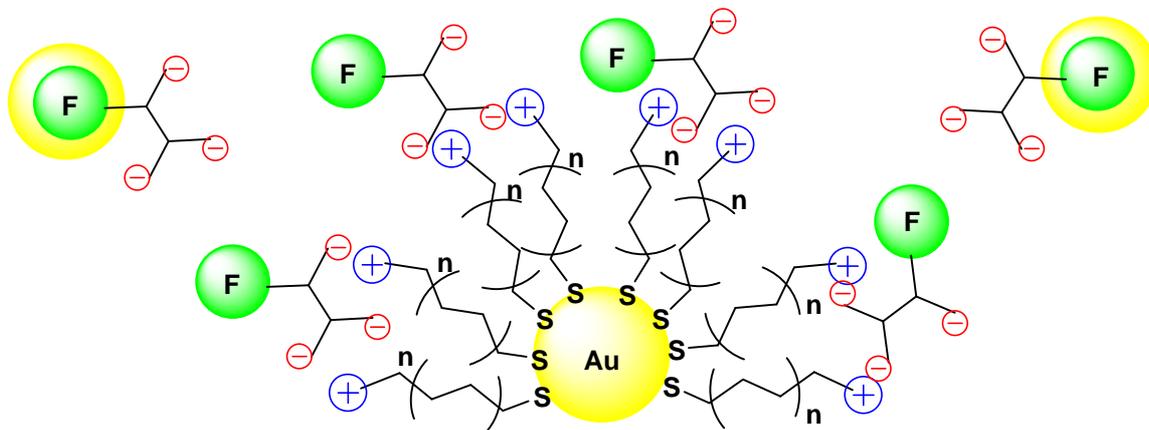
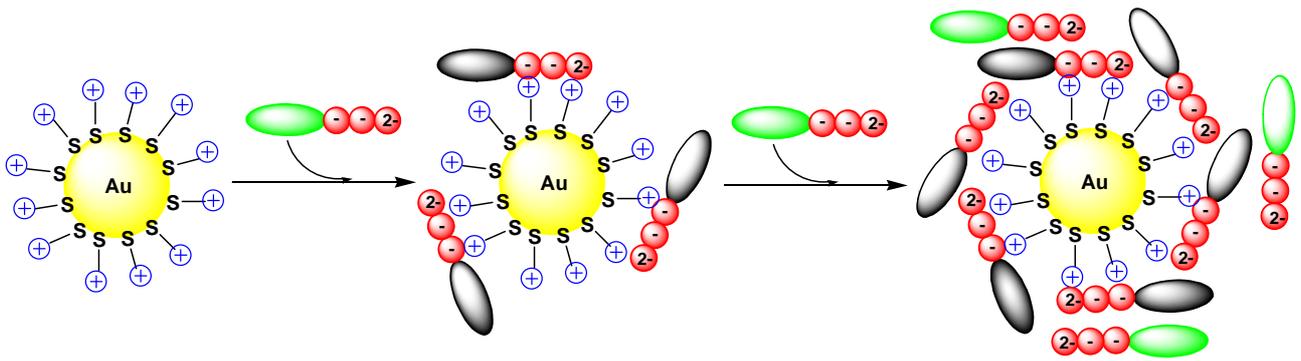


Figura 3.5: smorzamento della fluorescenza operato dalla vicinanza di oligoanioni fluorescenti a AuNPs cationiche. Vicine al nucleo metallico le sonde non emettono, quando sono libere in soluzione vi è emissione di fluorescenza (aura gialla attorno alla sonda F).

Innanzitutto si è voluta ricavare la concentrazione alla quale ognuno dei quattro composti saturava il monostrato organico. Per farlo, campioni di AuNPs-TACN(Zn^{2+}) sono stati titolati tramite aggiunte progressive dei quattro oligoanioni fluorescenti, irradiandoli al fluorimetro con luce eccitante di λ 445 nm, registrando la luce emessa a 492 nm. Come atteso, le molecole si sono legate al monostrato cationico, e la loro fluorescenza è rimasta prossima allo zero (schema 3.8). Dopo aver raggiunto la concentrazione di saturazione, l'oligoanione ulteriormente aggiunto è rimasto in soluzione, ed è quindi stata rilevabile la sua fluorescenza crescente.



Schema 3.8: titolazione di AuNPs cationiche con oligoanioni (Mono-, Di-, Tri- o TetrAsp-Cum343). Aggiungendo in soluzione molecole fluorescenti (sonda verde) esse si legano al monostrato, e la loro fluorescenza viene smorzata (sonda grigia) fino alla saturazione della superficie cationica.

Ogni peptide, avendo un diverso numero di cariche negative, ha interagito in modo differente col monostrato cationico, come osservabile nella figura 3.6.

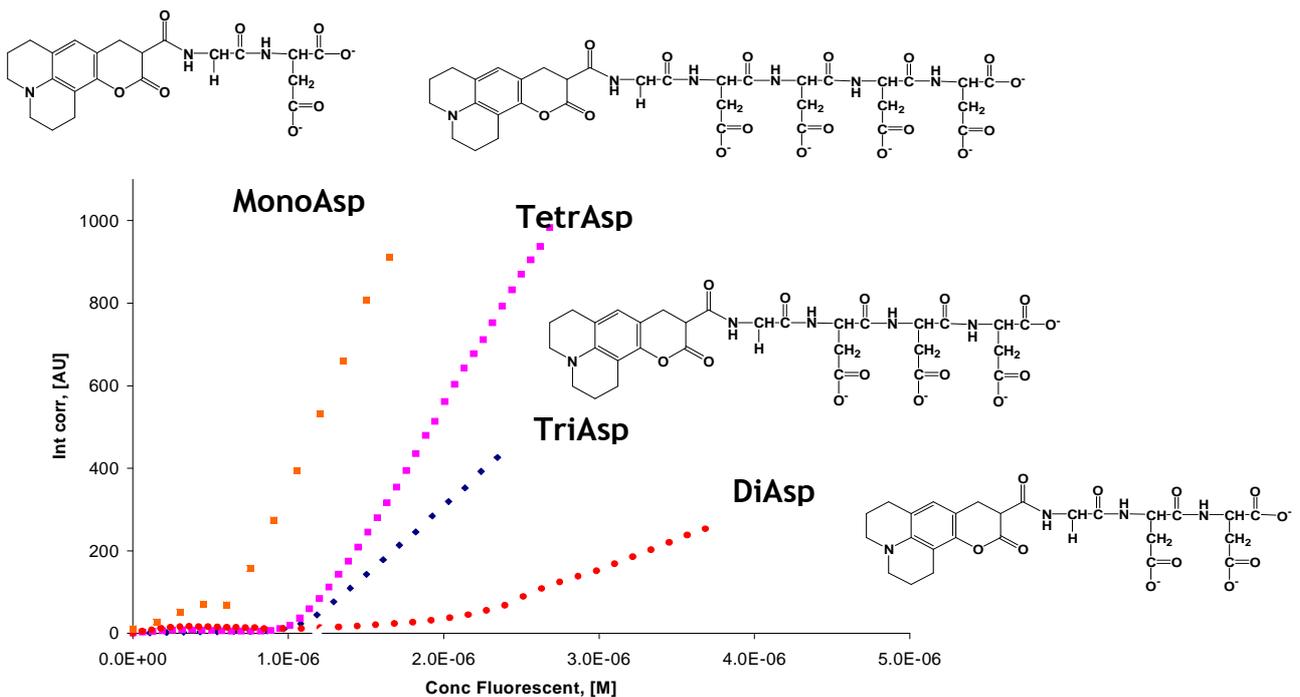


Figura 3.6: titolazione di AuNPs-TACN(Zn^{2+}) [5×10^{-6} M] con MonoAsp-Cum343 (arancione), DiAsp-Cum343 (rosso), TriAsp-Cum343 (blu) e TetrAsp-Cum 343 (viola). Tampone HEPES 25 mM, pH 7.0, $\lambda_{eccitazione}$ 445 nm, $\lambda_{emissione}$ 492 nm, 40 °C.

Gli esperimenti sono stati condotti in tampone HEPES 25 mM, a un pH pari a 7.0 e a 40 °C; la concentrazione del complesso TACN(Zn^{2+}) sulla superficie del monostrato era 5 μ M. In queste condizioni, i diversi peptidi hanno saturato il monostrato cationico con

diversi valori di concentrazione, come indicato in tabella 3.1. Tale concentrazione di saturazione è stata ricavata trovando il punto coincidente delle due rette tangenti alle parti piana e crescente della curva di titolazione.

Oligoanione	Concentrazione di saturazione
MonoAsp ²⁻ -Cum343	-
DiAsp ³⁻ -Cum343	2.0 x 10 ⁻⁶ M
TriAsp ⁴⁻ -Cum343	1.0 x 10 ⁻⁶ M
TetrAsp ⁵⁻ -Cum343	1.0 x 10 ⁻⁶ M

Tabella 3.1: concentrazione di saturazione di AuNPs-TACN(Zn²⁺) [5.0 x 10⁻⁶ M] con i diversi oligoanioni fluorescenti.

I valori così ottenuti possono essere solo parzialmente ricondotti al numero di cariche di ciascun oligoanione, come osservabile in figura 3.7.

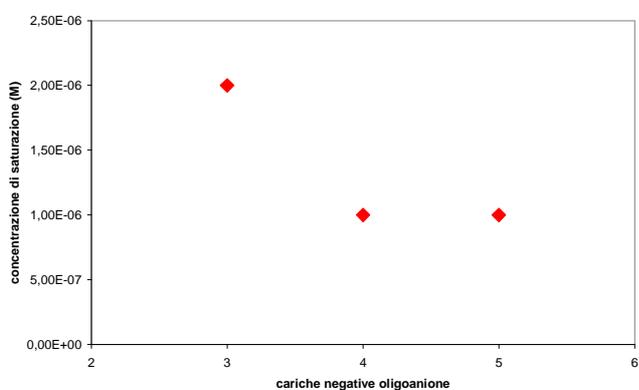
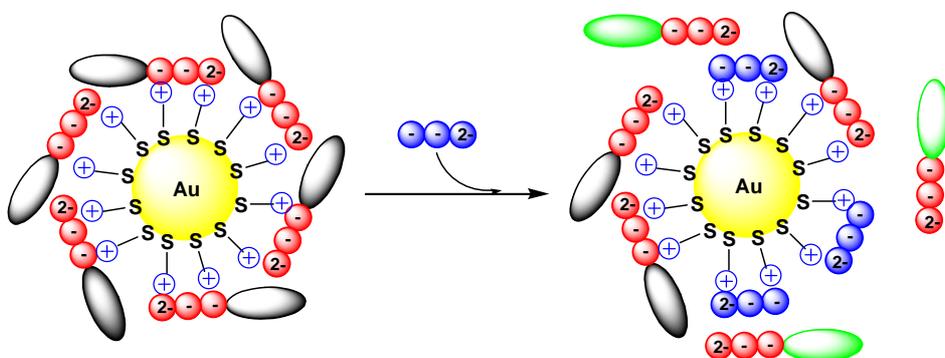


Figura 3.7: relazione tra numero di cariche di ogni oligoanione e la rispettiva concentrazione di saturazione del monostrato nanoparticellare.

Come subito salta all'occhio, per tutti gli oligoanioni è stato osservato un forte legame con il monostrato cationico, ad eccezione del MonoAsp-Cum343. Esso ha avuto un comportamento diverso rispetto agli altri oligoanioni, probabilmente a causa di un insufficiente numero di cariche negative. TriAsp-Cum343 e TetrAsp-Cum343 hanno saturato il monostrato alla medesima concentrazione, probabilmente perché la

differenza in dimensioni e in cariche negative tra i due composti non è stata determinante. Il DiAsp-Cum343, invece, ha saturato il monostrato a una concentrazione doppia rispetto alle due molecole più grandi; il minor numero di cariche (e le sue minori dimensioni) ha fatto in modo che fosse richiesta una concentrazione più alta di oligoanione per occupare tutte le cariche positive disponibili sulla superficie nanoparticellare.

La concentrazione delle nanoparticelle usate non è stata espressa in funzione dei nuclei metallici, bensì in funzione dei gruppi funzionali esposti sulla loro superficie. Sulla base di tali valori, è stato visto che ogni molecola di TriAsp-Cum343 e di TetrAsp-Cum343 ha legato cinque gruppi TACN(Zn^{2+}), mentre per DiAsp-Cum343 è stata osservata una stechiometria di legame di 2:5.



Schema 3.9: l'aggiunta di ATP (pallini blu) ad AuNPs-TACN(Zn^{2+}) [5.0×10^{-6} M] sature di peptide TriAsp-Cum343 (pallini rossi) causa spiazzamento di quest'ultimo, mandandolo in soluzione con "riattivazione" della sonda fluorescente (da grigia a verde).

Per approfondire lo studio dell'interazione elettrostatica a livello del monostrato nanoparticellare sono stati effettuati nuovi esperimenti, usando la sonda TriAsp⁴⁻-Cum343. Essi sono consistiti in prove di contro-titolazione (schema 3.9): AuNPs-TACN(Zn^{2+}), poste nelle medesime condizioni sperimentali (tampone HEPES 25 mM a pH 7.0, 40 °C), sono state saturate con TriAsp-Cum343 (1.0×10^{-6} M). Ad esse sono state fatte aggiunte consecutive di ATP, andando a registrare dopo ognuna di esse lo sviluppo di fluorescenza.

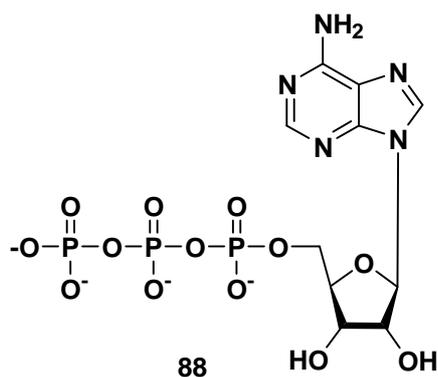


Grafico 3.3

L'ATP è una molecola dotata di quattro cariche negative (grafico 3.3), al pari del triaspartico, ma da studi precedenti¹² è stato visto che i gruppi fosfato possiedono un'affinità per il monostrato cationico superiore rispetto agli acidi carbossilici. Ovviamente, quando la totalità del peptide è stata spiazzata dalla superficie nanoparticellare, la fluorescenza raggiunge il suo massimo (figura 3.8).

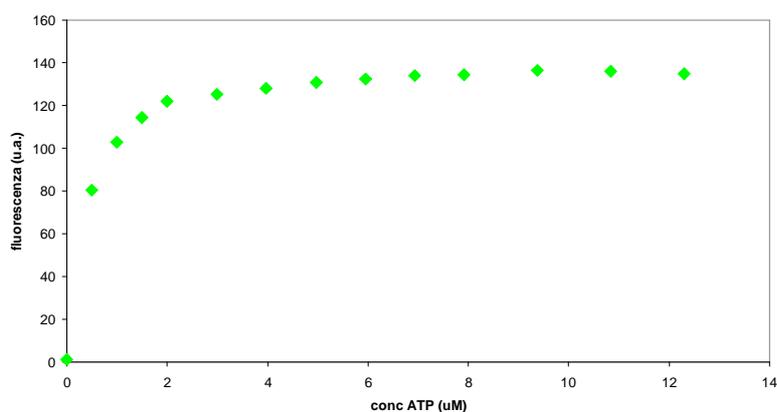


Figura 3.8: titolazione di AuNPs-TACN(Zn^{2+}) 5.0×10^{-6} M sature di peptide TriAsp-Cum343 (1.0×10^{-6} M) con ATP. Tampone HEPES 25 mM pH 7.0, $\lambda_{eccitazione}$ 445 nm, $\lambda_{emissione}$ 492 nm, $37^\circ C$.

È stata necessaria una concentrazione di ATP pari a 5.8×10^{-7} M per spiazzare la metà del TriAsp-Cum343 legato al monostrato cationico (5.0×10^{-7} M). L'ATP ha quindi mostrato un'affinità simile a quella dei carbossilati nel legame coi cationi sulla superficie delle nanoparticelle. È stato inoltre verificato come sia effettivamente il legame tra i peptidi e le nanoparticelle, tramite i tioli cationici del monostrato, a determinare lo smorzamento della fluorescenza.

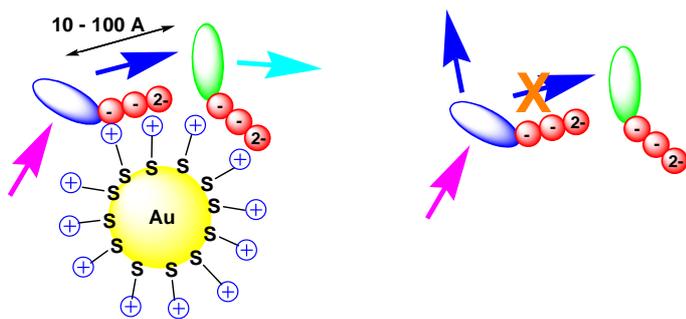
L'uso della fluorescenza come metodo di rivelazione per studiare l'interazione nanoparticelle-peptidi si è rivelato essere estremamente valido, ed è quindi stato utilizzato per gli esperimenti successivi.

3.2.2 - ANALISI di AuNPs tramite FRET

Le prime prove fin qui effettuate sono servite nella comparazione tra le effettive capacità interattive di diversi oligoanioni col monostrato cationico nanoparticellare, ma si trattava di studi preliminari. Lo scopo di questo lavoro era infatti quello di fornire prove che fosse possibile assemblare effettivamente unità multiple su AuNPs: per farlo è stato necessario procedere con studi di approfondimento sul comportamento degli oligoanioni sulla superficie delle AuNPs. È stata quindi verificata la prospettiva di creare una superficie eterofunzionalizzata utilizzando diverse sonde. Tali studi hanno permesso di verificare come le molecole si dispongano sulla superficie nanoparticellare: la loro capacità di interagire con unità multiple sarebbe avvalorata nel caso in cui due differenti peptidi fossero in grado di comunicare tra loro in presenza di NPs, e non lo fossero invece in assenza di NPs.

3.2.2.1 - Il fenomeno FRET e la scelta dei peptidi fluorescenti

Per studiare il comportamento degli oligoanioni sulla superficie delle nanoparticelle, è stato deciso di sfruttare il fenomeno FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), sfruttando la capacità di due diversi fluorofori di comunicare tra loro. Le molecole fluorescenti utilizzate devono essere in grado di emettere a lunghezze d'onda diverse, e che la lunghezza d'onda di emissione di uno dei due, chiamato "donatore", deve coincidere con la lunghezza d'onda di eccitazione dell'altro, chiamato "ricevente". Le due molecole, per poter comunicare tra loro, devono trovarsi a una distanza adeguata, tra i 10 e i 100 Å circa. Risultato finale è che, qualora le due molecole si trovino sufficientemente vicine, irradiando alla lunghezza d'onda della donatrice si registra la sola emissione della ricevente (schema 3.10).



Schema 3.10: manifestazione del fenomeno FRET in presenza di NPs, assenza con i fluorofori liberi in soluzione.

Sono dunque state selezionate le due sonde fluorescenti da utilizzare: cumarina 2 e cumarina 343 (grafico 3.4 a e b rispettivamente).

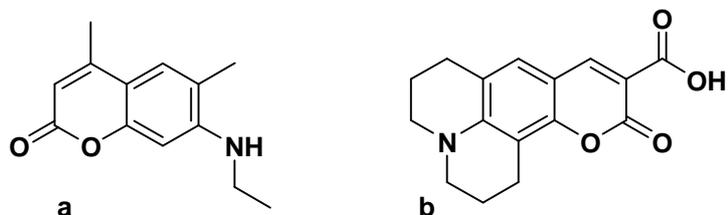


Grafico 3.4

La cumarina 2 (4,6-dimetil-7-etilammino cumarina) presenta un massimo di assorbimento a 350 nm, emettendo a 450 nm; la cumarina 343, invece, ha il suo massimo di assorbimento a 443 nm, emettendo a 492 nm. Sono quindi due molecole che formano un'ottima coppia FRET (figura 3.9).

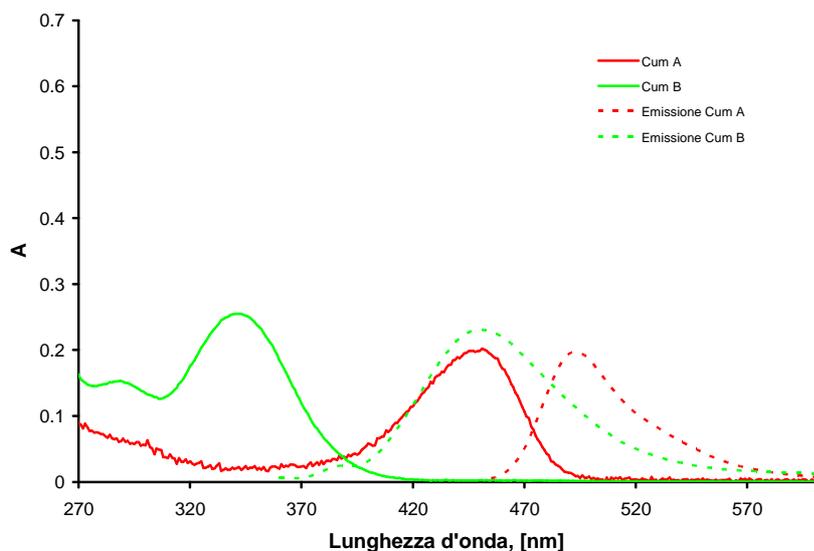


Figura 3.9: spettro di assorbimento e di emissione della cumarina 343 (rossa, $\lambda_{ecc} = 443$ nm, $\lambda_{emis} = 493$ nm) e quelli della cumarina 2 (verde, $\lambda_{ecc} = 340$ nm, $\lambda_{emis} = 450$ nm).

Per utilizzare tali molecole è stato ovviamente necessario dotarle di un'ancora anionica, in modo che potessero interagire con le nanoparticelle cationiche, e la scelta è ricaduta sulla catena di triaspartico-glicina. L'oligopeptide TriAsp-Cum343 era già disponibile (composto **67**, grafico 3.5), quindi è stato necessario procedere con la sintesi della sola TriAsp-Cum2 (composto **76**, grafico 3.5). Per la sintesi di **67** si era proceduto legando all'N-terminale della glicina la cumarina 343 tramite la sua estremità carbossilica, trattandola alla stregua di un qualsiasi amminoacido. La cumarina 2, però, non presentava un gruppo carbossilico utile a questo scopo, pertanto è stato necessario inserirvelo.

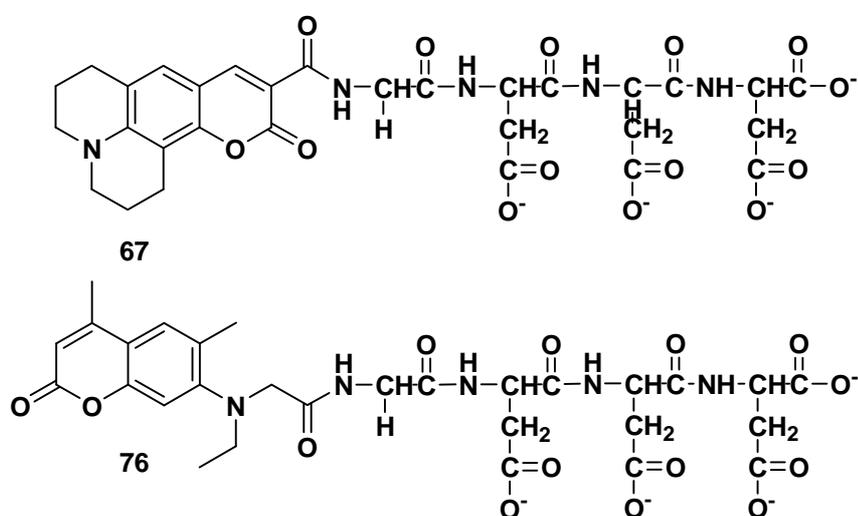
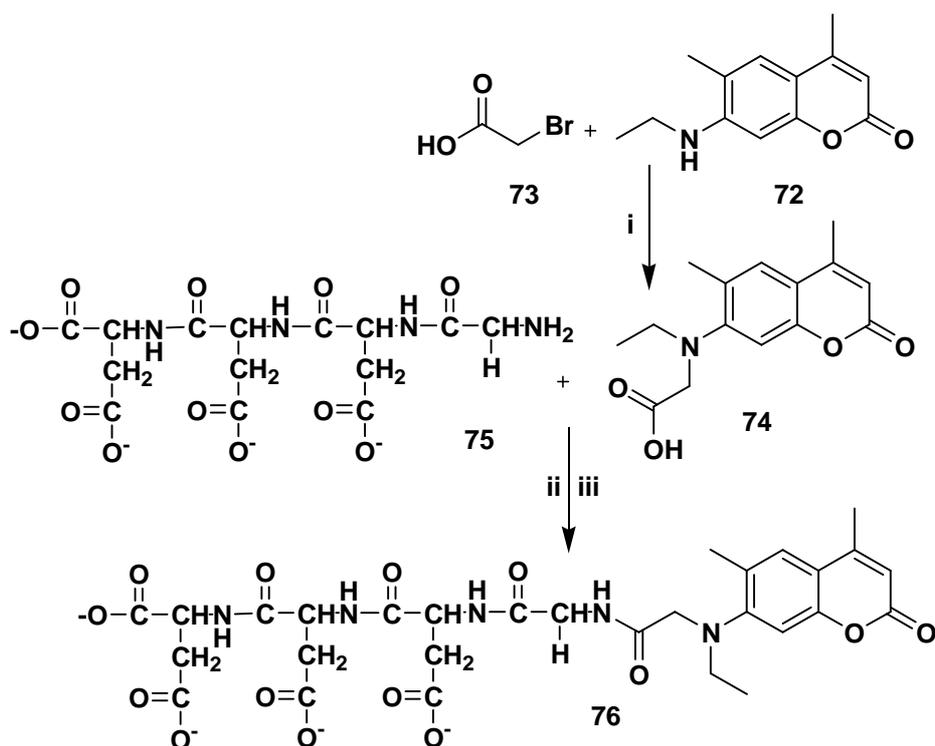


Grafico 3.5

Per farlo cumarina 2 è stata fatta reagire con acido bromo acetico in ambiente alcalino, in modo che l'ammina secondaria aromatica potesse attuare sostituzione nucleofila sul bromo. Tale reazione ha richiesto alta temperatura (85 °C) e molto tempo (cinque giorni) per essere portata a compimento con resa sufficientemente alta, a causa della bassa reattività dell'ammina aromatica. Attaccato quindi alla cumarina un gruppo carbossilico, l'acido (4,6-dimetil-7-etilammino-cumaril) etanoico ottenuto è stato legato tramite sintesi peptidica in fase solida alla catena triaspartico-glicina, ottenendo l'oligoanione **76** (schema 3.11), staccato con TFA 95% e purificato in HPLC.



Schema 3.11: sintesi di TriAsp-Cum2. i) K_2CO_3 ; ii) HOBt, HBTU, DIEA; iii) TFA 95%.

3.2.2.2 - Comportamento dei peptidi fluorescenti in soluzione e su AuNPs cationiche

Una volta preparati, i peptidi fluorescenti sono stati utilizzati, come prima cosa, per determinare la concentrazione di saturazione.

Sono quindi state titolate AuNPs-TACN(Zn^{2+}) 1.0×10^{-5} M, con i due oligoanioni **67** e **76**. Dopo ogni singola aggiunta le soluzioni venivano poste al fluorimetro, irradiandole rispettivamente con luce di λ 445 e 353 nm, registrando poi l'emissione a 492 e 450 nm. L'andamento della fluorescenza rispetto alla concentrazione di peptidi aggiunti è mostrato in figura 3.10.

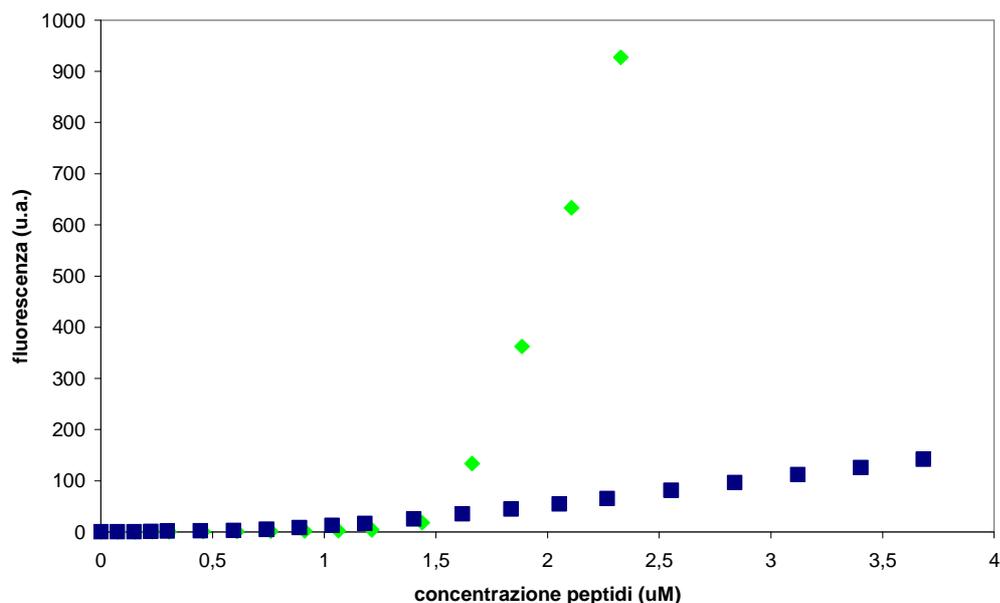


Figura 3.10: titolazione di AuNPs-TACN(Zn^{2+}) 1×10^{-5} M con TriAsp-Cum 2 (quadrati blu) e con TriAsp-Cum 343 (rombi verdi); HEPES 25 mM, pH 7,0. Concentrazione di saturazione 1.1×10^{-6} M (TriAsp-Cum 2) e 1.6×10^{-6} M (TriAsp-Cum 343), $37^\circ C$.

Per estrapolazione sono state ottenute le concentrazioni di saturazione del monostrato: esse corrispondono al punto di intersezione delle due rette tangenti alle zone piatta e crescente di ogni curva. Tale concentrazione di saturazione era pari a 1.1×10^{-6} M per TriAsp-Cum2 e a 1.6×10^{-6} M per TriAsp-Cum343. Tale fattore ha quindi mostrato come TriAsp-Cum343, pur avendo la medesima ancora anionica di TriAsp-Cum2, legghi più strettamente il monostrato cationico.

Lo stesso esperimento è stato attuato su nanoparticelle ricoperte con un monostrato di tioli ammoniaci, le AuNPs- NH_4^+ (figura 3.11).

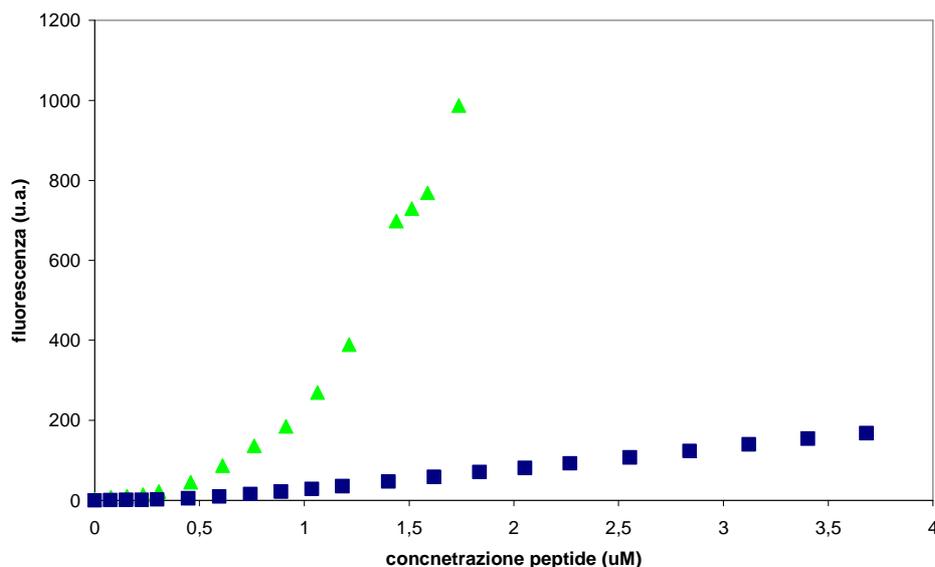


Figura 3.11: titolazione di AuNPs-NH₄⁺ 1 x 10⁻⁵ M con TriAsp-Cum 2 (blu, a sinistra) e con TriAsp-Cum 343 (verde, a destra); HEPES 25 mM, pH 7,0. Concentrazione di saturazione 5.7 x 10⁻⁷ M (TriAsp-Cum 2) e 6.5 x 10⁻⁷ M (TriAsp-Cum 343), 37 °C.

Le concentrazioni di saturazione, calcolate allo stesso metodo usato precedentemente, sono risultate essere pari a 5.7 x 10⁻⁷ M per il TriAsp-Cum2 e a 6.5 x 10⁻⁷ M per il TriAsp-Cum343. Più in generale, però, si è potuto notare come la concentrazione di saturazione delle AuNPs-NH₄⁺ fosse molto inferiore rispetto a quella osservata per le nanoparticelle coperte con il TACN·Zn(II); questo è stato attribuito alla minor carica positiva presente nelle nanoparticelle di questo tipo.

Per poter verificare la presenza del fenomeno FRET era necessario confrontare il comportamento delle molecole fluorescenti libere in soluzione con le medesime legate al monostrato cationico. Questo è stato fatto, misurando la fluorescenza degli oligoanioni **67** e **76** in entrambe le condizioni sia da soli che miscelati in rapporto 1:1.

Le quantità utilizzate in ognuna delle misurazioni è stata pari al 90% della concentrazione di saturazione calcolata. In questo modo si era sicuri, in presenza di AuNPs, che tutti i peptidi vi fossero legati, eliminando la frazione di molecole libere in soluzione. Dovendo usare **67** e **76** assieme, poi, è stato deciso di uniformare le concentrazioni di saturazione per i diversi peptidi, 1.0 x 10⁻⁶ M per le AuNPs-TACN(Zn²⁺) e 5.0 x 10⁻⁷ M per le AuNPs-NH₄⁺. Inoltre è stato necessario aprire al massimo le finestre strumentali. Per ogni soluzione è stato registrato lo spettro di emissione, eccitandole a 353 nm. Come mostrato in figura 3.12 (A), nelle soluzioni contenenti il solo TriAsp-Cum2 (verde) o il solo TriAsp-Cum343 (rosso) a tale eccitazione è corrisposta la semplice

emissione rispettivamente a 450 nm e 492 nm; nel secondo caso (figura 3.12 B) l'intensità si è rivelata essere inferiore, poiché la lunghezza d'onda di eccitazione a 353 nm non corrisponde al massimo di assorbimento della cumarina 343. Irradiando la soluzione contenente entrambe le molecole mescolate si è ottenuta un'emissione corrispondente alla somma dei due spettri dei singoli peptidi.

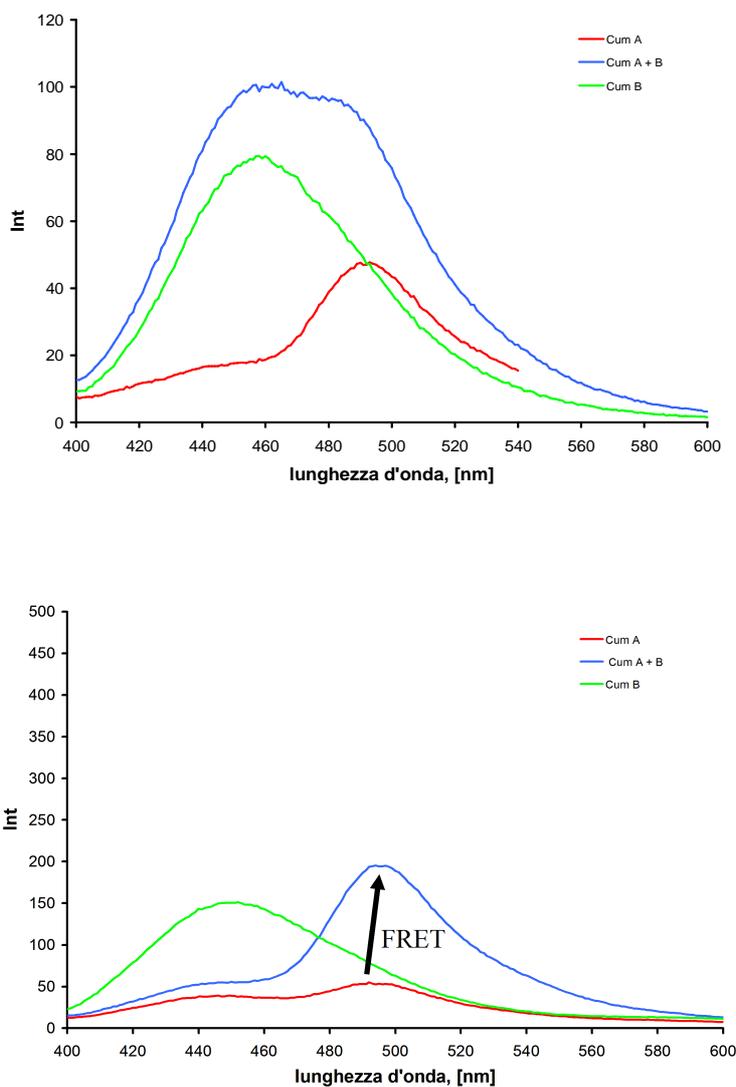


Figura 3.12: assenza e presenza di FRET in soluzioni di peptidi fluorescenti rispettivamente prive (grafico A, sopra) o contenenti (grafico B, sotto) nanoparticelle d'oro cationiche. AuNPs-TACN(Zn^{2+}) [0 M] e $[5.0 \times 10^{-6} \text{ M}]$, TriAsp-Cum 2 (verde) $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, TriAsp-Cum 343 (rosso) $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, miscela dei due $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ognuno (blu); HEPES 10 mM, pH 7,0; eccitazione 353 nm, emissione 400-600 nm, 37°C .

Irradiando le soluzioni contenenti NPs, laddove erano presenti i peptidi da soli si è avuta l'emissione a 450 nm per TriAsp-Cum2 e a 492 nm per TriAsp-Cum343. Nella soluzione contenente i due oligoanioni mescolati tra loro, invece, irradiando a 353 nm si è

registrato il solo spettro di emissione a 492 nm del TriAsp-Cum343. L'intensità di tale emissione era superiore a quella del peptide da solo, essendo data dall'energia da lui assorbita sommata a quella trasferitagli da TriAsp-Cum2. La differenza tra le due emissioni a 492 nm corrisponde all'entità del trasferimento energetico.

Questo esperimento iniziale ha dimostrato l'efficacia del fenomeno FRET sulla superficie delle nanoparticelle. I dati ottenuti hanno fatto inoltre pensare che esse fossero disposte in modo casuale attorno alle nanoparticelle, mescolate: se fossero state disposte "a domini", ossia raggruppate in zone dello stesso tipo, il trasferimento energetico sarebbe avvenuto solamente al confine tra queste zone, e sarebbe quindi stato di intensità inferiore, a stento percepibile.

3.2.2.3 - FRET su AuNPs con sonde fluorescenti in rapporti variabili

Per ottenere conferme sulla presenza del fenomeno FRET a livello di superficie nanoparticellare sono stati effettuati degli esperimenti di controllo. Sono state mescolate le due sonde oligoanioniche in differenti proporzioni, in modo da esplorare la correlazione tra la stechiometria con la quale si dispongono sulla superficie nanoparticellare e la loro comunicazione reciproca.

Sono stati esplorati vari rapporti di concentrazione tra i due oligoanioni, compresi tra 1:0 di TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343 e 0:1, scalando di volta in volta nell'ordine dei decimali. Per ognuno dei rapporti esplorati è stata registrata l'emissione sia a 450 nm che a 493 nm dopo eccitazione a λ 353 nm (figura 3.13).

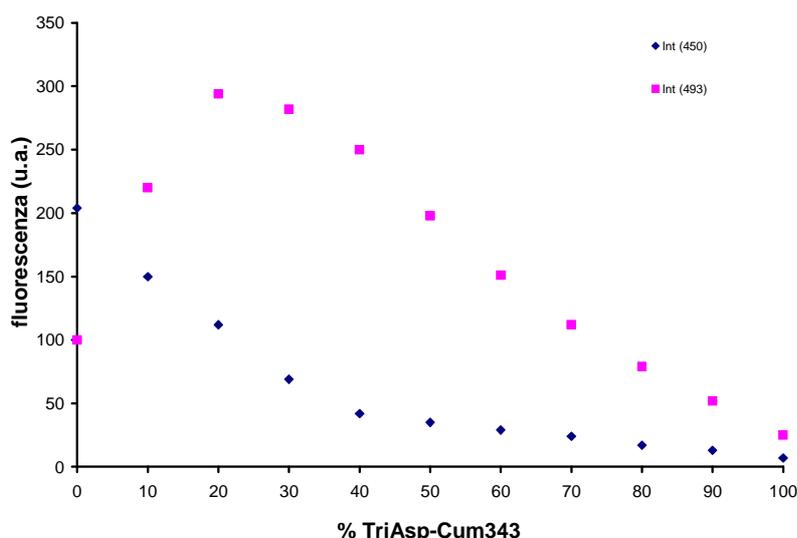
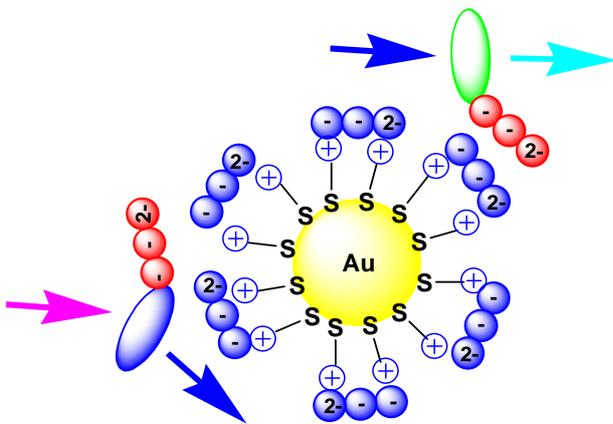


Figura 3.13: andamento della fluorescenza al variare percentuale di TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343; λ eccitazione 353 nm, λ emissione 450 nm (blu) e 493 nm (viola). $[\text{Triasp-Cum 2}] + [\text{Triasp-Cum 343}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M, $[\text{AuNPs-TACN}(\text{Zn}^{2+})] = 5.0 \times 10^{-6}$ M; [HEPES] 10mM, pH 7.0, 40 °C.

Al diminuire della frazione di TriAsp-Cum2 si è avuta la progressiva diminuzione della fluorescenza a 450 nm, data dalla decrescente emissione. Contemporaneamente si è visto un aumento della fluorescenza emessa a 493 nm, fino al raggiungimento di un massimo seguito da un andamento decrescente. L'irradiamento a 353 nm non corrisponde al massimo di assorbimento del Triasp-Cum343, pur eccitandolo in minima parte; il fatto quindi che, con l'aumentare della frazione di TriAsp-Cum343, l'emissione a 493 nm aumentasse non era dovuto alla sua eccitazione da parte della luce incidente, bensì dal trasferimento operato da TriAsp-Cum2. La diminuzione di quest'ultimo era compensata dalla crescita della quantità di TriAsp-Cum343; questo finché, sceso sotto l'80%, TriAsp-Cum 2 non è più stato in quantità sufficiente per operare un efficiente trasferimento energetico al ricevente. Pur aumentando la quantità di TriAsp-Cum 343 in soluzione, quindi, la fluorescenza ha continuato a diminuire sia a 450 nm che a 493 nm. Il medesimo esperimento è stato ripetuto alle stesse condizioni, ma in presenza di un largo eccesso di ATP (3.3×10^{-3} M, schema 3.12); esso aveva lo scopo di spiazzare i peptidi dalla superficie nanoparticellare, mantenendoli in soluzione (figura 3.14).



Schema 3.12: assenza del fenomeno FRET per eccesso di ATP; le sonde fluorescenti sono spiazzate e rimangono in soluzione, ognuna emettendo fluorescenza quando eccitata per conto proprio.

Se il fenomeno FRET fosse stato indipendente dal legame dei peptidi con il monostrato nanoparticellare, ossia se non fosse necessario una loro "immobilizzazione" su un supporto stabile quali le NPs, si sarebbe dovuto ottenere il medesimo andamento ottenuto in precedenza. Invece, poiché era necessario che gli oligoanioni, per poter comunicare, si ancorassero vicini tra loro sul monostrato cationico, il segnale FRET non è stato osservato.

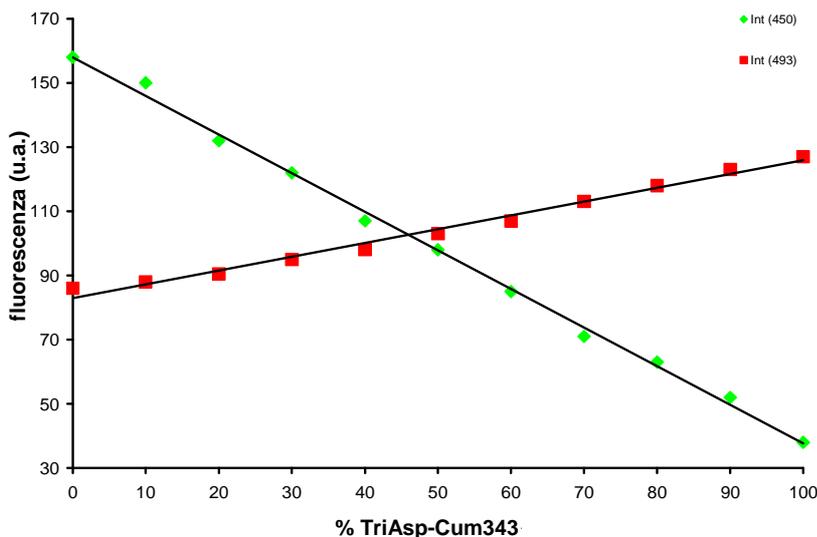


Figura 3.14: assenza di fenomeno FRET al variare del rapporto TriAsp-Cum 343 e TriAsp-Cum 2, per aggiunta di un eccesso di ATP; λ eccitazione 353 nm, λ emissione 450 nm (verde) e 493 nm (rosso). [ATP] = 3.3×10^{-3} M, [TriAsp-Cum 343] + [TriAsp-Cum 2] = 1.0×10^{-6} M, [AuNPs-TACN(Zn^{2+})] = 5.0×10^{-6} M. [HEPES] 10mM, pH 7.0, 40°C.

Al diminuire della frazione molare di TriAsp-Cum2 è stata osservata la diminuzione lineare della fluorescenza emessa a 450 nm; con il contemporaneo aumento della frazione molare di Triasp-Cum343 c'è stata la crescita, altrettanto lineare, dell'emissione a 493 nm, anche se con pendenza minore a causa dell'uso di luce irradiante di lunghezza d'onda non corrispondente al massimo di assorbimento della cumarina 343.

Gli esperimenti così effettuati hanno confermato quanto visto in precedenza, ossia che gli oligoanioni dotati di un'ancora anionica come quella utilizzata sono in grado di assemblarsi efficacemente attorno al monostrato cationico e, successivamente, di comunicare tra loro. Questo ha dimostrato che l'ancora anionica formata da tre acidi aspartici è perfettamente in grado di provvedere alla copertura del monostrato cationico delle nanoparticelle, e quindi è ottimale per la post-funzionalizzazione con molecole opportunamente modificate in tal senso. Questo dimostra inoltre come sia possibile creare una superficie post-eterofunzionalizzata.

Tutte le prove fin qui effettuate hanno sfruttato nanoparticelle il cui monostrato cationico era formato dai gruppi terminali TACN(Zn^{2+}); è stato quindi deciso di effettuare esperimenti del tutto simili su nanoparticelle ricoperte con tioli ammoniacali, che hanno dimostrato nelle prove preliminari una minor capacità attrattiva nei confronti degli oligoanioni. Sono quindi state effettuate titolazioni, esplorando i medesimi

rapporti di concentrazione già utilizzati, su AuNPs-NH₄⁺ 1.0 x 10⁻⁵ M, ma usando una concentrazione totale costantemente pari a 5.0 x 10⁻⁷ M (figura 3.15, A). Lo stesso è stato effettuato alle stesse condizioni ma in totale assenza di nanoparticelle (figura 3.15, B).

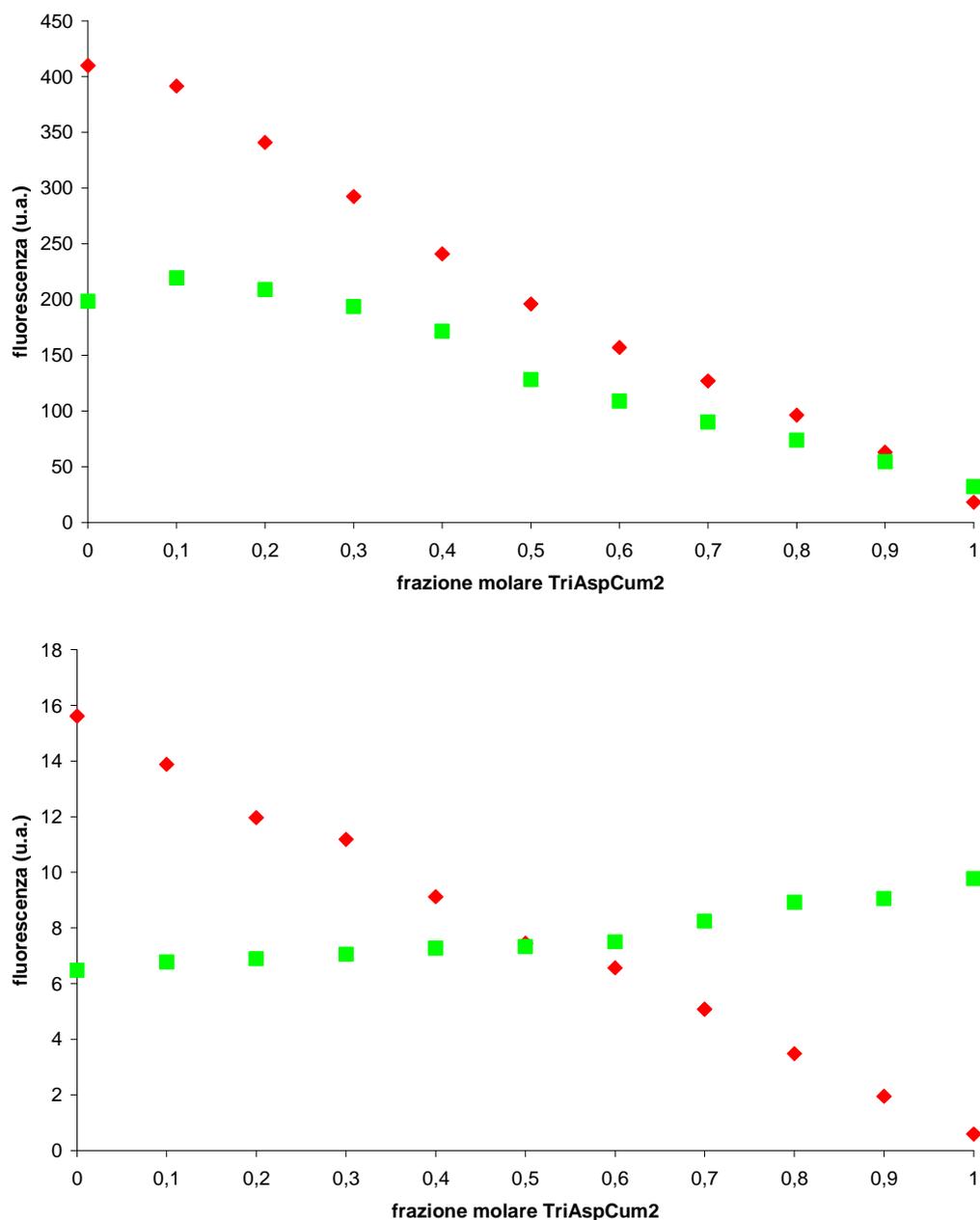


Figura 3.15: andamento della fluorescenza al variare del rapporto dei peptidi TriAsp-Cum 343 e TriAsp-Cum 2 con [AuNPs-NH₄⁺] = 1.0 x 10⁻⁵ M (A, sopra) e [AuNPs-NH₄⁺] = 0 M (B, sotto). [TriAsp-Cum 343] + [TriAsp-Cum 2] = 5.0 x 10⁻⁶M, [HEPES] = 10mM, pH 7.0, 37°C, finestre 10:20 (sinistra) e 2.5:5 (destra); eccitazione 353 nm, emissione 450 nm (rosso) e 492 nm (verde).

In assenza di nanoparticelle, all'aumentare della frazione molare di TriAsp-Cum2 si è visto il medesimo comportamento già osservato in precedenza in eccesso di ATP: l'emissione a 450 nm (in rosso) è aumentata con l'incremento di TriAsp-Cum2 in soluzione, mentre l'emissione a 492 nm (in verde) è diminuita mano a mano che è calata la percentuale di TriAsp-Cum343, il tutto con proporzionalità diretta, lineare.

In presenza di NPs si è avuto incremento lineare della fluorescenza a 450 nm (in rosso), ma si è avuto anche l'incremento della fluorescenza a 492 nm (in verde), sebbene ciò avvenisse contestualmente alla graduale diminuzione della percentuale di TriAsp-Cum343. Anche qui si è visto il medesimo comportamento avvenuto sulla superficie del monostrato cationico TACN(Zn^{2+}): in presenza di grandi quantità di TriAsp-Cum343, molte di queste molecole non ricevevano energia a causa della scarsa presenza di donatore sulla superficie nanoparticellare, con bassa emissione a 492 nm. Con l'aumentare di TriAsp-Cum2 l'energia emessa a 450 nm, eccitante il TriAsp-Cum 343, è aumentata; sebbene la quantità di ricevente sia progressivamente diminuita, la sua emissione ha continuato ad aumentare. Solamente quando TriAsp-Cum 343 si è trovato al 10% della quantità totale di peptidi in soluzione è stato saturato, raggiungendo il punto di massima fluorescenza emessa a 492 nm.

Anche utilizzando AuNPs- NH_4^+ , dotate quindi di un minor numero di cariche rispetto alle AuNPs-TACN(Zn^{2+}), è stata confermata la presenza del fenomeno FRET; questo ha confermato la possibilità di assemblare superfici eterofunzionalizzate utilizzando molecole anioniche su nanoparticelle cationiche.

3.3 - CONCLUSIONI

Scartata la via covalente, è stato deciso di procedere con la post-funzionalizzazione tramite formazione di legami ionici, sintetizzando nanoparticelle ricoperte da un monostrato di tioli cationici ai quali far legare le molecole di interesse dopo averle opportunamente dotate di un'ancora anionica. Ovviamente è stato necessario testare un sistema del genere prima del suo utilizzo vero e proprio, e come sistema di rilevazione è stata scelta la fluorescenza, basandosi sulla proprietà dell'oro di smorzarla quando la sonda emittente gli si trova sufficientemente vicina. Oltre alla semplice valutazione della capacità di legame dell'oligoanione scelto, una molecola di acido Tri-Aspartico (dotata di quattro cariche negative), è stata testata la capacità delle molecole utilizzate nella formazione di aggregati misti sulla superficie nanoparticellare.

Dall'analisi fluorimetrica è emersa la capacità degli oligoanioni carbossilici di legare fortemente il monostrato cationico, permettendo il calcolo della capacità di caricamento del monostrato stesso da parte delle molecole anioniche. In questo è emerso che, a parità di tioli teoricamente disposti sulla superficie di ogni singola nanoparticella, le AuNPs-TACN(Zn^{2+}) possono legare una quantità circa doppia di oligoanioni rispetto alle AuNPs- NH_4^+ , probabilmente proprio al fatto che per ogni tiolo, nel primo caso, sono disponibili due cariche positive per l'interazione, a dispetto della singola carica presente nel secondo caso.

Le analisi FRET, poi, hanno mostrato che le molecole, legandosi al monostrato cationico tramite l'ancora anionica, sono in grado di comunicare tra loro. Questo ha inoltre dimostrato che usando miscele di composti è possibile assemblare sistemi multivalenti.

Il fatto che sulla superficie nanoparticellare sia stato osservato FRET, contrariamente a quanto avvenuto con le molecole libere in soluzione, ha inoltre rivelato che tali molecole si sono trovate abbastanza vicine da poter comunicare tra loro: se avvenuto con sonde fluorescenti, lo stesso può accadere anche con molecole di altro tipo, come appunto catalizzatori, i quali si troverebbero a beneficiare di un effetto cooperativo esattamente come già dimostrato per i gruppi TACN(Zn^{2+}) assemblati su nuclei d'oro.

Alla luce di tali dati è stato quindi valutato positivamente l'uso della post-funzionalizzazione di nanoparticelle cationiche cosiddette "universali", tramite formazione di legami ionici. Essi si formano con alta affinità in acqua e a pH 7.0, rivelandosi quindi molto utili in applicazioni biologiche. Ovviamente qualsiasi molecola si voglia legare alla superficie delle AuNPs dovrà essere dotata di un'ancora anionica, peptidica o meno, la quale permetterà la post-funzionalizzazione desiderata.

3.4 - PARTE SPERIMENTALE

3.4.1 - MATERIALI

I materiali utilizzati sono i medesimi descritti nel capitolo precedente nel paragrafo 2.4.1, a differenza di quanto sotto riportato.

3.4.1.1 - Reagenti e solventi

Per le analisi e le purificazioni HPLC sono stati usati acqua Milli-Q e acetonitrile UV-grade in varie proporzioni, tutti addizionati allo 0.1% di acido trifluoracetico.

3.4.1.2 - Soluzioni tampone

Il tampone utilizzato nelle analisi fluorimetriche e spettrofotometriche è un prodotto commerciale, acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-2-etansolfonico (HEPES, pK_a 7.2), e non è stato ulteriormente purificato.

3.4.1.3 - Materiale per sintesi su fase solida

Tutte le sintesi su fase solida sono state effettuate su resina Wang con granulometria 100-200 mesh, con capacità di caricamento di 1×10^{-3} moli/g.

3.4.2 - STRUMENTAZIONE

La strumentazione utilizzata è la stessa già descritta nel capitolo precedente (paragrafo 2.4.2), a differenza di quanto sotto riportato.

3.4.2.1 - Spettrofotometria UV/Vis

Per la registrazione degli spettri UV/VIS sono stati utilizzati gli spettrofotometri Varian Cary 50, Varian Cary 100 e Perkin Elmer λ 45, equipaggiati con portacelle termostatati a circolazione d'acqua. Per le misure si sono usate celle di quarzo HELMA con cammino ottico di 10 mm, di volume 1 ml. Gli spettri si intendono registrati a 25°C, se non diversamente indicato.

3.4.2.2 - Spettrofluorimetria

Per la registrazione degli spettri di fluorescenza è stato usato uno spettrofluorimetro Varian Cary Eclipse Fluorescence, dotato di porta celle termostatato a circolazione d'acqua. Per le misure sono state usate celle di quarzo HELMA con cammino ottico di 10 mm, di volume 3 ml.

3.4.3 - METODOLOGIE GENERALI

3.4.3.1 - Kaiser Test qualitativo

Per verificare la presenza o l'assenza di gruppi amminici liberi legati alla resina fra diversi passaggi della sintesi in fase solida, si preleva una piccola quantità di resina e la si lava in piccolo vial di vetro tramite immersione in metanolo, trattamento che la sgonfia per dilavamento della DMF. Dopo rimozione del solvente, vi si aggiungono consecutivamente alcune gocce di ninidrina (soluzione 1 g/20 ml in etanolo), fenolo (soluzione 4 g/ml in etanolo) e piridina. La miscela va posta a riscaldare in fornello a

120°C, dove in alcuni minuti la resina si colora di viola scuro in presenza di gruppi amminici liberi, oppure rimane gialla chiara in loro assenza.

3.4.3.2 - Distacco del Gruppo Protettore Fmoc

Per ottenere il distacco di un gruppo protettore Fmoc da un gruppo funzionale amminico fissato su resina, si procede con l'aggiunta di una soluzione di piperidina al 20 % in DMF, lasciandola in contatto con la resina per 15 minuti. Eliminata la soluzione, il procedimento viene ripetuto un'altra volta, e successivamente la resina viene sottoposta a lavaggio.

3.4.3.3 - Acetilazione

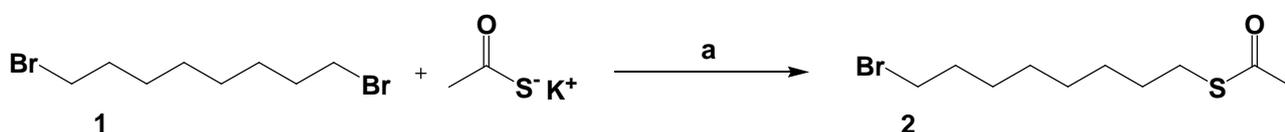
Per sopprimere la reattività di gruppi nucleofili liberi, presenti in peptidi in accrescimento su fase solida, si aggiunge una soluzione di anidride acetica al 50% in piridina, lasciandola in contatto con la resina per 30 minuti. Dopo tale periodo, la soluzione è eliminata e la resina è sottoposta a lavaggio.

3.4.3.4 - Lavaggio della Resina

Per rimuovere residui di solventi e soluti dalla resina per sintesi in fase solida, essa viene lavata aggiungendovi DMF e sottoponendola a breve agitazione, eliminando poi il solvente. Tale procedimento viene ripetuto un totale di 3 volte; per eliminare i residui di DMF lo stesso procedimento viene ripetuto altre 2 volte utilizzando CH₂Cl₂.

3.4.4 - PROCEDURE di SINTESI

3.4.4.1 - Sintesi di S-acetil-8-mercapto-1-bromoottano



Schema 3.13: a) acetone anidro, tubo CaCl₂, resa 49%, 1 notte.

Il composto 1 (1,8-dibromo-ottano, 4.35 g, 1.6 x 10⁻² moli, 1 eq) è stato dissolto in 40 ml di acetone anidro, per poi essere aggiunto di potassio tioacetato (1.8 g, 1.6 x 10⁻² moli, 1 eq). La miscela risultante è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente e in atmosfera di azoto per una notte. Dopo evaporazione del solvente, il solido giallo è

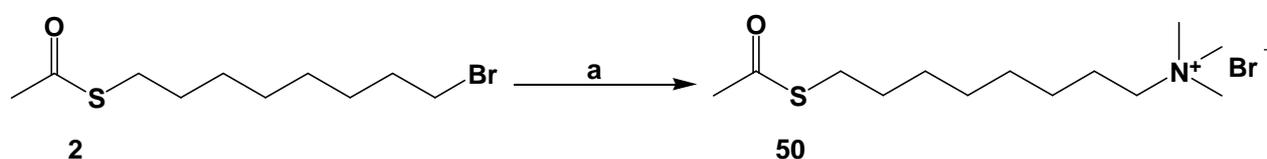
stato dissolto in CH_2Cl_2 e lavato con acqua (3 x 40 ml). Dopo anidificazione con Na_2SO_4 la fase organica è stata evaporata e il crudo di reazione è stato purificato tramite cromatografia flash su silice (eluente CH_2Cl_2), ottenendo S-acetil-8-mercapto-1-bromooctano (1.75 g, resa 41%, composto **2**) come olio giallo.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 3.38 (t, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 2.83 (t, 2H, $J=7.3\text{Hz}$), 2.30 (s, 3H), 1.81 (tt, 2H, $J=6.9\text{Hz}$, $J=14.5\text{Hz}$), 1.53 (tt, 2H, $J=6.9\text{Hz}$, $J=14.2\text{Hz}$), 1.31 (m, 8H, $J=7.2\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): δ (ppm) 160.62, 33.98, 32.71, 30.63, 29.42, 29.06, 28.87, 28.62, 28.55, 28.03.

MS (ESI+, MeOH): m/z 267.8 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 268.2).

3.4.4.2 - Sintesi di S-acetil-8-mercapto-1-ottil-trimetilammonio bromuro



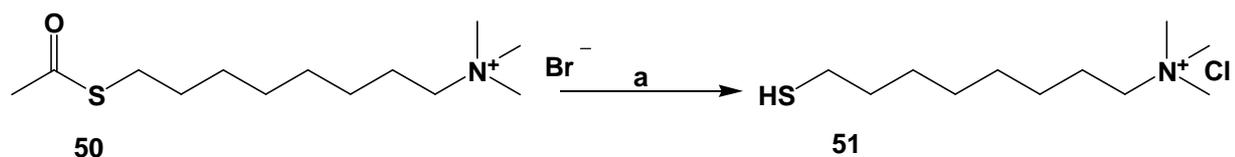
Schema 3.14: a) $\text{N}(\text{Me})_3$ in etanolo, acetonitrile anidro, tubo CaCl_2 , 1 notte, 82°C , resa 81%.

Il composto **2** (500 mg, 1.87×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto in 10 ml di ACN anidro e aggiunto di una soluzione di trimetilammina al 30% p/p in etanolo (350 mg, 1.87×10^{-3} moli); la reazione è stata mantenuta protetta dall'umidità, tramite tubo CaCl_2 , a 82°C per la notte. Dopo l'evaporazione del solvente il prodotto crudo è stato purificato tramite cromatografia flash (eluente CH_2Cl_2 seguito da metanolo), ottenendo S-acetil-8-mercapto-1-ottil-trimetilammonio bromuro (490 mg, resa 81%, composto **50**) come solido bianco.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CD_3OD): δ (ppm) 3.57 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 3.37 (s, 9H), 3.05 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 2.52 (s, 3H), 1.97 (br, 2H), 1.77 (qn, 2H, $J=8\text{Hz}$), 1.58 (br, 8H).

MS (ESI+, MeOH): m/z 247.1 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 247.4).

3.4.4.3 - Sintesi di 8-mercapto-1-ottil-trimetilammonio cloruro



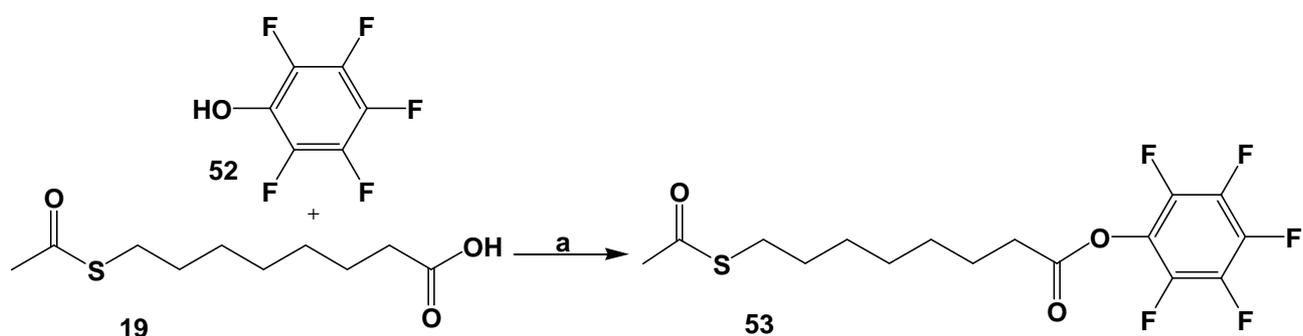
Schema 3.15: a) HCl 6 M, etanolo, N_2 , 78°C , 3h, resa 98%.

Il composto **50** (200 mg, 6.2×10^{-4} mol) è stato dissolto in 2 ml di etanolo e aggiunto di 2 ml di HCl 6M, mantenendo la reazione in atmosfera di azoto a 78 °C per tre ore. Dopo l'evaporazione del solvente è stato ottenuto 8-mercapto-1-ottil-trimetilammonio cloruro (145 mg, resa 98%, composto **51**) come solido bianco.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CD_3OD): δ (ppm) 3.39 (m, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.50 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 1.82 (br, 2H), 1.61 (qn, 2H, $J=8\text{Hz}$), 1.40 (m, 8H).

MS (ESI+, MeOH): m/z 205.3 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 205.4).

3.4.4.4 - Sintesi di S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil-pentafluorofenilestere

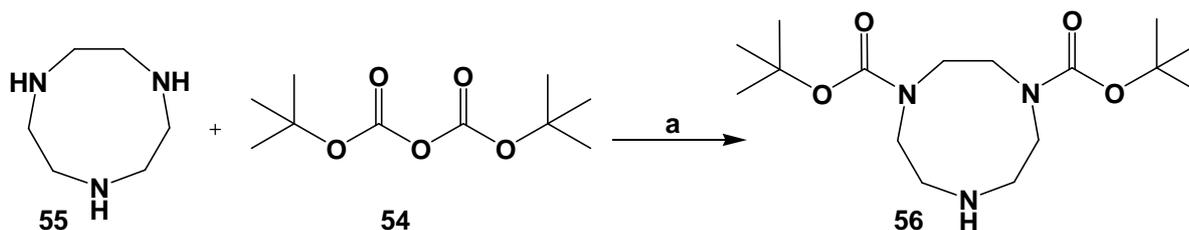


Schema 3.16: a) CH_2Cl_2 anidro, N_2 , EDC, RT, 1 notte; lavaggio KHSO_4 10% e NaCl saturo, resa quantitativa.

Acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (composto **19**, 500 mg, 2.3×10^{-3} moli, 1 eq) è stato dissolto in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro ed aggiunto, sotto flusso di azoto e a 0 °C, di pentafluorofenolo (composto **52**, 500 mg, 2.74×10^{-3} moli, 1.2 eq) ed EDC (520 mg, 2.74×10^{-3} moli, 1.2 eq). Dopo una notte a temperatura ambiente la miscela di reazione è stata diluita con 30 ml di CH_2Cl_2 , lavata con una miscela di KHSO_4 al 10% e NaCl saturo 1:1 (2 x 15 ml) e anidrificata con MgSO_4 anidro, ottenendo S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil-pentafluorofenilestere come olio giallo scuro (900 mg, resa quantitativa, composto **53**).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.87(t, 2H, 2- CH_2); 2.65 (t, 2H, 8- CH_2); 2.33 (s, 3H, CH_3); 1.76-1.58 (br, 4H, 3,7- CH_2); 1,38 (mbr, 6H, 4,5,6- CH_2).

3.4.4.5 - Sintesi di 1,4-Bis(t-butilossicarbonil)-1,4,7-triazaciclononano



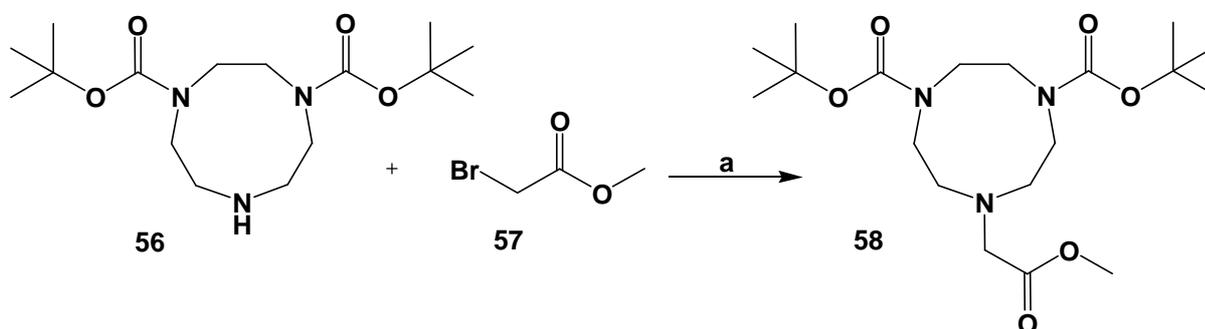
Schema 3.17: a) CHCl_3 anidro, N_2 , DBU, RT, 18 h; lavaggio NaHCO_3 saturo, resa 88%.

Di-terz-butil-dicarbonato (Boc, composto 54, 990 mg, 4.53×10^{-3} moli, 1.8 eq) è stato dissolto in 10 ml di CHCl_3 anidro, per poi essere aggiunto mediante siringa a pompa ad una soluzione di DBU (1.8 ml, 1.9 g, 12.3×10^{-3} moli, 4.9 eq) e triazaciclononano (TACN, composto 55, 600 mg, 2.5×10^{-3} moli, 1 eq) in 12 ml di CHCl_3 anidro. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 18 h in atmosfera di N_2 . Dopo diluizione con CHCl_3 (volume totale 150 ml), lavaggio con NaHCO_3 saturo (3 x 25ml) e purificazione tramite colonna cromatografica su silice (eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 3%) è stato ottenuto 1,4-Bis(t-butilossicarbonil)-1,4,7-triazaciclononano, olio giallo chiaro (composto 56, 722 mg, resa 88%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 1.43 (s, 18H, t-Bu), 2.91 (br, 4H, CH_2NHCH_2), 3.25 (m br, 4H, 2 $\text{N}^*\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}$), 3.45 (m br, 4H, $\text{N}^*\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{N}^*$), *(appartenenti al t-Boc).

MS (ESI+, MeOH): m/z 330.2 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 330.4).

3.4.4.6 - Sintesi di metil-[1-(4,7-diBoc-1,4,7-TACN)]-acetato



Schema 3.18: a) acetonitrile anidro, K_2CO_3 , KHCO_3 , N_2 , RT, 3 h; resa 81%

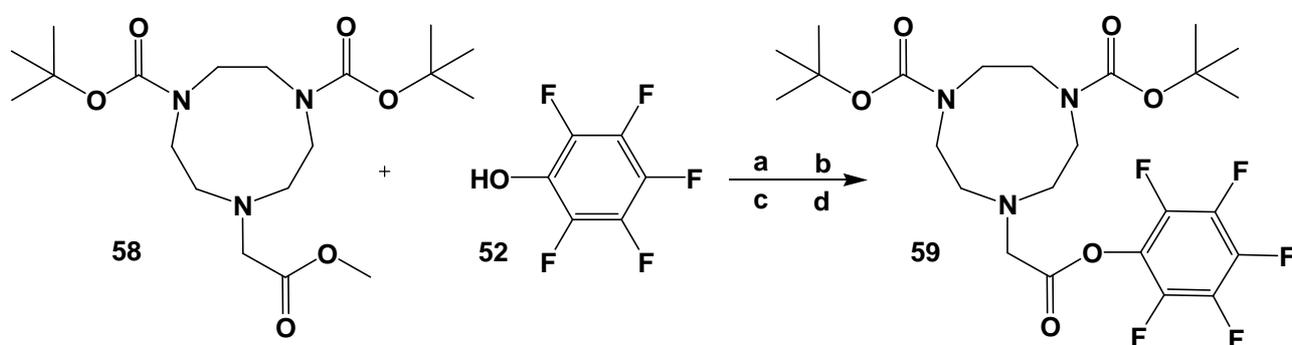
Dissolto in acetonitrile anidro e alcalinizzato con K_2CO_3 (350 mg, 2.5×10^{-3} moli, 3 eq) e KHCO_3 (spatolata), il composto 56 (280 mg, 8.5×10^{-4} moli, 1 eq) è stato aggiunto di bromo metossi-acetato (composto 57, 285 mg, 1.02×10^{-3} moli, 1.2 eq); la miscela è

stata posta sotto agitazione sotto flusso di N₂ per 3 ore. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su silice (eluente Etere di Petrolio/EtOAc 80:20), ottenendo metil-[1-(4,7-diBoc-1,4,7-TACN)]-acetato come olio incolore (composto **58**, 277 mg, resa 81%).

¹H-NMR (250 MHz CDCl₃): δ (ppm) 1.45 (s, 18H, t-Bu), 2.83 (br, 4H, CH₂N' CH₂), 3.23 (m br, 4H, 2 N*-CH₂CH₂N'), 3.43 (m br, 6H, 2 N*-CH₂-CH₂N*, CH₂COO CH₃), 3.67 (m br, 3H, COOCH₃), *(appartenente al metilacetato), *(appartenente a t-Boc).

MS (ESI+, MeOH): m/z 402.5 ([M+H⁺], calcolata 402.5).

3.4.4.7 - Sintesi di pentafluorofenil[1-(4,7-diBoc-1,4,7-TACN)]-acetato

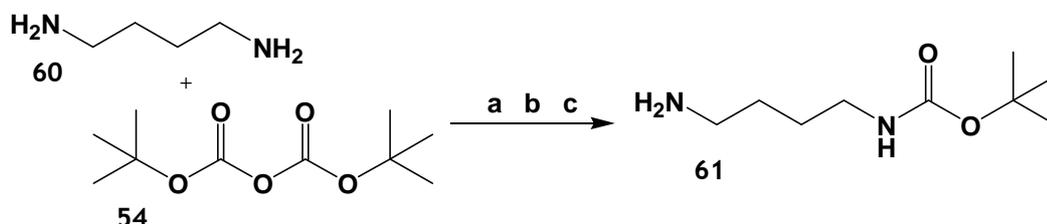


Schema 3.19: a) metanolo, LiOH x H₂O, N₂, RT, 4 h; b) KHSO₄ 10%, etile acetato; c) CH₂Cl₂, EDC, N₂, 0° C, 1 notte; d) KHSO₄ 10%, NaCl saturo; resa 80%.

Sciolto il composto **58** in metanolo (250 mg, 6.2×10^{-4} moli, 1 eq), è stato aggiunto di una soluzione di 103 mg di LiOH monoidrato (2.48×10^{-3} moli, 4 eq) in 4 mL di acqua, e la miscela è stata lasciata reagire per 4 h sotto flusso di N₂. Tolto il solvente organico, la soluzione acquosa è stata acidificata con KHSO₄ 10% fino a pH 3, estraendo 2-{1-[4,7-diBoc-1,4,7-TACN]}-acetato con etile acetato. Anidrificata la miscela con MgSO₄, il solvente è stato eliminato ed il residuo è stato dissolto in CH₂Cl₂ anidro e portato a 0° C. Alla soluzione sono stati quindi aggiunti pentafluorofenolo (182 mg, 1.0×10^{-3} moli, 1.6 eq, composto **52**) ed EDC (192 mg, 1×10^{-3} moli, 1.6 eq), ponendo la soluzione in agitazione sotto flusso di N₂ per tutta la notte. Dopo diluizione della miscela di reazione con alcuni ml di CH₂Cl₂, essa è stata lavata con una soluzione di KHSO₄ 10% e NaCl saturo 1:1 (2 x 5 ml) e anidrificata con MgSO₄. Eliminato il solvente, si è ottenuto pentafluorofenil[1-(4,7-diBoc-1,4,7-TACN)]-acetato come olio giallo scuro (composto **59**, 287 mg, resa 80%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 1.48 (s, 18H, t-Bu), 2.93 (br, 4H, $\text{CH}_2\text{N}'\text{CH}_2$), 3.32 (m br, 4H, 2X $\text{N}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}'$), 3.47 (m br, 4H, $\text{N}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^*$), 3.87 (m br, 2H, CH_2COO pentafluorenil), *=(t-Boc), '=pentafluorenil.

3.4.4.8 - Sintesi di N-Boc-diamminobutano



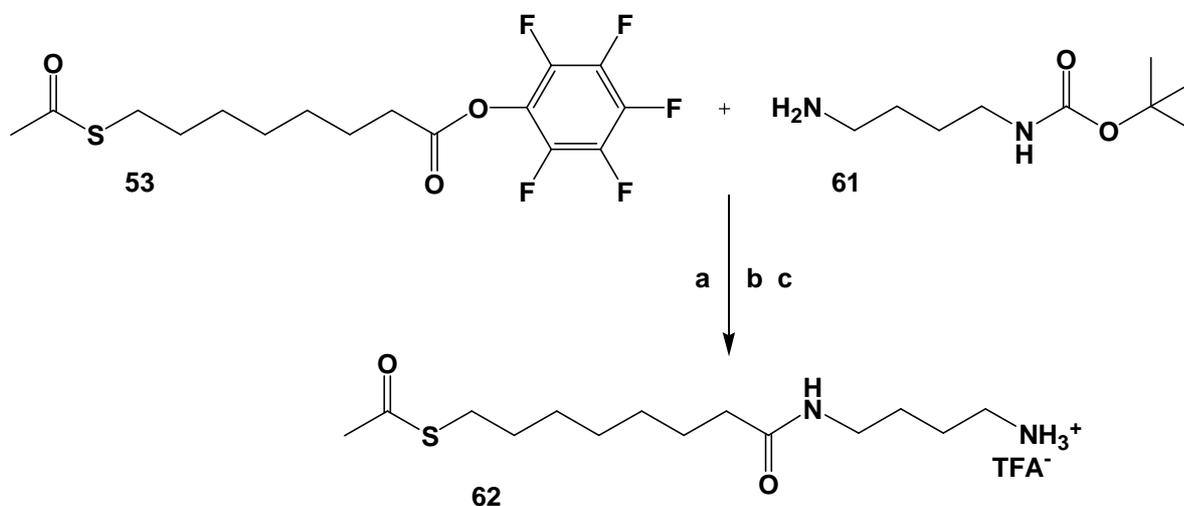
Schema 3.20: a) metanolo, K_2CO_3 , RT, 1 notte; b) CH_2Cl_2 , acido acetico; c) NaOH , CH_2Cl_2 ; resa 58%.

1,4-diamminobutano (composto **60**, 1.8 ml, 17.8×10^{-3} moli, 1 eq), dissolto in 40 ml di metanolo, è stato aggiunto di K_2CO_3 fino ad alcalinizzazione della soluzione e, successivamente, di una soluzione di Boc-anidride (**54**, 1.96 g, 9.0×10^{-3} moli, 0.5 eq) in 15 ml di metanolo goccia a goccia, lasciando agitare la miscela ottenuta per tutta la notte. Filtrato il solido ed eliminato il solvente, il residuo è stato ripreso con 30 ml di CH_2Cl_2 ed estratto con acido acetico 1 M (3 x 30 ml), alcalinizzato con NaOH (4 g) ed estratto nuovamente con CH_2Cl_2 (4 x 20 ml). Anidrificata la soluzione con Na_2SO_4 ed eliminato per evaporazione il solvente organico, è stato ottenuto N-Boc-diamminobutano come olio giallo pallido (composto **61**, 980 mg, resa 58%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 5,09 (s, NHCO), 3,13 (m, 2H, CH_2NHBoc); 2.71 (m, 2H, CH_2NH_2); 1.43 (m, 13H, Boc + CH_2 interni).

MS (ESI+, MeOH): m/z 189.2 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 189.3).

3.4.4.9 - Sintesi di N-(S-acetil-8-mercapto-ottanoil)-butilendiammonio trifluoroacetato



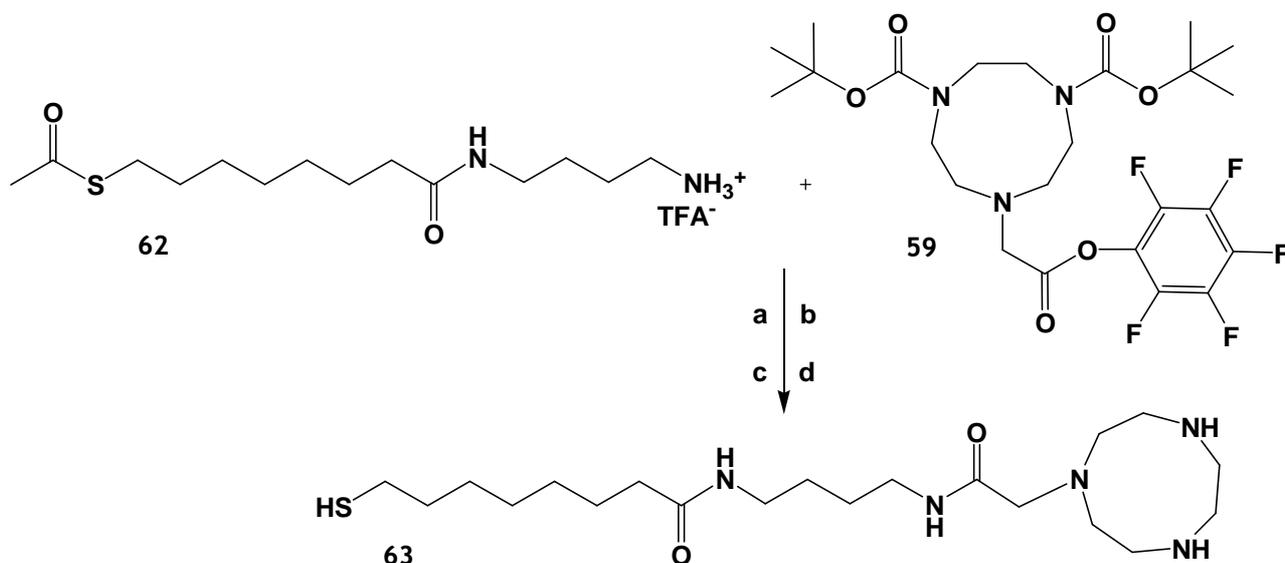
Schema 3.21: a) CH_2Cl_2 anidro, N_2 , K_2CO_3 , 0°C , 2 h; b) KHSO_4 10%, NaCl saturo; c) CH_2Cl_2 , TFA; resa 45%.

Il composto **61** (480 mg, 2.6×10^{-3} moli, 1.8 eq) è stato dissolto in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro e posto a 0°C in atmosfera di N_2 . Alla soluzione sono stati aggiunti K_2CO_3 (fino ad ottenere pH 9) e, goccia a goccia, una soluzione di 5 ml di S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil-pentafluorofenilestere (composto **53**, 560 mg, 1.46×10^{-3} moli, 1 eq) in CH_2Cl_2 , e la miscela è stata lasciata sotto agitazione per 2 ore. Dopo filtrazione, la fase organica di CH_2Cl_2 è stata lavata consecutivamente con 10 ml di KHSO_4 10% e con 10 ml NaCl saturo, ottenendo N-Boc-N'-(S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil)-butilendiammina. Aggiunti 3 ml di TFA alla soluzione di CH_2Cl_2 e lasciato tutto sotto agitazione, l'andamento della reazione è stato verificato tramite TLC (Silice, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%, UV). Dopo eliminazione del solvente è stato ottenuto N-(S-acetil-8-mercapto-1-ottanoil)-butilendiammonio trifluoroacetato (composto **62**, 267 mg, resa 45%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 3.19 (t, 2H, CH_2NH_2), 2.93 (t, 2H, CH_2NHCO), 2.84 (t, 2H, CH_2SCO), 2.28 (s, 3H, CH_3CO), 2.17 (t, 2H, CH_2CONH), 1.59-1.31 (br, 10H, CH_2 catena alifatica), 1.33 (br, 4H, CH_2 catena alifatica).

MS (ESI+, MeOH): m/z 290.3 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 290.5).

3.4.4.10 - Sintesi del tiolo 63



Schema 3.22: a) CH_2Cl_2 anidro, DMAP, DIEA, N_2 , 15 h; b) NaHSO_4 10%, KHSO_4 10%, NaCl saturo; c) CH_2Cl_2 , TFA, 2 h; d) HCl 1.25 M in metanolo, 60°C , 3 h; resa 64%.

Il composto **62** (160 mg, 3.9×10^{-4} moli, 1 eq) è stato dissolto in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro assieme al composto **59** (280 mg, 5×10^{-4} moli, 1.3 eq) e a DIPEA (6.6 mg, 5.1×10^{-5} moli, 0.13 eq). La miscela è stata lasciata reagire sotto flusso di azoto per 15 ore, lavandola poi nell'ordine con 15 ml di una soluzione di NaHCO_3 10%, 15 ml di una soluzione di KHSO_4 10% e 15 ml di una soluzione di NaCl saturo. Dopo anidificazione con Na_2SO_4 , il solvente è stato eliminato per evaporazione e il grezzo è stato purificato con cromatografia flash su silice (eluente CHCl_3 / MeOH 1%) ottenendo il diBOC-TACN derivato, un olio incolore. Sciolto in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro ed aggiunto di 3 ml di TFA, la soluzione è stata lasciata sotto agitazione per 2 ore. Eliminato il solvente, il trifluoroacetato TACN-derivato grezzo ottenuto è stato sciolto in poche gocce di MeOH e aggiunto di 15 ml di HCl 3 M in EtOH , lasciando reagire la miscela a 78°C per 3 ore. Eliminato il solvente, è stato infine ottenuto il tiolo voluto (composto **63**, resa 64%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz CDCl_3): δ (ppm) 3.67 (NHCH₂CH₂NH); 3.51 (s, 2H, COCH₂Ntriaz), 3.27 (mbr, 2xCH₂NH + 2xCH₂NH del TACN), 3.03 (br, 4H, CH₂NCH₂), 2.46 (t, 2H, CH₂SCO); 2.30 (s, 3H, CH₂CONH); 1.47 (br, 8H, CH₂ della catena alifatica); 1,28 (m, 6H, catena alifatica).

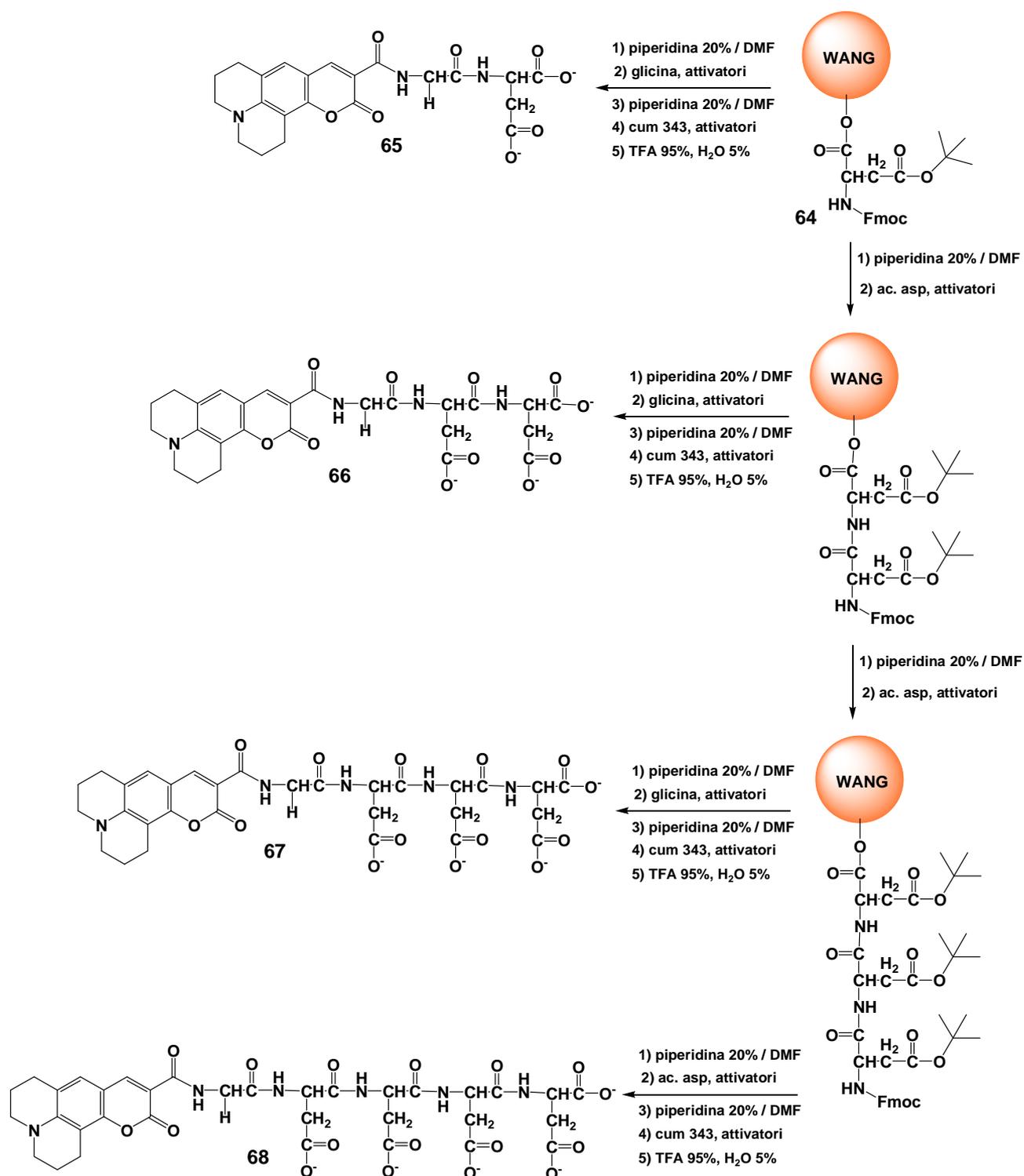
MS (ESI+, MeOH): m/z 416.4 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcolata 416.6).

3.4.4.11 - Sintesi e copertura di AuNPs-TACN e AuNPs-NH₄⁺

Per la sintesi dei campioni di nanoparticelle utilizzati negli esperimenti successivi è stato seguito il protocollo messo a punto dal gruppo del Professor Scrimin³¹, descritto nel capitolo precedente. Una volta ottenute le nanoparticelle, esse sono state ricoperte col tiolo **51** o con il tiolo **63** e purificate su colonna Sephadex G-25 (eluente acqua mQ).

I nuclei d'oro sono stati caratterizzati mediante analisi TEM, registrate con un microscopio elettronico Jeol 300 PXTEM, il monostrato tramite analisi ¹H-NMR e DLS (come riportato nel paragrafo **3.2**).

3.4.4.12 - Sintesi di peptidi oligoanionici fluorescenti



Schema 3.23: sintesi progressiva in fase solida dei peptidi fluorescenti. Ad ogni frazione di resina sono stati legati rispettivamente 1, 2, 3 e 4 Asp, e su ognuno dei quattro peptidi è stata legata una molecola di glicina. Su di essa è stato effettuato il coupling con cumarina 343, successivamente i quattro peptidi sono stati liberati dalla resina e purificati.

Resina Wang (500 mg, loading 1×10^{-3} moli/g) è stata posta in apposito reattore a rigonfiare per 30 minuti imbevuta di DMF. Contemporaneamente acido aspartico Fmoc N-protetto (1 g, 2.5×10^{-3} moli, 5 eq) è stato dissolto in 4 ml di una miscela di CH_2Cl_2 e DMF 1:1 posta in bagno di ghiaccio a 0°C , e alla soluzione sono stati poi aggiunti HOBT x 3 H_2O (380 mg, 2.5×10^{-3} moli, 5 eq) e DIC (315 mg, 2.5×10^{-3} moli, 5 eq), lasciando il tutto sotto agitazione per 30 minuti.

Dopo rimozione del solvente in eccesso dalla resina, ad essa sono state aggiunte la miscela di amminoacido attivato e DIEA (430 μl , 325 mg, 2.5×10^{-3} moli, 5 eq), lasciando il reattore in agitazione meccanica per 2,5 ore. Eliminato il solvente, la resina è stata lavata (col protocollo standard di lavaggio: 3 x DMF, 2 x CH_2Cl_2), per poi essere aggiunta della soluzione di acetilazione (soluzione al 50% di anidride acetica in piridina, 30 minuti), ottenendo il composto **64**. Dopo aver ben lavato la resina, essa è stata suddivisa in quattro porzioni analoghe: in ognuna di queste è stata aggiunta, per due volte, la miscela di distacco del gruppo Fmoc (piridina 20% in DMF), verificando l'avvenuta reazione, dopo lavaggio, tramite Kaiser test. Dopo ulteriore lavaggio, in uno dei reattori è stata aggiunta una soluzione di glicina N-Fmoc (112 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq), HOBT x 3 H_2O (57 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq) e HBTU (142 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq) in DMF, con l'aggiunta successiva di DIEA (64 μl , 3.75×10^{-4} moli, 3 eq); negli altri tre reattori è stata invece posta una soluzione di acido aspartico N-Fmoc (154 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq), HOBT x 3 H_2O (57 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq) e HBTU (142 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq) in DMF, con l'aggiunta successiva di DIEA (64 μl , 3.75×10^{-4} moli, 3 eq). Tutti e quattro i reattori sono stati posti in agitazione per 1 h, e successivamente il loro contenuto è stato lavato, verificando l'avvenuta reazione col Kaiser test. Nel primo è stato ottenuto il peptide MonoAsp⁽²⁻⁾ (precursore del composto **65**), mentre negli altri tre reattori è stato effettuato il doppio "passaggio" con la miscela di distacco del Fmoc: dopo lavaggio, nel primo è stata posta la soluzione di glicina Fmoc e negli altri due la soluzione di acido aspartico Fmoc. Così si è ottenuto, nel secondo reattore, il peptide DiAsp⁽³⁻⁾ (precursore del composto **66**), e nel terzo e nel quarto, ripetendo i passaggi precedenti, si sono ottenuti i peptidi TriAsp⁽⁴⁻⁾ (precursore del composto **67**) e TetrAsp⁽⁵⁻⁾ (precursore del composto **68**), tutti ancora N-protetti. A questo punto in tutti e quattro i reattori è stata posta la soluzione di deprotezione e, dopo lavaggio, è stata aggiunta una soluzione contenente cumarina 343 (71 mg, 2.50×10^{-4} moli, 2 eq), HOBT x 3 H_2O (57 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq) e HBTU (142 mg, 3.75×10^{-4} moli, 3 eq) in DMF, con l'aggiunta successiva di DIEA (64 μl , 3.75×10^{-4} moli, 3 eq), lasciando in agitazione

meccanica per una notte. Dopo lavaggio, verificato l'andamento della reazione tramite Kaiser test, le resine con legati i peptidi sono state poste separatamente in quattro differenti palloni da 25 ml e aggiunte di 3 ml di una soluzione di TFA 95% in acqua mQ, ponendo in agitazione magnetica per 1,5 ore. Successivamente, le quattro diverse sospensioni sono state separatamente filtrate su setto poroso (4 μ m) direttamente in una falcon da 50 ml contenente etere etilico alla temperatura di 0°C. I quattro peptidi (**65**, **66**, **67** e **68**), liberati dalla resina e deprotetti dai terz-butil esteri ai gruppi carbossilici laterali, sono precipitati in etere e recuperati per centrifugazione; infine, sono stati purificati tramite HPLC preparativa.

MonoAsp²⁻:

¹H-NMR (250 MHz D₂O/CD₃CN): δ (ppm) 8.55 (s, 1H), 8.39 (s, 2NH), 7.74 (s, 1H), 3.41 (t, 1H, J=4.7Hz), 3.34 (s, 2H), 3.20 (d, 2H, J=6.2Hz), 3.08 (t, 4H, J=5.0Hz), 2.92 (t, 4H, J=5.8Hz), 2.84 (tt, 4H, J=6.5Hz, J=12.9Hz).

MS (ESI+, MeOH): m/z 458.2 ([M+H⁺], calcolata protonata 458.4).

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 443 nm]: 36.52 minuti.

DiAsp²⁻:

¹H-NMR (250 MHz D₂O/CD₃CN): δ (ppm) 8.55 (s, 1H), 8.22 (s, 3NH), 7.15 (s, 1H), 3.40 (t, 1H, J=4.7Hz), 3.32 (s, 2H), 3.20 (d, 2H, J=6.2Hz), 3.16 (t, 1H, J=5.0Hz), 2.92 (t, 4H, J=5.8Hz), 2.87 (t, 4H, J=5.4Hz), 2.84 (tt, 4H, J=6.5Hz, J=12.9Hz), 2.79 (d, 2H, J=6.2Hz).

MS (ESI+, MeOH): m/z 573.5 ([M+H⁺], calcolata protonata 573.5).

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 443 nm]: 35.12 minuti.

TriAsp²⁻:

¹H-NMR (250 MHz D₂O/CD₃CN): δ (ppm) 8.43 (s, 1H), 8.26 (s, 4NH), 7.11 (s, 1H), 4.65 (t, 2H, J=5.6Hz), 4.56 (t, 1H, J=6.0Hz), 4.01 (d, 2H, J=0.8Hz), 3.30 (t, 4H, J=5.4Hz), 3.26 (s, 2H), 3.05 (t, 4H, J=7.2Hz), 2.72 (tt, 4H, J=6.4Hz, J=12.2Hz), 2.57 (d, 2H, J=4.9Hz), 1.17 (d, 2H, J=7.4Hz).

MS (ESI+, MeOH): m/z 688.5 ([M+H⁺], calcolata protonata 688.6).

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 443 nm]: 33.56 minuti.

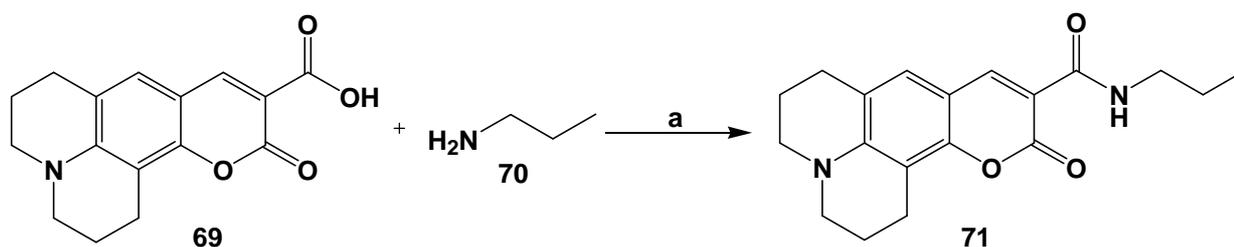
TetrAsp²⁻:

¹H-NMR (250 MHz D₂O/CD₃CN): δ (ppm) 8.44 (s, 1H), 8.17 (s, 5NH), 7.11 (s, 1H), 4.61 (t, 4H, J=8.6Hz), 4.01 (t, 4H, J=0.9Hz), 3.29 (t, 4H, J=4.5Hz), 3.26 (s, 2H), 2.76 (d, 6H, J=4.2Hz), 2.69 (d, 2H, J=3.7Hz), 1.17 (tt, 4H, J=4.0Hz, J=10.6Hz).

MS (ESI+, MeOH): m/z 803.2 ([M+H⁺], calcolata protonata 803.7).

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 443 nm]: 31.54 minuti.

3.4.4.13 - Sintesi di cumarina 343 N-propilammide



Schema 3.24: a) HOBT, HBTU, DIEA, CH₂Cl₂/ACN 1:1, 1 notte, RT, resa 84%.

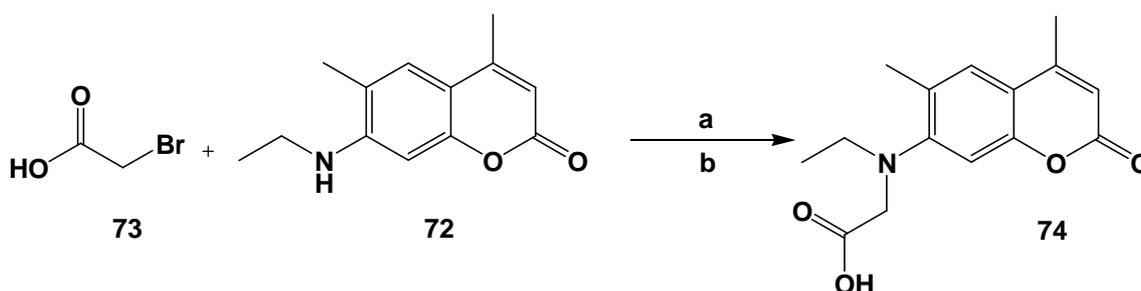
Cumarina 343 (composto **69**, 100 mg, 3.5×10^{-4} moli, 1 eq) è posta in un pallone da 50 ml assieme ad HOBT x 3 H₂O (160 mg, 1.05×10^{-3} moli, 3 eq) e ad HBTU (400 mg, 1.05×10^{-3} moli, 3 eq), dissolvendo il tutto in 10 ml di CH₂Cl₂ e 10 ml di ACN, ottenendo una soluzione gialla torbida. Sono state poi aggiunte propilammia (composto **70**, 37 μ l, 27 mg, 1.05×10^{-3} moli, 3 eq) e DIEA (180 μ l, 136 mg, 1.05×10^{-3} moli, 3 eq), ottenendo l'illimpidimento della miscela di reazione. Questa è stata lasciata procedere per una notte: ottenuta una soluzione rossa, l'andamento della reazione è stato verificato tramite TLC (silice, eluente CH₂Cl₂/etile acetato 1:1, UV). Verificato l'ottenimento del prodotto ed eliminato il solvente per evaporazione, esso è stato purificato tramite cromatografia flash su silice (eluente CH₂Cl₂/etile acetato 1:1), ottenendo come solido rosso cumarina 343 N-propilammide (95.91 mg, composto **71**, resa 84%).

¹H-NMR (250 MHz CDCl₃): δ (ppm) 9.08 (s, 1NH), 8.45 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 4.10 (q, 4H, J=7.1Hz), 3.36 (tq, 2H, J=3.5Hz, J=6.6Hz), 2.80 (dt, 2H, J=6.2Hz, J=12.6Hz), 1.63 (tt, 4H, J=7.2Hz, J=14.3Hz), 1.24 (t, 4H, J=7.1Hz), 0.99 (t, 3H, J=7.4Hz).

¹³C-NMR (300 MHz CDCl₃): δ (ppm) 194.77, 193.70, 183.33, 179.31, 178.28, 157.88, 150.92, 148.27, 138.67, 135.87, 78.48, 71.87, 57.88, 53.44, 51.59, 50.61, 41.60.

MS (ESI+, MeOH): m/z 327.3 ([M+H⁺], calcolata 327.4).

3.4.4.14 - Sintesi di acido (4,6-dimetil-7-etilammino-cumaril) etanoico



Schema 3.25: a) K₂CO₃, KI, acetonitrile anidro, 85 °C, 5 giorni; b) CH₂Cl₂; resa 99%.

Cumarina 2 (4,6-dimetil-7-etilammino cumarina, composto **72**, 40 mg, 1.84×10^{-4} moli, 1 eq) è stata miscelata con acido bromoacetico (composto **73**, 230 mg, 1.66×10^{-3} moli, 9 eq), K_2CO_3 (230 mg, 1.66×10^{-3} moli, 9 eq) e KI (12 mg, 8×10^{-5} moli, 0.4 eq) in 5 ml di ACN anidro. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione alla temperatura di $85^\circ C$, controllandone l'andamento tramite TLC (silice, CH_2Cl_2 /etere etilico 8:2, UV).

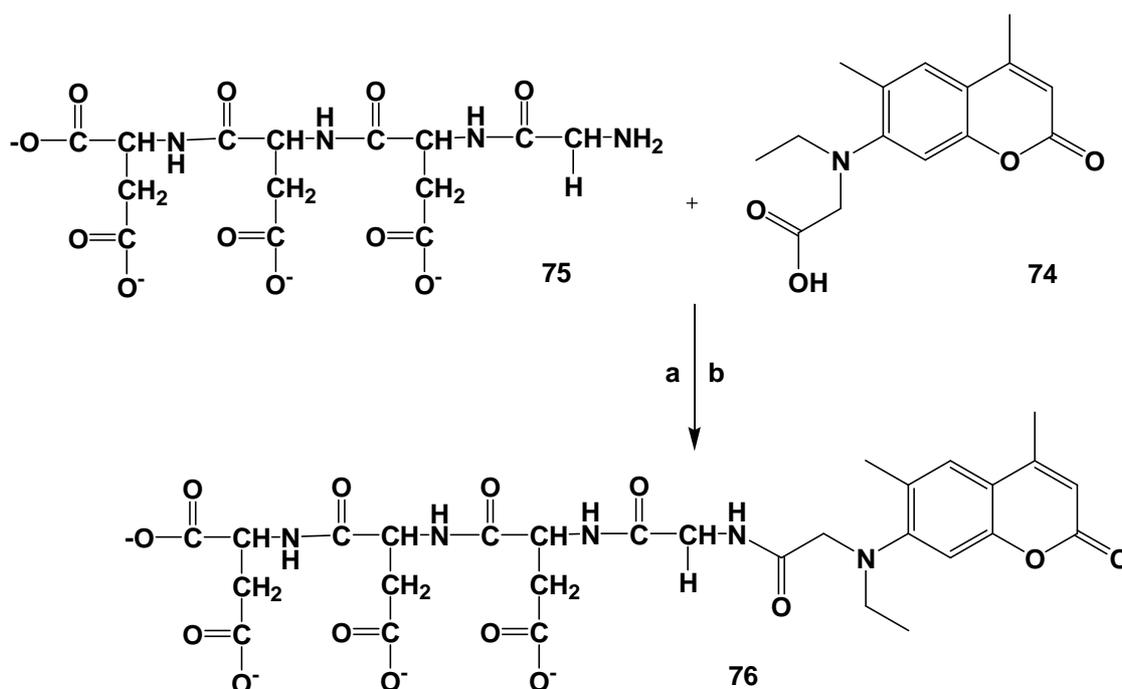
La reazione è stata lasciata procedere per 5 giorni, è stata filtrata per eliminare la fase solida, ed è stata portata a secco eliminando il solvente per evaporazione. Il residuo è stato ripreso con CH_2Cl_2 ed estratto con acqua mQ. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na_2SO_4 e successivamente purificata tramite cromatografia flash su silice (eluenti: CH_2Cl_2 /etere etilico 8:2; dopo uscita della cumarina: CH_2Cl_2 /metanolo 9:1), ottenendo acido (4,6-dimetil-7-etilammino-cumaril) etanoico (composto **74**, 50 mg, 1.82×10^{-4} moli, resa 99 %).

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 11.65 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.85 (q, 2H), 4.44 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 2.02 (t, 3H).

^{13}C -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 172.02, 171.64, 171.48, 171.43, 166.89, 166.85, 166.68, 61.34, 61.31, 60.77, 60.73, 53.43, 25.47, 24.88, 24.84.

MS (ESI+, MeOH): m/z 276.1 ($[M+H]^+$), calcolata 276.3.

3.4.4.15 - Sintesi di TriAsp-Cum 2



Schema 3.26: a) HOBT, HBTU, DIEA, 15 h, RT; b) TFA 95% in H_2O , etere etilico $0^\circ C$.

Peptide TriAsp-Glicina su resina (70 mg, corrispondenti a 30 mg di peptide libero, 0.091 mmoli, 1 eq, composto **75**) è stato posto in reattore in DMF a rigonfiare. Dopo 30 minuti, alla resina è stata aggiunta la soluzione di distacco del gruppo protettore Fmoc (2 x 15 minuti), verificando dopo ulteriore lavaggio l'avvenuta liberazione del gruppo amminico tramite Kaiser test. Contemporaneamente, è stata preparata una soluzione di acido (4,6-dimetil-7-etilammino-cumaril)etanoico (composto **74**, 50 mg, 1.82×10^{-4} moli, 2 eq), HOBT x 3 H₂O (41 mg, 2.73×10^{-4} moli, 3 eq) e HBTU (102 mg, 2.73×10^{-4} moli, 3 eq) in 4 ml di DMF, la quale è stata poi aggiunta alla resina deprotetta assieme a DIEA (46 µl, 2.73×10^{-4} moli, 3 eq). La miscela è stata lasciata in agitazione meccanica per 15 ore, al termine delle quali è stato lavato, verificando poi l'avvenuta reazione (Kaiser test negativo). Il peptide ottenuto (composto **76**) è stato poi staccato dalla resina con 1,5 ml di miscela TFA 95 % in acqua e fatto precipitare in 50 ml di etere etilico a 0 °C, per poi purificarlo tramite HPLC preparativa (gradiente ACN + TFA 0.1% 5-45 % in 40 min in H₂O + TFA 0.1%, lettura a 356 nm). La frazione raccolta all'HPLC è stata portata a secco per evaporazione del solvente, e il residuo è stato ripreso con 1 ml di una miscela 1:1 di acqua e ACN, andando a misurarne l'assorbanza a 356 nm allo spettrofotometro (ϵ_{Cum2} : $20200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Con la legge di Lambert-Beer è stata ricavata la concentrazione del peptide in soluzione, pari a $1.12 \times 10^{-3} \text{ M}$.

¹H-NMR (250 MHz CDCl₃): δ (ppm) ppm 8.26 (s, 4NH), 6.79 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.85 (q, 2H), 4.65 (t, 2H, J=5.6Hz), 4.56 (t, 1H, J=6.0Hz), 4.44 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.31 (d, 2H, J=0.8Hz), 3.26 (s, 2H), 2.16 (d, 4H, J=7.4Hz), 2.02 (t, 3H).

MS (ESI+, MeOH): m/z 678.5 ([M+H⁺], calcolata 678.6).

HPLC [Jupiter Proteo, (ACN+TFA 0.1%) 5-45 %, 40 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 356 nm): 34.76 minuti.

3.4.5 - Valutazione dell'interazione tra AuNPs e oligoanioni

3.4.5.1 - Calcolo del coefficiente di estinzione molare della cumarina 343 N-propilammide

In una cuvetta da fluorescenza sono stati posti 2940 µl di acqua mQ e 60 µl di tampone HEPES 0.5 M a pH 7.0. Il composto **71** è stato dissolto in 6 ml di solvente, composto da 3 ml di metanolo e 3 ml di ACN, ottenendo una soluzione $4.9 \times 10^{-2} \text{ M}$. Da tale soluzione madre ne è stata preparata una diluita 1:10, $4.9 \times 10^{-3} \text{ M}$, e di tale soluzione sono state fatte aggiunte progressive di 4 µl nella cuvetta, misurando ogni volta l'assorbanza a 445 nm.

μl aggiunti	Assorbanza	Concentrazione in cuvetta (M)
0	0.01559	0
4	0.12544	6.53×10^{-6}
8	0.29790	1.31×10^{-5}
12	0.45105	1.96×10^{-5}
16	0.62109	2.61×10^{-5}
20	0.76583	3.27×10^{-5}
24	0.91013	3.92×10^{-5}
28	1.0432	4.57×10^{-5}

Tabella 3.2: calcolo della ϵ dell'ammide della cumarina 343.

Mediando i risultati, è stata calcolato il coefficiente di estinzione molare usando la legge di Lambert-Beer, ottenendo una ϵ pari a $2.3137 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.5.2 - Calcolo della concentrazione dei peptidi fluorescenti

Sono state preparate quattro soluzioni, in acqua mQ e ACN 1:1, all'ipotetica concentrazione di $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, una per ognuno dei peptidi purificati all'HPLC preparativo: da ognuna di esse sono stati prelevati 10 μl , posti in cuvetta da 1 ml assieme a 970 μl di acqua mQ e a 20 μl di tampone HEPES 0.5 M a pH 7,0. Per ogni cuvetta è stato registrato lo spettro di assorbimento e, sfruttando il coefficiente di estinzione molare a 445 nm calcolato per la cumarina 343 N-propilammide, ne è stata calcolata la concentrazione corretta.

Oligoanione	Concentrazione (M)
<i>MonoAsp</i> ⁻² -Cum343	2.27×10^{-4}
<i>DiAsp</i> ⁻³ -Cum343	1.82×10^{-4}
<i>TriAsp</i> ⁻⁴ -Cum343	1.72×10^{-3}
<i>TetrAsp</i> ⁻⁵ -Cum343	1.09×10^{-3}

Tabella 3.3: concentrazione corretta delle soluzioni madre dei peptidi MonoAsp, DiAsp, TriAsp e TetrAsp, tutti con legata cumarina 343 come sonda fluorescente.

Per ognuno dei quattro peptidi è stato anche registrato lo spettro di fluorescenza di eccitazione e quello di emissione ($\lambda_{\text{eccitazione}}$: 445 nm, $\lambda_{\text{emissione}}$: 492 nm).

3.4.5.3 - Titolazione fluorimetrica di AuNPs con gli oligoanioni fluorescenti

Sono state preparate quattro soluzioni di AuNPs-TACN(Zn^{2+}) 5.0×10^{-6} M in tampone HEPES 25 mM a pH 7 in altrettante cuvette da fluorescenza. Da ognuna delle soluzioni madre dei quattro oligoanioni, poi, è stata preparata una soluzione diluita 5×10^{-5} M in acqua mQ e ACN 1:1. Per ogni oligoanione è stato seguito il medesimo procedimento: in cuvetta sono state fatte aggiunte progressive, da 4 μl ciascuna, della soluzione 5.0×10^{-5} M di oligoanione fluorescente, andando a eccitare dopo ogni aggiunta alla λ di 445 nm, verificando l'emissione a 492 nm alla temperatura di 40°C. i valori ottenuti sono stati corretti sulla base della diluizione effettuata con le aggiunte. Ponendo i valori di concentrazione dei peptidi in soluzione dopo ogni aggiunta in un grafico rispetto all'intensità della fluorescenza corretta, sono state ottenute delle curve di titolazione delle NPs. Da esse è stato possibile ricavare, per ognuno dei quattro oligoanioni, la concentrazione alla quale saturano la superficie cationica delle nanoparticelle.

Peptide	Cariche	Concentrazione Saturazione NPs (M)
MonoAsp-Cum343 (68)	2 ⁻	6.0×10^{-7}
DiAsp-Cum343 (69)	3 ⁻	2.0×10^{-6}
TriAsp-Cum343 (70)	4 ⁻	1.0×10^{-6}
TetrAsp-Cum343 (71)	5 ⁻	1.0×10^{-6}

Tabella 3.4: concentrazione (molarità) di saturazione delle AuNPs-TACN(Zn^{2+}) con i diversi peptidi MonoAsp²⁻, DiAsp³⁻, TriAsp⁴⁻ e TetrAsp⁵⁻ (-Cum343).

3.4.5.4 - Contro-titolazione con ATP di AuNPs saturate di oligoanioni fluorescenti

In cuvetta da fluorescenza è stata preparata una soluzione, in tampone HEPES 25 mM pH 7.0, contenente AuNPs-TACN(Zn^{2+}) [5.0×10^{-6} M] e TriAsp-Cum343 [1.0×10^{-6} M]. Contemporaneamente è stata preparata una soluzione in acqua mQ di ATP 7.5×10^{-5} M, con la quale sono state effettuate progressive aggiunte da 4 μl alla soluzione in cuvetta, andando ad eccitare, dopo ogni aggiunta, con luce di λ 445 nm, registrando l'emissione a 492 nm a 37°C.

3.4.6 - ANALISI AuNPs tramite FRET

3.4.6.1 - Titolazione di AuNPs-TACN(Zn²⁺) con TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343

Per diluizione 1:10 dalla madre sono state preparate due soluzioni, rispettivamente 1.12×10^{-4} M di TriAsp-Cum 2 (composto **76**) e 1.72×10^{-4} M di TriAsp-Cum 343 (composto **67**). Contemporaneamente sono state preparate, in cuvetta da fluorescenza, due identiche soluzioni 1×10^{-5} M di AuNPs-TACN(Zn²⁺), ponendo per ognuna 61 μ L di soluzione madre 490 μ M di nanoparticelle in 2939 μ L di tampone HEPES 25 mM a pH 7.0. Alla prima di tali soluzioni sono state fatte aggiunte di **76** secondo l'ordine [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 5] [8 μ L x 5], per poi irradiarla con luce di $\lambda = 353$ nm registrando, per ogni aggiunta, l'emissione di fluorescenza a 450 nm [temperatura 37°C, finestre strumentali eccitazione 2,5 - emissione 10]. Alla seconda soluzione di NPs sono state fatte aggiunte di **67** secondo l'ordine [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 5] [8 μ L x 5], irradiandola con luce di $\lambda = 445$ nm registrando, per ogni aggiunta, l'emissione di fluorescenza a 492 nm [temperatura 37°C, finestre strumentali eccitazione 2,5 - emissione 10]. La concentrazione di saturazione del monostrato calcolata è risultata essere pari a 1.6×10^{-6} M per **67** e a 1.1×10^{-6} M per **76**.

3.4.6.2 - Titolazione di AuNPs-NH₄⁺ con TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343

Sono state preparate, in cuvetta da fluorescenza, due identiche soluzioni 1.0×10^{-5} M di AuNPs-NH₄⁺, ponendo per ognuna 44 μ L di soluzione madre 680 μ M di nanoparticelle in 2956 μ L di tampone HEPES 25 mM a pH 7.0. Alla prima di tali soluzioni sono state fatte aggiunte di **76** secondo l'ordine [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 5] [8 μ L x 5], per poi irradiarla con luce di $\lambda = 353$ nm registrando, per ogni aggiunta, l'emissione di fluorescenza a 450 nm [temperatura 37°C, finestre strumentali eccitazione 2,5 - emissione 10]. Alla seconda soluzione di NPs sono state fatte aggiunte di **67** secondo l'ordine [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 5] [8 μ L x 5], irradiandola con luce di $\lambda = 445$ nm registrando, per ogni aggiunta, l'emissione di fluorescenza a 492 nm [temperatura 37°C, finestre strumentali eccitazione 2,5 - emissione 10]. La concentrazione di saturazione del monostrato calcolata è risultata essere pari a 6.5×10^{-7} M per **67** e a 5.5×10^{-7} M per **76**.

3.4.6.3 - Fluorescenza di TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343 in soluzione

In cuvette da fluorescenza sono state preparate tre soluzioni, contenenti rispettivamente TriAsp-Cum2 1.0×10^{-6} M (**76**, 2.69 μ L da soluzione madre 1.12×10^{-3} M),

TriAsp-Cum343 1.0×10^{-6} M (**67**, 1.74 μ l da soluzione madre 1.72×10^{-3} M) e la miscela dei due (entrambi 1.0×10^{-6} M), tutte in HEPES 10 mM pH 7.0, volume totale 3000 μ l.

Le tre soluzioni sono state separatamente irradiate con luce UV alla lunghezza d'onda di 353 nm, alla temperatura di 40°C, registrando gli spettri di emissione a 450 nm (**76**) e a 492 nm (**67**).

3.4.6.4 - Fluorescenza di TriAsp-Cum 2 e TriAsp-Cum 343 su AuNPs-TACN(Zn²⁺)

In cuvette da fluorescenza sono state preparate tre soluzioni, contenenti tutte AuNPs-TACN(Zn²⁺) 5.0×10^{-6} M (30.6 μ l da soluzione madre 4.9×10^{-4} M) e, rispettivamente, *TriAsp-Cum2* 1.0×10^{-6} M (2.69 μ l da soluzione madre 1.12×10^{-3} M), *TriAsp-Cum343* 1.0×10^{-6} M (1.74 μ l da soluzione madre 1.72×10^{-3} M) e la miscela dei due (entrambi 5×10^{-7} M). Tutte le soluzioni sono state preparate in HEPES 10 mM pH 7.0, volume totale 3000 μ l, e sono state poste a 40°C per poi essere irradiate con luce di lunghezza d'onda 353 nm, registrando gli spettri di emissione a 450 nm (**76**) e a 492 nm (**67**).

3.4.6.5 - FRET su AuNPs-TACN(Zn²⁺) con diversi rapporti di fluorescenti

Sono state preparate undici cuvette, ognuna contenente una soluzione di AuNPs-TACN(Zn²⁺) 5.0×10^{-6} M (30.6 μ l da soluzione madre 4.9×10^{-4} M) e una concentrazione totale di **76** e di **67** costante, pari a 1.0×10^{-6} M, in HEPES 10 mM a pH 7 (volume totale 3000 μ l). In ogni cuvetta è stato variato il rapporto tra i due composti: dal rapporto **76:67** 1:0 nella prima cuvetta (269 μ l di soluzione 1.12×10^{-1} M di **76** in 2731 μ l di tampone), calando di volta in volta la quantità del 10% con aumento conseguente di **67** dello stesso ammontare, fino al rapporto **76:67** 0:1 nell'undicesima cuvetta (174 μ l da soluzione 1.72×10^{-1} M di **67** in 2826 μ l di tampone). Ogni cuvetta è stata posta al fluorimetro a 40°C, dove è stata irradiata con luce eccitante di λ 353 nm, registrandone lo spettro di emissione.

3.4.6.6 - FRET su AuNPs-TACN(Zn²⁺) in eccesso di ATP

Sono state preparate undici cuvette, in tampone HEPES 10 mM pH 7.0 (volume totale 3000 μ l), ognuna contenente una soluzione di AuNPs-TACN(Zn²⁺) 5×10^{-6} M (30.6 μ l da soluzione madre 4.9×10^{-4} M) e una concentrazione totale di **76** e di **67** costante, pari a 1.0×10^{-6} M. In ognuna di esse è stato posto ATP 3.3×10^{-3} M (1100 μ l di soluzione 1 M). In ogni cuvetta è stato variato il rapporto tra i due fluorofori, partendo dal rapporto **76:67** 1:0 nella prima cuvetta (269 μ l di soluzione 1.12×10^{-1} M di **76** in 2731 μ l di tampone) calando di volta in volta la quantità del 10% con aumento conseguente di **67**

dello stesso ammontare, fino al rapporto **76:67** 0:1 nell'undicesima cuvetta (174 μl da soluzione 1.72×10^{-1} M di **67** in 2826 μl di tampone). Ogni cuvetta è stata posta al fluorimetro a 40°C , dove è stata irradiata con luce eccitante di λ 353 nm, registrandone lo spettro di emissione.

3.4.6.7 - FRET su AuNPs-NH₄⁺

Sono state preparate undici soluzioni in cuvette da fluorescenza, contenenti ognuna una soluzione di AuNPs-NH₄⁺ 1.0×10^{-5} M (44 μl di soluzione madre 6.8×10^{-4} M) in tampone HEPES 10 mM pH 7.0 (volume totale 3000 μl), e una quantità totale costante di **67** e di **76** di concentrazione pari a 5.0×10^{-7} M. In ogni cuvetta è stato variato il rapporto tra i due fluorofori, partendo dal rapporto **76:67** 1:0 nella prima cuvetta (135 μl di soluzione 1.12×10^{-1} M di **76** in 2865 μl di tampone), calando di volta in volta la quantità del 10% con aumento conseguente di **67** dello stesso ammontare, fino al rapporto **76:67** 0:1 nell'undicesima cuvetta (87 μl da soluzione 1.72×10^{-1} M di **67** in 2913 μl di tampone). Ogni cuvetta è stata posta al fluorimetro a 37°C , dove è stata irradiata con luce eccitante di λ 353 nm e 450 nm, registrandone lo spettro di emissione a 492 nm [finestre ecc 10 - emiss 20]. Contemporaneamente sono state preparate altre undici soluzioni, sempre in cuvette da fluorescenza, in ognuna delle quali sono stati posti gli stessi peptidi fluorescenti nelle medesime proporzioni, ma in completa assenza di nanoparticelle. Ogni soluzione è stata irradiata con luce UV di λ 353 nm e 450 nm a 37°C , registrando la luce emessa a 492 nm.

4 - INTERAZIONE tra la PROTEINA SCCA e un COMPLESSO MULTIVALENTE FORMATO da NANOPARTICELLE d'ORO e preS1

4.1 - INTRODUZIONE

L'obiettivo di questo progetto è quello di ottenere un sistema autoassemblato il quale sia in grado di veicolare il frammento (21-47) del peptide preS1 a masse cellulari, a scopo diagnostico. Esso deve poter discriminare tra cellule cancerose e non, legandosi preferenzialmente alle prime, cioè dove è sovraespressa la proteina di membrana SCCA¹⁴⁶. In base agli esperimenti effettuati precedentemente, è stato deciso che per ottenere un nanosistema adatto allo scopo fosse necessario utilizzare nanoparticelle d'oro post-funzionalizzabili con i peptidi da utilizzare. A questo scopo è risultato promettente l'utilizzo di nanoparticelle ricoperte con un monostrato formato da tioli carichi positivamente, al quale ancorare tramite interazioni elettrostatiche molecole dotate di una porzione anionica. Da tali esperimenti preliminari è emersa la validità della post-funzionalizzazione tramite formazione di legami ionici, che permette di assemblare copie multiple del medesimo o di differenti tipi sulla superficie delle nanoparticelle. A questo punto è stato possibile procedere con le prove successive, nelle quali è stata verificata la capacità del frammento (21-47) del peptide preS1 di legarsi alle nanoparticelle. Questo tramite le interazioni elettrostatiche instaurate tra il monostrato e le cariche presenti nella sua catena amminoacidica, oppure grazie all'inserimento, al termine della sequenza, dell'opportuna ancora anionica.

4.2 - RISULTATI e DISCUSSIONE

4.2.1 - SINTESI del PEPTIDE preS1 (21-47)

Il peptide preS1(21-47) è una molecola che presenta vari residui di acido aspartico e glutammico, con catene laterali anioniche, ma essi sono disposti in punti distanziati della catena. Oltre quindi a non garantire un buon legame con il monostrato cationico, a causa di tale distanza tra le cariche negative, c'è anche il rischio che interagendo con le nanoparticelle tali amminoacidi non siano più liberi di formare un complesso con la proteina SCCA.

Per aggirare questi problemi è stato deciso di legare al peptide un'opportuna ancora anionica, per poi valutare come questa influenzasse il legame con il monostrato cationico rispetto al peptide da solo. Infine è stato valutato, usando tecniche fluorimetriche, DLS e analisi della banda plasmonica superficiale, come il peptide, organizzato attorno alle nanoparticelle, legasse la proteina SCCA rispetto al peptide libero in soluzione.

4.2.1.1 - Scelta dell'ancora anionica

Per prima cosa, è stata scelta l'ancora anionica da legare al peptide. Dalle prove precedenti è stato visto come le molecole di acido triaspartico legassero molto efficacemente i monostrati cationici contenenti gruppi ammoniacali o TACN·Zn(II). Altrettanto bene è stato visto come gli anioni fosforici fossero in grado di spiazzare quelli carbossilici, legando il monostrato più fortemente. A questo scopo è stato inizialmente deciso di utilizzare tirosina fosforilata a livello dell'ossidrile fenolico: ogni molecola di questo tipo presenta due cariche negative a livello del fosfato, molto ravvicinate e quindi, in teoria, estremamente efficaci nel legame con i cationi. I fosfati, infatti, dovrebbero legarsi più fortemente al monostrato rispetto ai carbossilati. Questo permetterebbe di ottenere un'interazione più forte, ma anche la possibilità di ignorare le interazioni dovute ai carbossilati presenti nella catena peptidica.

È stata quindi verificata la capacità di legame di ancore anioniche formate da una o due molecole di tirosina fosforilata, con rispettivamente due (**78**) e quattro (**79**) cariche negative appaiate (grafico 4.1). Come confronto è stato usato l'acido triaspartico (**77**), e come sonda fluorescente da usare come indicatore è stato legato, a tutte e tre le specie, una molecola di triptofano. Per sintetizzare **78** e **79** è stata usata la sintesi peptidica in fase solida, ma al posto della resina Wang (usata per **77**) è stata usata resina Rink-ammide; ad essa la catena in accrescimento si lega tramite legame ammidico invece che con legame estereo. Usando i soliti reagenti per la formazione del legame peptidico (HOBT e DIEA, con HBTU per il TriAsp e PyBop per Mono e Di-Tyr) in largo eccesso rispetto alla capacità teorica di caricamento della resina stessa (5:1), sono stati sintetizzati i tre peptidi, controllandone l'accrescimento tramite Kaiser test. A tutte e tre le catene, come amminoacido finale, è stato legato triptofano, poi acetilato all'estremità N-terminale. I tre peptidi sono infine stati staccati dalla resina con la miscela di sblocco di TFA 95% in acqua, per poi essere purificati tramite HPLC

preparativa, ottenendo TriAsp⁽⁴⁻⁾-Triptofano (composto **77**), Tyr(OPO₃⁽²⁻⁾)-Triptofano (composto **78**) e DiTyr(OPO₃⁽⁴⁻⁾)-Triptofano (composto **79**).

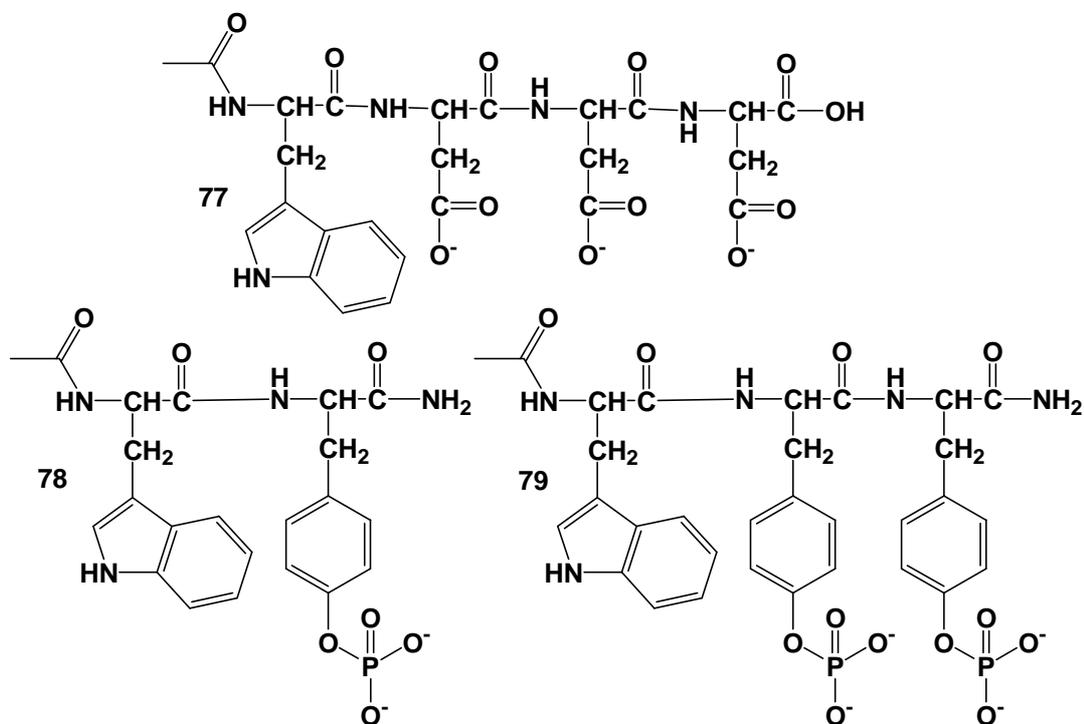


Grafico 4.1

Con tutte e tre le molecole si è proceduto alla titolazione di nanoparticelle cationiche TACN·Zn(II) 5.0×10^{-6} M, eccitando il triptofano con luce di λ 280 nm e registrando la sua fluorescenza a 360 nm. Sfruttando lo smorzamento operato dall'oro metallico su tale emissione, è stato possibile valutare le diverse concentrazioni di saturazione. Questo ha dato un'indicazione sulla forza di legame delle diverse ancora anioniche (figura 4.1).

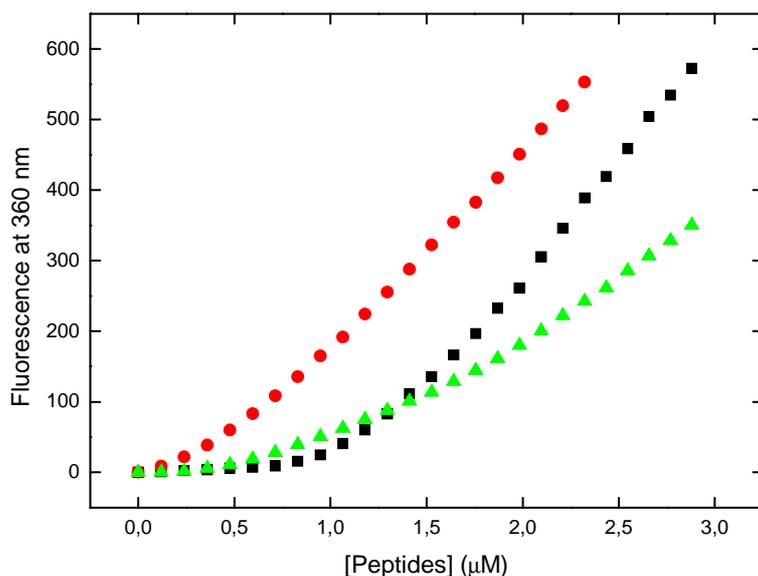


Figura 4.1: titolazione di AuNPs-TACN·Zn(II) 5.0×10^{-6} M con TriAsp⁴⁻-Tryptofano (quadrati neri), Tyr²⁻-Tryptofano (pallini rossi) e DiTyr⁴⁻-Tryptofano (triangoli verdi). [HEPES] = 10mM, pH 7.0, 40°C.

Guardando il grafico ottenuto, si può osservare che la fluorescenza di Tyr²⁻ e di DiTyr⁴⁻ è cresciuta con una pendenza minore rispetto a quella di TriAsp⁴⁻. Questo ha indicato che, malgrado Tyr²⁻ e DiTyr⁴⁻ possiedano cariche localizzate su gruppi fosfato, TriAsp⁴⁻ ha legato AuNPs-TACN·Zn(II) con affinità maggiore. Malgrado per TriAsp⁴⁻ e DiTyr⁴⁻ sia stata calcolata la medesima concentrazione di saturazione del monostrato, è stato quindi deciso di funzionalizzare il peptide preS1(21-47) con TriAsp⁴⁻.

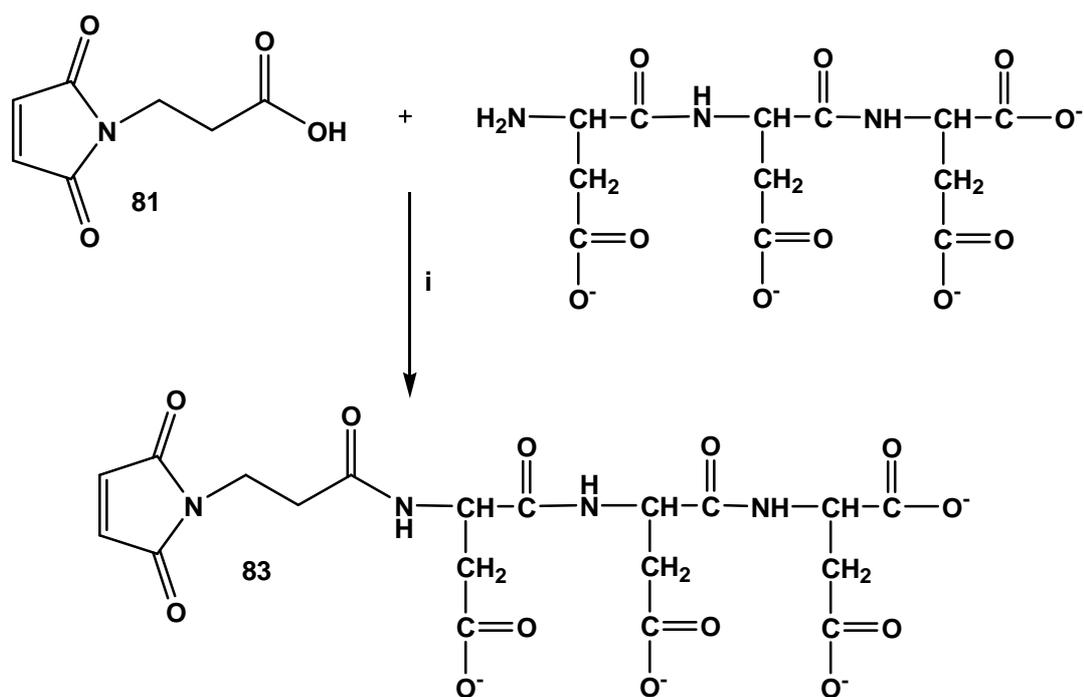
4.2.1.2 - Sintesi di Mal-Cys-preS1 e di TriAsp-Mal-Cys-preS1

Una volta scelta l'ancora anionica da utilizzare, è stato necessario preparare il peptide preS1 (21-47). Per via commerciale ci si è procurati il peptide preS1-Cys (grafico 4.3).



Grafico 4.2

Innanzitutto acido triaspartico, ancora legato alla resina, è stato fatto reagire con maleoil-β-alanina, con condensazione dei due composti (schema 4.1).



Schema 4.1: sintesi di TriAsp-maleoil-Balanina (**83**); i) HOBt, HBTU, DIEA.

Il composto **83** ottenuto è stato staccato dalla resina e purificato: esso si presta ad attacchi nucleofili da parte dei tioli a livello dell'anello maleimidico, con formazione di legami covalenti stabili.

Il composto appena ottenuto è stato fatto reagire con il peptide preS₁-Cys, in una soluzione al 50% di acetonitrile e ammonio cloruro 0.2 M a pH 7.0. La reazione ha richiesto un ampio eccesso di **83** di circa sei volte rispetto al peptide, e ha impiegato due giorni per andare a compimento. La presenza di trifenilfosfina in soluzione, allo scopo di impedire la formazione di disolfuri, è stata evitata; questo dopo aver notato che, ponendola nella miscela di reazione (il cui andamento era monitorato tramite HPLC), essa ne era rallentata notevolmente. È stato così ottenuto il composto **84**; analogamente è stato ottenuto il composto **83**, facendo reagire il peptide preS₁-Cys con maleoil-β-alanina (grafico 4.3).

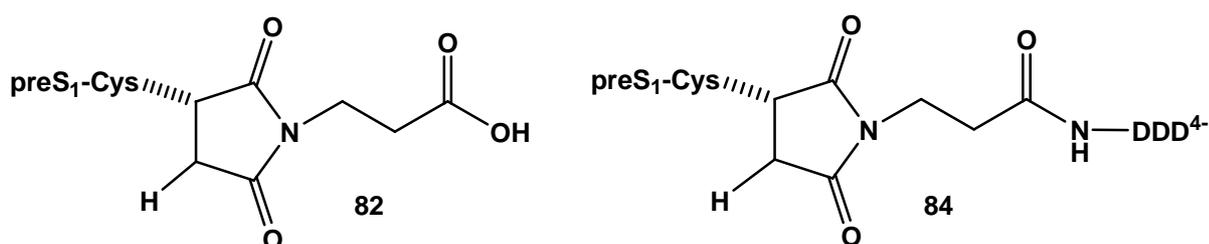


Grafico 4.3

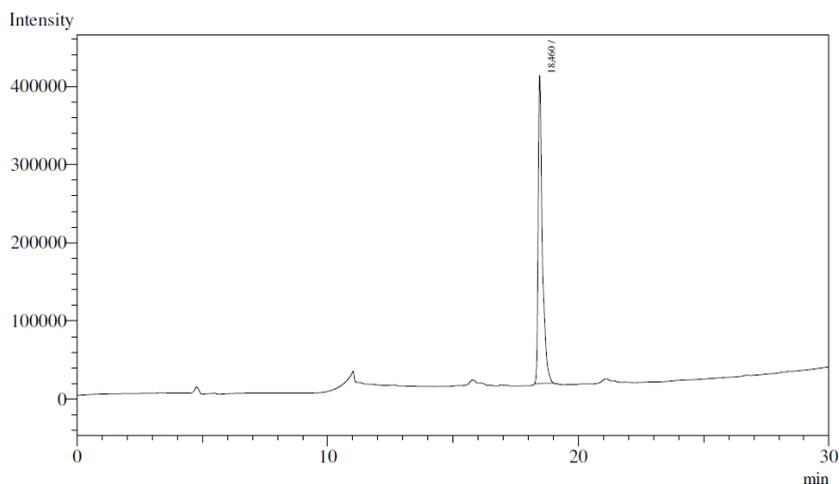


Figura 4.2: spettro HPLC di preS1-Cys-Mal-TriAsp [ACN + TFA 0.1% 10-90% in 30 min, in H₂O + TFA 0.1%, λ = 280 nm, 18.46 minuti].

4.2.2 - VALUTAZIONE dell'INTERAZIONE tra PEPTIDI 82-84 e MONOSTRATO CATIONICO

Prima di procedere con i test miranti alla verifica di quanto le nanoparticelle potessero migliorare l'interazione di preS1 con la proteina SCCA, è stato necessario verificare quale fosse la capacità del peptide stesso nel legare il monostrato cationico. Per fare tale valutazione sono stati usati metodi di titolazione fluorimetrica e di inibizione catalitica.

4.2.2.1 - Titolazione diretta della capacità di legame del monostrato cationico

Il primo metodo utilizzato per verificare la capacità di preS1 di legare il monostrato cationico è stato tramite la titolazione diretta. Poiché nella catena peptidica era presente una molecola di triptofano, è stata sfruttata la sua fluorescenza come indicatrice del legame con le nanoparticelle. Gli esperimenti sono stati effettuati su AuNPs-TACN·Zn(II) [1.0×10^{-5} M], e sono stati eseguiti sia con preS1-Cys-Mal-TriAsp (**84**) che con preS1-Cys-Mal (**82**). Le misurazioni di fluorescenza sono state effettuate a 356 nm, eccitando il triptofano a 280 nm (figura 4.3).

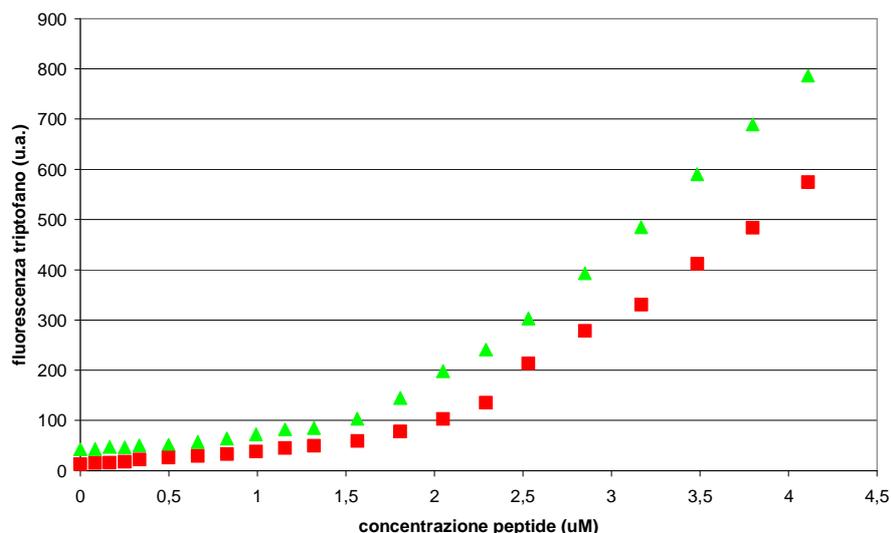


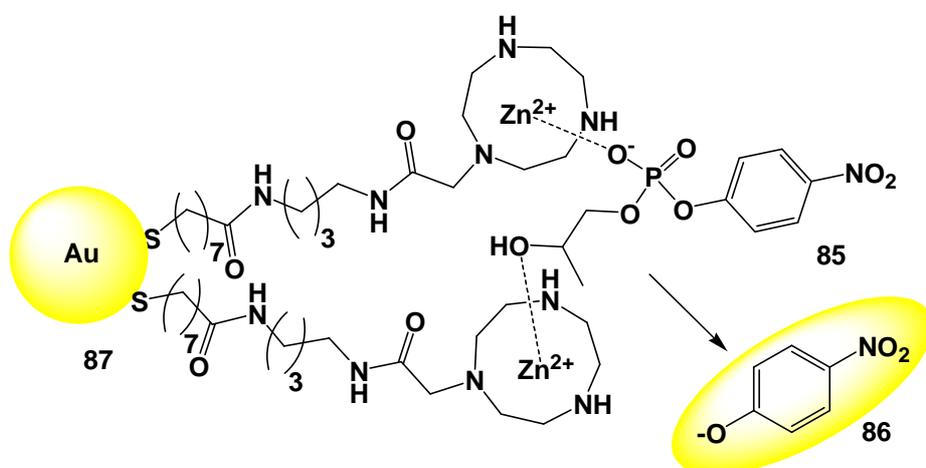
Figura 4.3: titolazione di AuNPs-TACN·Zn(II) 1.0×10^{-5} M con preS1-Cys-Mal (quadrati rossi) e con preS1-Cys-Mal-TriAsp (triangoli verdi); [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 37 °C, finestre 10:20.

Incrocando le rette tangenti alla parte piana e alla parte crescente delle due curve, è stata calcolata la concentrazione alla quale i due peptidi hanno saturato il monostrato cationico: 1.9×10^{-6} M per preS1-Cys-Mal, 1.8×10^{-6} M per preS1-Cys-Mal-TriAsp. Questo ha mostrato che preS1 è in grado di interagire con la superficie cationica grazie alle cariche negative presenti a livello della sua catena amminoacidica. Non ha detto praticamente nulla sul contributo dato dall'ancora anionica all'instaurazione del legame col monostrato. Questo potrebbe essere stato dovuto al fatto che tale contributo fosse raelmente risibile, oppure a una carenza nella sensibilità del sistema di rilevazione. I dati non sono stati quindi sufficienti per avere un quadro esauriente delle capacità di legame del peptide, per cui sono stati effettuati ulteriori studi sfruttando metodi di rilevazione più sensibili.

4.2.2.2 - Valutazione indiretta di legame - inibizione della capacità idrolitica del complesso TACN·Zn(II)

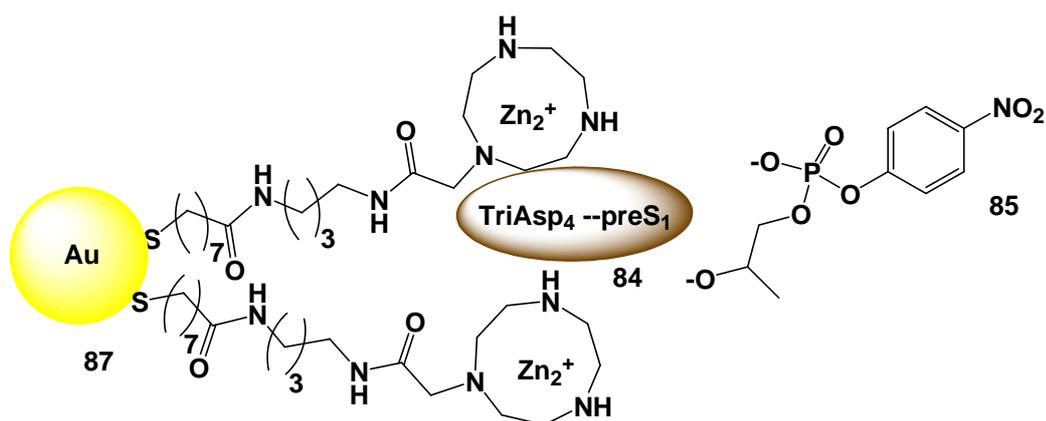
L'affinità tra peptidi e AuNPs è stata valutata anche con un altro tipo di esperimento. È stata sfruttata la capacità del sistema TACN·Zn(II) di agire da catalizzatore dell'idrolisi di fosfodiesteriesteri quando tali gruppi si trovano vicini tra loro sulla superficie delle nanoparticelle. È nota ad esempio la loro capacità di catalizzare l'idrolisi del 2-idrossipropil-p-nitrofenil-fosfato (HPNP, composto **85**), molecola utilizzata in molti studi come analogo dell'RNA; da tale reazione si libera p-nitro-fenato (composto **86**),

molecola dall'intensa colorazione gialla con un massimo di assorbimento a 400 nm (schema 4.2).



Schema 4.2: idrolisi del 2-idrossipropil-p-nitrofenil-fosfato **85** ad opera di complessi cooperativi TACN·Zn(II), con liberazione di p-nitrofenato **86**.

In presenza di molecole come preS1-Cys-Mal o preS1-Cys-Mal-TriAsp vi sarebbe occupazione dei gruppi catalitici per instaurazione dei legami ionici. In questo modo si ridurrebbe il numero di TACN·Zn(II) liberi e, di conseguenza, vi sarebbero meno molecole idrolizzate e cromofori liberati in soluzione. Con la saturazione del monostrato l'attività catalitica cesserebbe del tutto (schema 4.3).



Schema 4.3: legame dei complessi TACN·Zn(II) col peptide preS1-Cys-Mal-TriAsp **84** e conseguente inibizione dell'idrolisi del 2-idrossipropil-p-nitrofenil-fosfato **85**.

Sono state esplorate svariate concentrazioni di preS1-Cys-Mal-TriAsp e di preS1-Cys-Mal, in presenza di AuNPs-TACN·Zn(II) e di HPNP. Nel tempo è stata registrata la variazione

di assorbanza a 400 n, dal quale sono state ricavate le costanti di velocità iniziali di ogni reazione (figura 4.4).

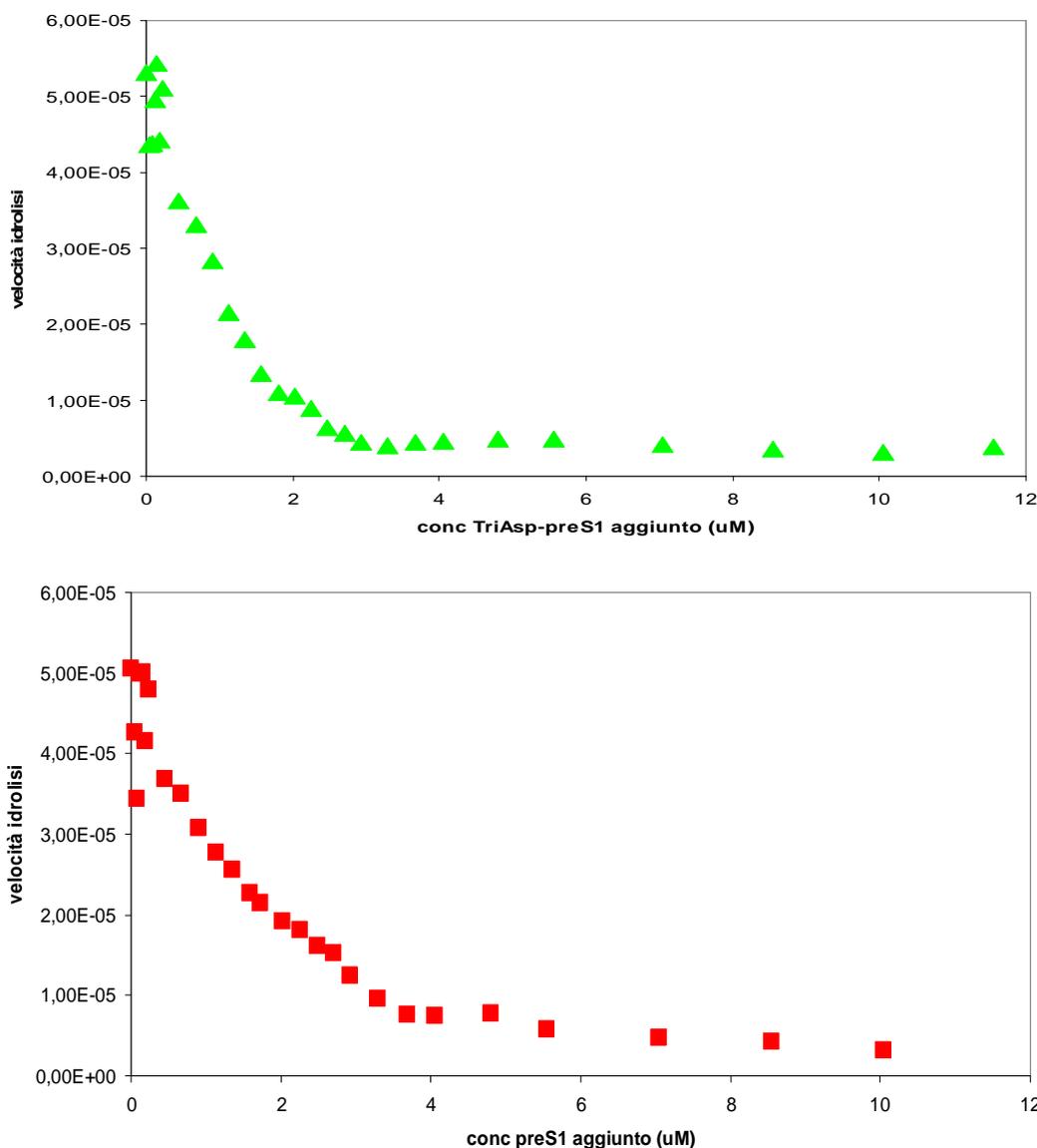


Figura 4.4: inibizione della capacità idrolitica di AuNPs-TACN·Zn(II) [1.0×10^{-5} M] su HPNP [1.0×10^{-3} M] ad opera di quantità crescenti di preS1-Cys-Mal-TriAsp (sopra, triangoli verdi) e di preS1-Cys-Mal (sotto, quadrati rossi); tampone HEPES 25 mM, pH 7.0, 37°C.

La quantità di peptide necessaria per inibire il 50% dell'idrolisi di HPNP è stata pari a 1.1×10^{-6} M di preS1-Cys-Mal-TriAsp e a 1.9×10^{-6} M di preS1-Cys-Mal. Quindi preS1-Cys-Mal-TriAsp ha legato più fortemente le nanoparticelle rispetto a preS1-Cys-Mal, dando un'inibizione maggiore. Calcolando poi il punto di intersezione tra le rette tangenti alla parte decrescente e alla parte piana della curva è stata calcolata la concentrazione alla quale vi è stata inibizione completa dell'idrolisi: 1.9×10^{-6} M di preS1-Cys-Mal-TriAsp e

3.1×10^{-6} M di preS1-Cys-Mal. Questi valori, simili a quelli calcolati tramite la titolazione del monostrato, hanno confermato che l'inibizione avviene tramite il legame superficiale tra il peptide e i gruppi TACN·Zn(II). Questo metodo ha quindi mostrato che la presenza dell'ancora anionica ha lievemente migliorato tale interazione.

4.2.2.3 - Valutazione indiretta di legame per spiazzamento di F-ATP dal monostrato

Le prove effettuate hanno mostrato che il peptide preS1, di per sé, è perfettamente in grado di legare una superficie cationica come il monostrato delle nanoparticelle. L'eventuale perdita della sua funzione di riconoscimento in seguito a tale interazione sarà valutata in seguito. La presenza dell'ancora anionica ha tuttavia dato un miglioramento nell'interazione con le nanoparticelle. È stato perciò deciso di verificare per una terza via quale fosse il contributo dato dall'oligoanione triaspartico all'interazione peptide-NPs. La tecnica usata si è basata su studi di spiazzamento, nei quali una sonda fluorescente (F-ATP, composto **89**, grafico 4.4) è spiazzata da una superficie a causa dell'interazione competitiva di un analita.

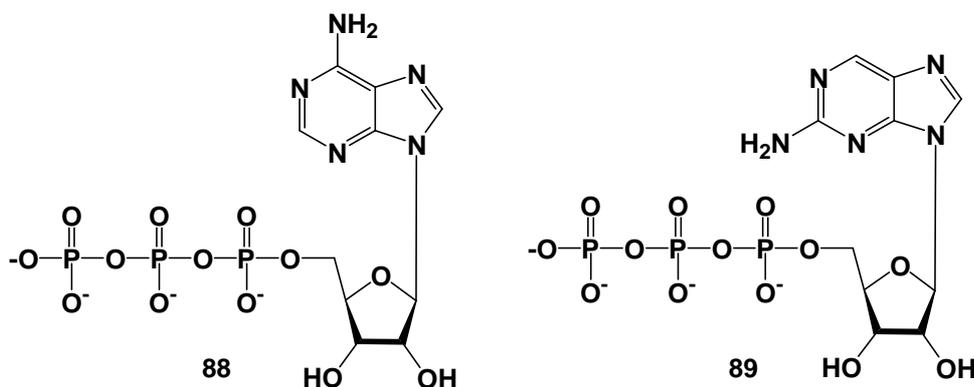
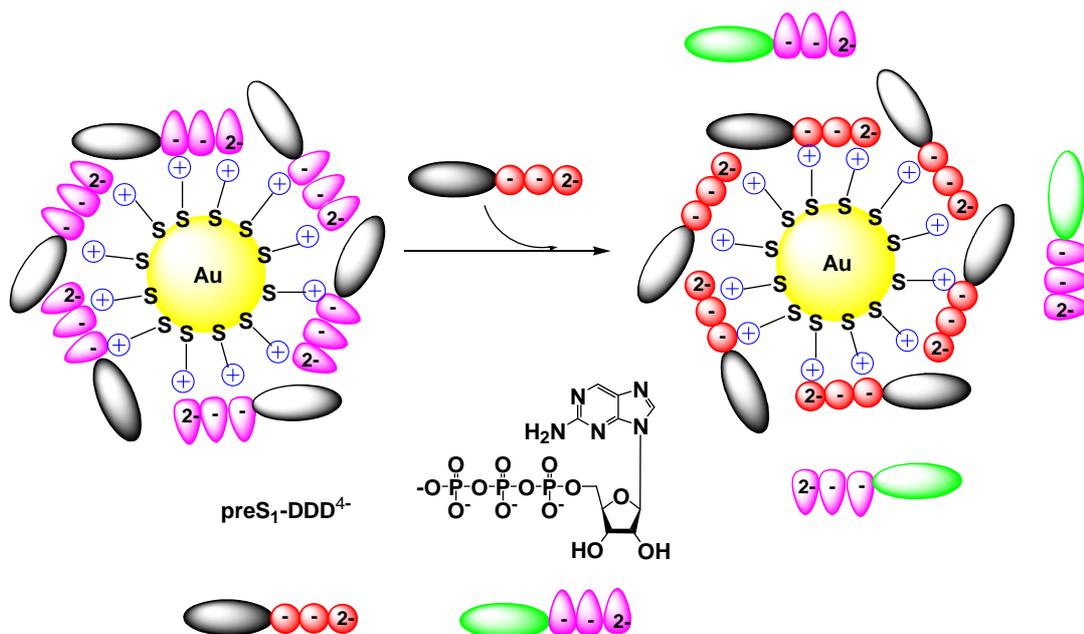


Grafico 4.4

Questa molecola era in grado di legare molto fortemente i cationi allo stesso modo del suo analogo ATP non fluorescente (composto **88**, grafico 4.4). Saturando il monostrato nanoparticellare con tale F-ATP, nessuna fluorescenza sarebbe stata rilevata; con l'aggiunta in soluzione di uno dei due peptidi, questo avrebbe spiazzato l'F-ATP in quantità tanto maggiore quanto sarebbe stata l'affinità del peptide in questione con le AuNPs (schema 4.4).



Schema 4.4: spiazzamento dell’F-ATP operata da preS1-Cys-Mal-TriAsp; la sonda inizia a emettere fluorescenza (da grigia a verde) una volta staccata dalla superficie nanoparticellare.

La correlazione tra quantità di peptide aggiunto e fluorescenza rilevata permette di determinare la quantità di F-ATP spiazzato, e dal confronto tra i due peptidi sarebbe emerso in modo sufficientemente accurato il contributo dell’ancora anionica all’interazione.

Prima di procedere è stato necessario “tarare” il sistema, determinando la concentrazione di F-ATP necessaria per saturare la superficie delle nanoparticelle. Una soluzione di AuNPs-TACN·Zn(II) è stata quindi titolata con F-ATP ($\lambda_{\text{eccitante}}$ 305 nm, $\lambda_{\text{emissione}}$ 370 nm) (figura 4.5).

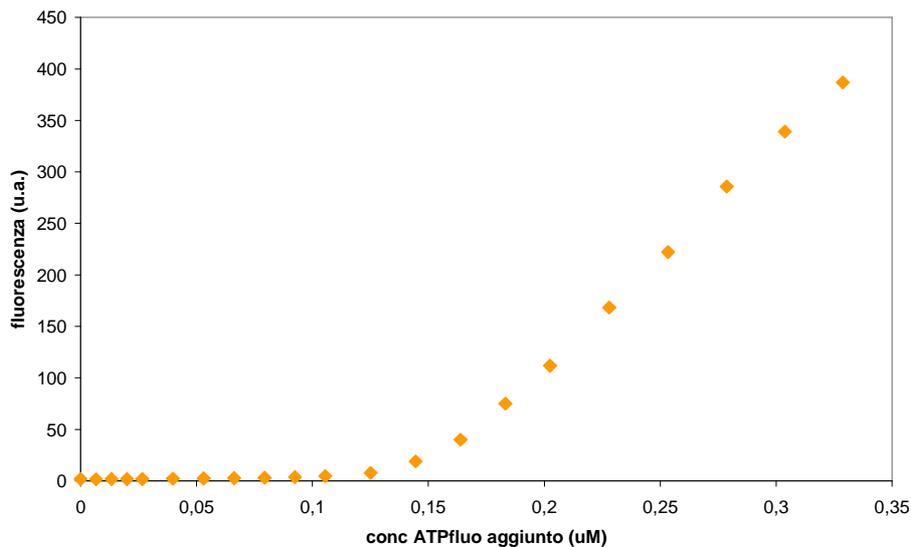


Figura 4.5: titolazione di AuNPs-TACN·Zn(II) [1.0×10^{-6} M] con F-ATP [1.0×10^{-5} M]; [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25 °C; $\lambda_{\text{eccitazione}}$ 305 nm, $\lambda_{\text{emissione}}$ 370 nm, finestre 10:10.

È stata calcolata così una concentrazione di saturazione pari a 1.3×10^{-7} M. A questo punto è stato possibile procedere con gli esperimenti di spiazzamento, su AuNPs-TACN·Zn(II) saturate con F-ATP. Per verificare che il sistema funzionasse, ne sono stati effettuati due in parallelo usando preS1-Cys-Mal-TriAsp e, come controllo, ATP (figura 4.6).

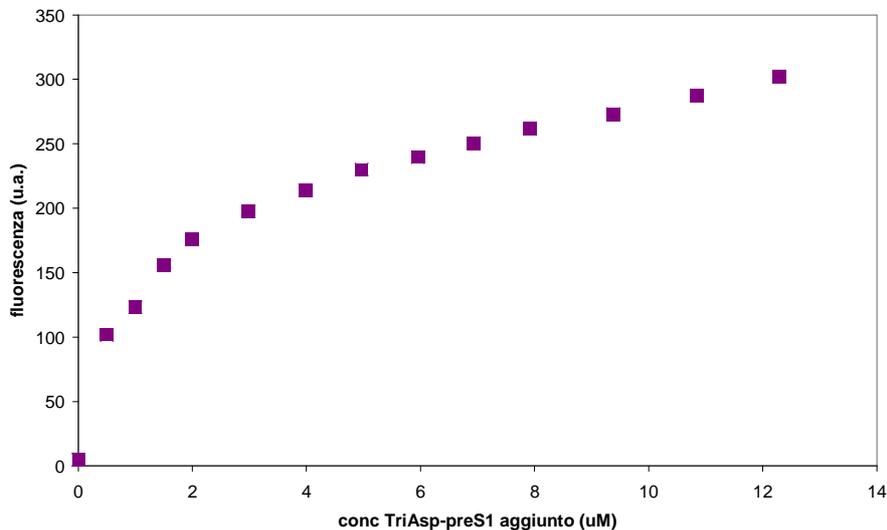
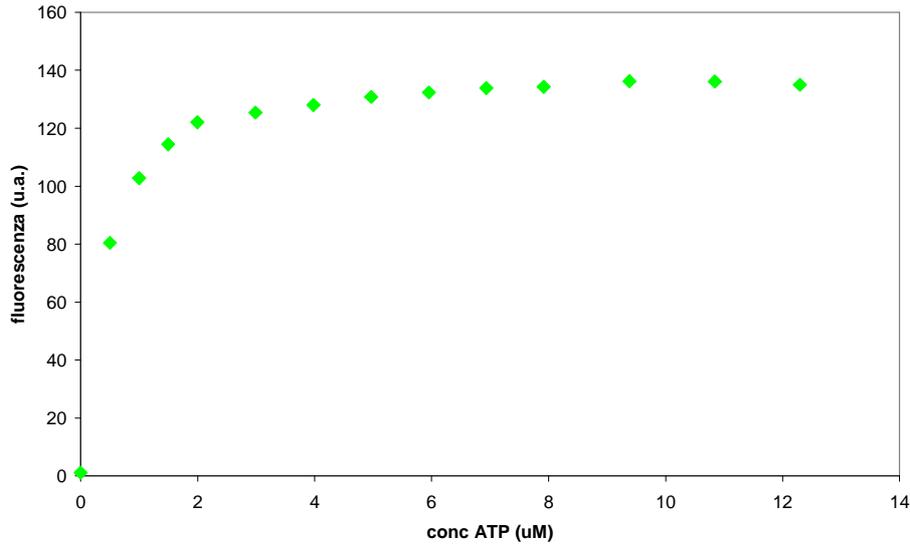


Figura 4.6: spiazzamento di F-ATP [1.0×10^{-7} M] da AuNPs-TACN·Zn(II) [1.0×10^{-6} M], tramite aggiunte di ATP (sopra, rombi verdi, finestre 5:10) e di preS1-Cys-Mal-TriAsp (sotto, quadrati viola, finestre 10:10); [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25 °C; $\lambda_{\text{eccitazione}}$ 305 nm, $\lambda_{\text{emissione}}$ 370 nm.

L'ATP è riuscito a spiazzare totalmente il suo omologo fluorescente, mentre il peptide non è riuscito a fare altrettanto; per quante aggiunte siano state esso non ha raggiunto un vero plateau, la fluorescenza per quanto poco continuava a salire.

Supponendo che gli anioni carbossilici non fossero in grado di staccare completamente l'F-ATP dal monostrato, si è proceduto con una modifica dell'esperimento. È stata confrontata direttamente la capacità di spiazzamento dei due peptidi, su AuNPs-TACN·Zn(II) 1.0×10^{-6} M saturate con F-ATP. Entrambi, preS1-Cys-Mal-TriAsp e preS1-Cys-Mal, sono stati aggiunti fino a una concentrazione di 10 μ M, per poi continuare la

titolazione con ATP per verificare che la totale deplezione di F-ATP dalla superficie nanoparticellare (figura 4.7).

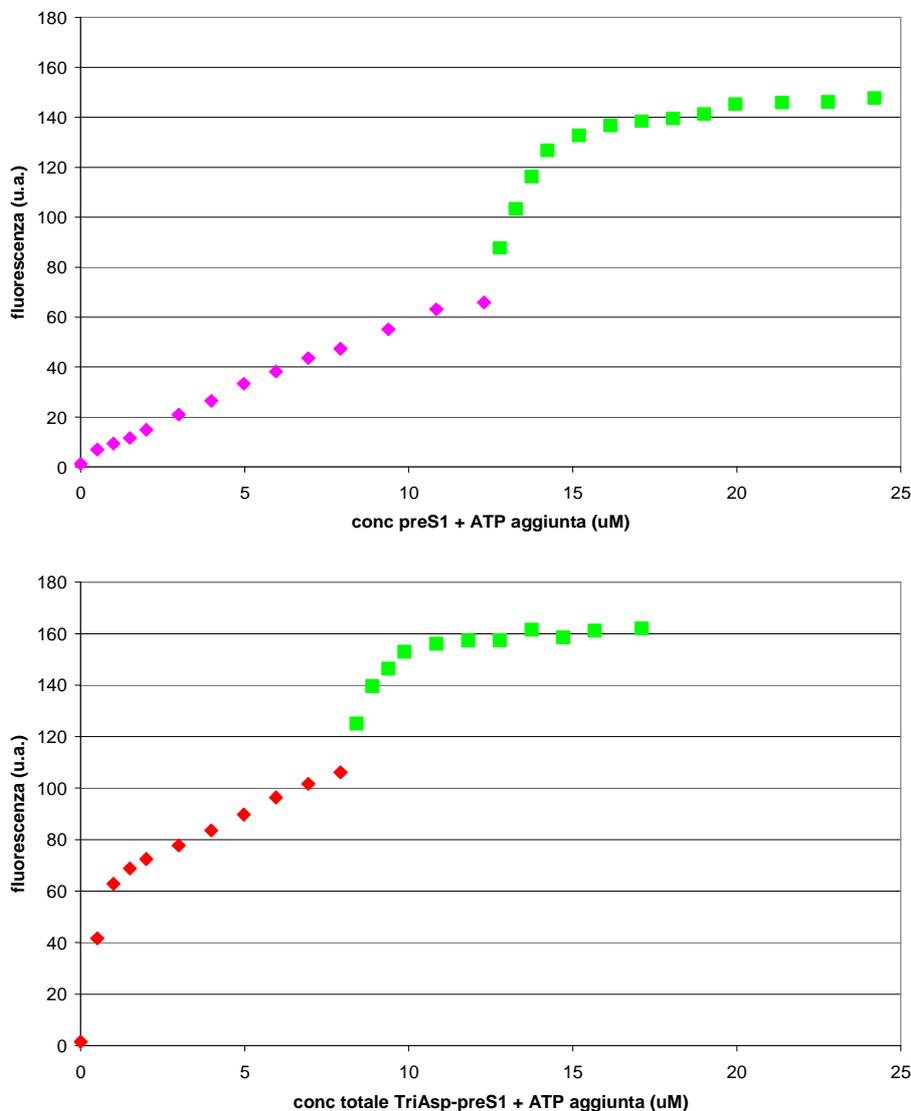


Figura 4.7: spiazzamento di F-ATP [1.0×10^{-7} M] da AuNPs-TACN-Zn(II) [1.0×10^{-6} M], con preS1-Cys-Mal (sopra, rombi viola) e con preS1-Cys-Mal-TriAsp (sotto, rombi rossi), continuata poi con ATP (quadrati verdi); [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25°C; $\lambda_{\text{eccitazione}}$ 305 nm, $\lambda_{\text{emissione}}$ 370 nm, finestre 5:10.

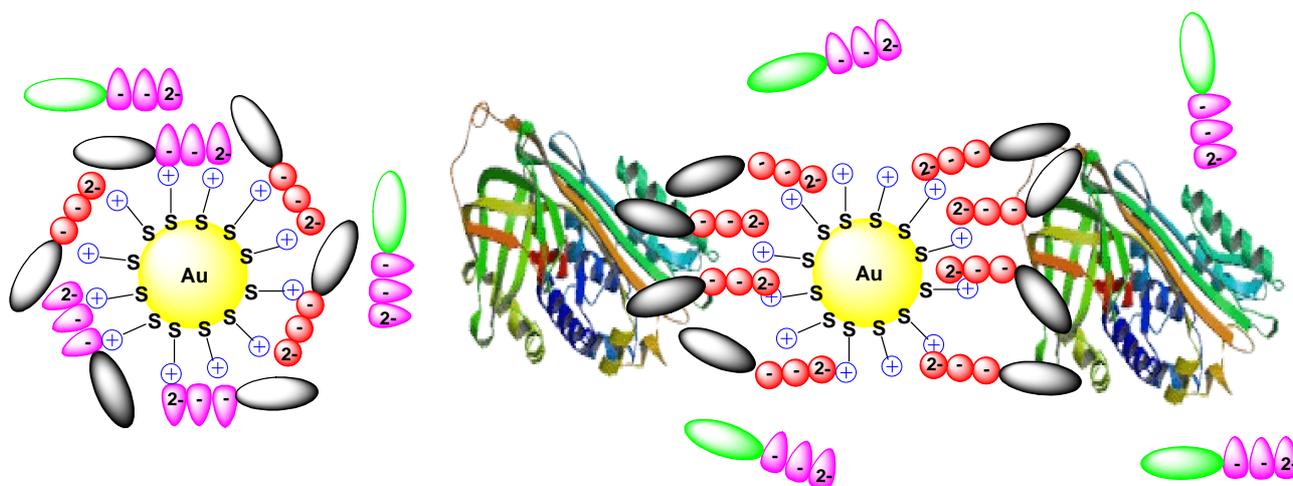
L'aggiunta di ATP è servita a dimostrare che il sistema funziona: il mancato raggiungimento del plateau da parte dei peptidi non era dovuto a qualche artefatto, ma all'affinità dei peptidi per il monostrato, inferiore a quella dell'F-ATP. La fluorescenza di preS1-Cys-Mal-TriAsp è inizialmente cresciuta in modo più drastico rispetto a preS1-Cys-Mal, con maggior spiazzamento di F-ATP a basse concentrazioni. Andando a calcolare la concentrazione di peptide necessaria per lo spiazzamento del 50% di F-ATP è emerso che, mentre di preS1-Cys-Mal è servita una concentrazione di 16.2×10^{-6} M, per

preS1-Cys-Mal-TriAsp è bastata una concentrazione pari a 3.9×10^{-6} M, con un'affinità relativa di 4.2 volte superiore per il peptide dotato dell'ancora anionica.

Questo ha mostrato che la presenza dell'ancora anionica era in grado di formare un legame più forte con il monostrato cationico delle nanoparticelle, riuscendo a spiazzare quantità significativamente superiori di ATP fluorescente. Avendo dimostrato l'importanza del contributo dato, nell'interazione con le nanoparticelle, dall'ancora anionica triaspartico, si è proceduto con il confronto tra le interazione dei due peptidi con la proteina SCCA.

4.2.3 - INTERAZIONE di SCCA con i complessi preS1-AuNPs e preS1-TriAsp-AuNPs

Dopo aver verificato la capacità del peptide preS1 nel legare le nanoparticelle d'oro cationiche, e il contributo dato a tale interazione dalla presenza dell'ancora oligoanionica, l'attenzione è stata rivolta alla proteina SCCA. Questa presenta numerosi residui amminoacidici anionici, e quindi potrebbe avere una certa affinità per il monostrato cationico delle nanoparticelle. Come già detto in precedenza, il peptide preS1 ha mostrato un significativo aumento di affinità per la proteina SCCA quando si è trovato in forma tetramericata rispetto alla forma monomericata, a causa di un meccanismo cooperativo di interazione. Per questo si prospetta che preS1 dovrebbe aumentare considerevolmente la sua affinità per SCCA quando assemblato in forma multimerica sulla superficie delle nanoparticelle. Le nanoparticelle potrebbero così dimostrare di poter essere usate come supporto per la veicolazione di molecole a scopo diagnostico.



Schema 4.5: spiazzamento di F-ATP da NPs cationiche: con preS1-TriAsp (a sinistra) e col complesso preS1-TriAsp-SCCA (a destra). Il solo peptide causa uno spiazzamento parziale dell'anione fluorescente, il complesso peptide-proteina lo spiazza invece totalmente.

4.2.3.1 - Valutazione delle interazioni tra AuNPs-TACN·Zn(II) e oligoanioni in micropiastra

È stato scelto di seguire ancora una volta la via fluorimetrica, ma le quantità disponibili di proteina SCCA, molto costosa, non erano sufficienti per sostenere intensive analisi al fluorimetro. Per questo è stato deciso di operare in micropozzetto, tarando tutti gli esperimenti su scala molto più piccola. Questo ha richiesto la ripetizione di alcune delle prove già effettuate in precedenza: la titolazione delle nanoparticelle cationiche con F-ATP e il suo spiazzamento operato dai peptidi. Si è infatti voluto verificare che a queste concentrazioni ci fosse ancora la formazione del complesso tra nanoparticelle e peptidi. AuNPs-TACN·Zn(II) sono state quindi saturate con F-ATP, per poi effettuare prove di spiazzamento con rispettivamente ATP, preS1-Cys-Mal-TriAsp, preS1-Cys-Mal ed SCCA, confrontando le diverse capacità di legare col monostrato cationico (figura 4.8).

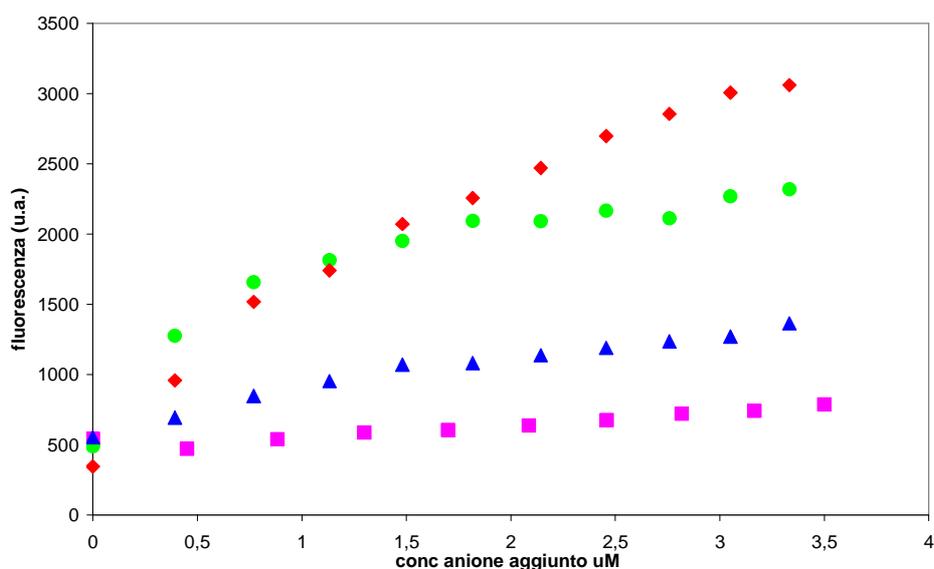


Figura 4.8: confronto nello spiazzamento di F-ATP [9.0×10^{-7} M] da AuNPs-TACN·Zn(II) [5.0×10^{-6} M], utilizzando ATP (rombi rossi), preS1-Cys-Mal-TriAsp (cerchi verdi), preS1-Cys-Mal (triangoli blu) ed SCCA (quadrati viola). [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25°C, $\lambda_{\text{eccitazione}}$ 320(\pm 20) nm, $\lambda_{\text{emissione}}$ 380(\pm 20) nm, gain 50.

Anione	Concentrazione di spiazzamento 50% F-ATP (M)	Affinità relativa (riferimento ATP)
ATP	9.5×10^{-7}	1
preS1-Cys-Mal-TriAsp	1.0×10^{-6}	0.95
preS1-Cys-Mal	3.8×10^{-6}	0.25
SCCA	1.2×10^{-5}	0.07

Tabella 4.1: concentrazioni di vari oligoanioni necessarie a spiazzare il 50% di F-ATP dalla superficie di AuNPs-TACN·Zn(II) [5.0×10^{-6} M], e affinità relative di legame con il monostrato cationico.

Il maggior spiazzamento di F-ATP lo ha dato l'ATP, seguito da preS1-Cys-Mal-TriAsp. La loro affinità relativa per il monostrato cationico si è rivelata essere pressoché analoga. Decisamente inferiore è stata invece l'affinità relativa di preS1-Cys-Mal e di SCCA, le quali in questo esperimento non hanno praticamente dato segno di riuscire a spiazzare l'F-ATP. Sono state quindi confermate le aspettative: dopo l'ATP, è stata la presenza dell'ancora anionica a dare la migliore adesione al monostrato. Il peptide privo del TriAsp ha legato le nanoparticelle con efficacia appena superiore a quella della proteina, dimostrando una scarsa affinità per la superficie cationica.

4.2.3.2 - Interazione di SCCA con TriAsp-preS1 e preS1

Successivamente si è verificato se il peptide preS1, con o senza TriAsp, una volta assemblato sulla superficie delle nanoparticelle era in grado di sviluppare un'interazione con la proteina SCCA con affinità maggiore rispetto al peptide singolo. Tale induzione avrebbe dovuto essere maggiore nel peptide con l'ancora anionica rispetto a quello che ne era privo, poiché in quest'ultimo i residui amminoacidici impegnati nel legame con la proteina non avrebbero potuto partecipare anche all'interazione con il monostrato cationico (precedente schema 4.5).

La base di questo esperimento è l'assunzione che la formazione di un complesso tra SCCA e preS1 ancorato sulla superficie delle nanoparticelle, porti anche a un rafforzamento del complesso AuNPs-preS1. Questa ipotesi è verificabile tramite studi di spiazzamento, usando la sonda ATP-F. Si è quindi provveduto a saturare AuNPs-TACN·Zn(II) $5 \mu\text{M}$ con F-ATP, provvedendo allo spiazzamento per aggiunta di preS1-Cys-Mal-TriAsp e di preS1-Cys-Mal rispettivamente, sia in presenza di proteina SCCA $1 \mu\text{M}$ che in sua assenza. La

fluorescenza è stata registrata, dopo ogni aggiunta, con luce eccitante di λ 320(\pm 20) nm, registrando l'emissione a 380(\pm 20) nm (figura 4.9).

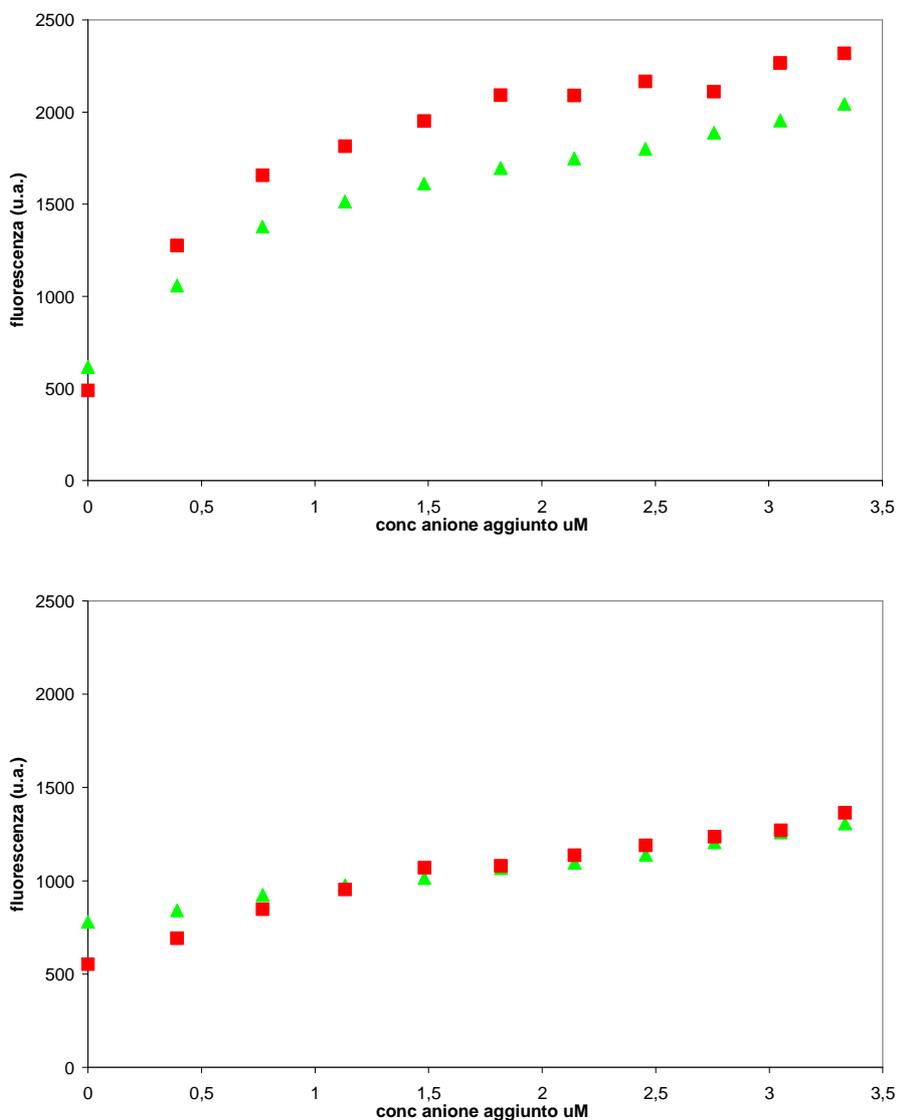


Figura 4.9: spiazzamento di F-ATP [9.0×10^{-7} M] da AuNPs-TACN-Zn(II) [5.0×10^{-6} M], con preS1-Cys-Mal-TriAsp (sinistra) e preS1-Cys-Mal (destra). Prove condotte in presenza (triangoli verdi) e in assenza (quadrati rossi) di SCCA [1.0×10^{-6} M]. [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25°C, $\lambda_{\text{eccitazione}}$ 320(\pm 20), $\lambda_{\text{emissione}}$ 380(\pm 20), gain 50.

Purtroppo gli studi di spiazzamento non hanno dato evidenze che la presenza della proteina SCCA migliorasse l'interazione dei peptidi con le nanoparticelle. In entrambi i casi, le differenze nella quantità di fluorescenza rilevata sono state troppo piccole per tracciare delle adeguate conclusioni. Tentativi attuati con quantitativi maggiori di proteina (3 μ M e 6 μ M) hanno dato risultati analoghi.

È quindi stato tentato un altro tipo di approccio: è stato preparato un complesso formato dalla proteina SCCA e dal peptide preS1-Cys-Mal-TriAsp, sia in rapporto 1:1 che in rapporto 1:4. Entrambe le forme di tale complesso sono state legate alle nanoparticelle cationiche, per poi provvedere al loro spiazzamento utilizzando F-ATP, utilizzando come riferimento nanoparticelle saturate con il solo peptide. Registrando la fluorescenza dell'ATP è stato ottenuto il classico profilo di titolazione delle nanoparticelle, pressoché identico nei tre casi ma con una fluorescenza lievemente superiore nel caso del peptide da solo, quasi a confermare la maggior difficoltà nel suo spiazzamento rispetto ai complessi con la proteina (figura 4.10).

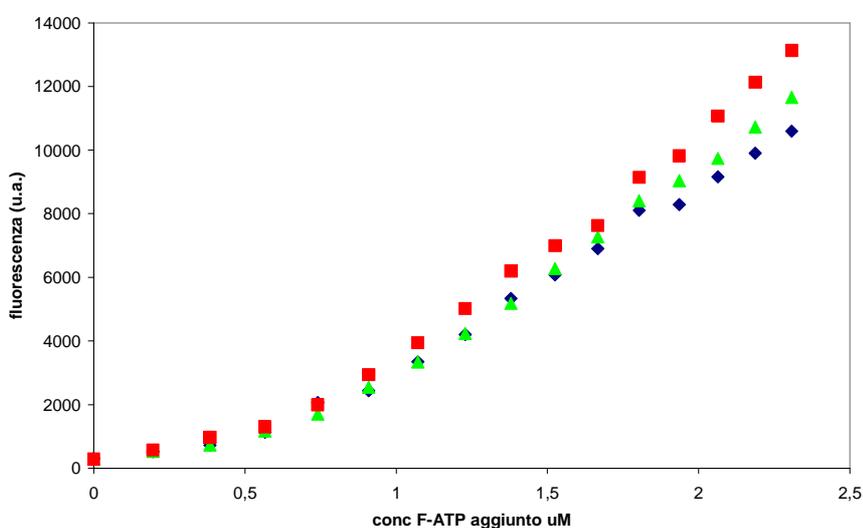


Figura 4.10: spiazzamento del complesso preS1-TriAsp-SCCA da AuNPs-TACN·Zn(II) [5.0×10^{-6} M] con F-ATP [1.0×10^{-6} M]: complesso peptide-proteina 1:1 (rombi blu), complesso peptide-proteina 4:1 (triangoli verdi) e peptide solo (quadrati rossi). [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25°C; $\lambda_{\text{eccitazione}}$ 320 (± 20), $\lambda_{\text{emissione}}$ 380 (± 20), gain 50.

Come ultimo tentativo sono stati preparati i medesimi complessi peptide-proteina, e separatamente nanoparticelle saturate con F-ATP. Con queste ultime sono state titolate le soluzioni contenenti i diversi complessi, andando a vedere sia l'aumento di fluorescenza per spiazzamento dell'F-ATP che la diminuzione di fluorescenza del triptofano per il legame con le nanoparticelle. I dati ottenuti con questi tentativi non sono stati sufficientemente sensibili da permettere di trarre adeguate conclusioni.

4.2.4 - ANALISI NON FLUORESCENTI delle INTERAZIONI preS1-SCCA

Con gli esperimenti di fluorescenza effettuati non sono stati ottenuti i risultati attesi, ma non era chiaro se questo fosse dovuto a un differente comportamento del peptide preS1 e della proteina SCCA rispetto a quanto previsto, oppure a un problema nel metodo di analisi prescelto. Si è quindi deciso di procedere con altri metodi nello studio dell'interazione tra il complesso peptide-proteina e le nanoparticelle cationiche. Le tecniche utilizzate si sono basate sull'analisi della risonanza plasmonica superficiale dei nuclei d'oro metallico e sulla diffrazione della luce operata dalle formazioni colloidali formate dalle nanoparticelle stesse in soluzione.

4.2.4.1 - Analisi tramite Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)

La prima delle analisi non fluorimetriche effettuate si è basata sulla valutazione della variazione della banda plasmonica superficiale, emessa dalle nanoparticelle quando colpite dalla luce a 520 nm. Lo strumento utilizzato, un Biacore, ha un principio di funzionamento basato sulla presenza, al suo interno, di due chip formati da una sottile lamina d'oro ricoperta di destrano. Tramite il destrano è possibile funzionalizzare il chip di analisi con una molecola di interesse, detta ligando, mentre l'altro chip viene usato come riferimento. Facendo flussare sulla superficie dei chip una soluzione contenente un analita di interesse, esso si va a legare al chip di analisi quanto maggiore è la sua interazione con il ligando. Irradiando con luce incidente si genera una risonanza plasmonica superficiale (banda SPR); il legame delle molecole sul chip cambia la banda SPR dello strato di oro sottostante, con angolo di rifrazione diverso tra il chip con d'analisi e il chip di riferimento. Sulla base di tale differenza lo strumento restituisce un profilo di interazione tipico (figura 4.11).

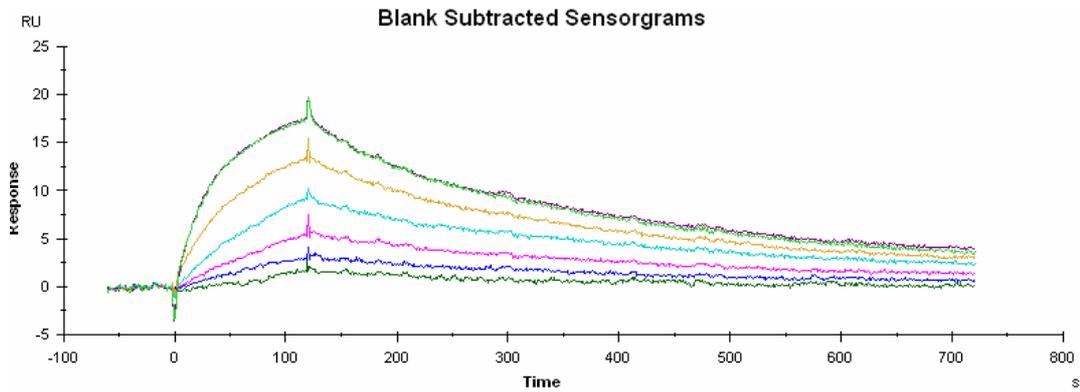


Figura 4.11: tipica curva di legame col chip di analisi dello strumento Biacore: la parte ascendente della curva indica il legame crescente ottenuto dal flussaggio della soluzione contenente l'analita, la parte discendente indica il flussaggio della soluzione tampone di lavaggio, con progressivo distacco dell'analita dal ligando.

Negli esperimenti effettuati, il chip di analisi è stato funzionalizzato con la proteina SCCA. Sono state testate svariate combinazioni di composti in esame, facendo flussare nello strumento, attraverso il chip d'analisi, AuNPs e peptidi presi singolarmente nonché AuNPs funzionalizzate alternativamente con l'uno o l'altro peptide, tutti alla concentrazione 14.4×10^{-6} M (equivalente a 1.57×10^{-7} M nuclei d'oro). Purtroppo lo strumento ha dato segnali negativi, rendendo l'eventuale legame in oggetto non osservabile (figura 4.12). Le nanoparticelle cationiche, infatti, sono andate a interagire con il destrano, presente sia nel chip di analisi che in quello di controllo, rendendo quindi inutile ogni informazione ricavabile dal confronto tra le e diverse funzionalizzazioni dei due.

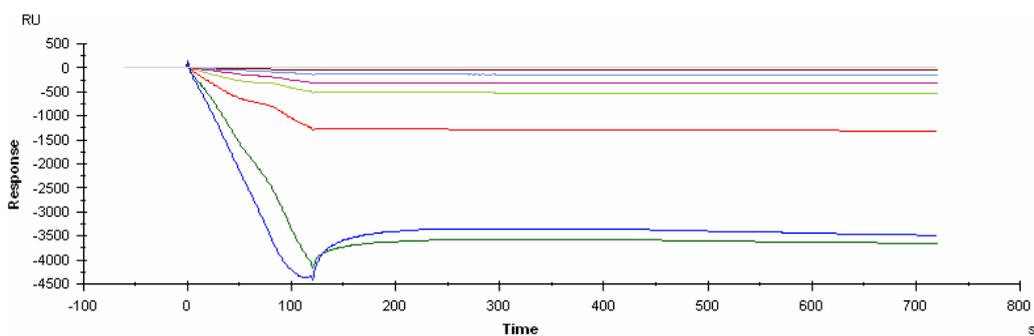


Figura 4.12: profilo di legame ottenuto dall'interazione dei ligandi con il chip di analisi e con quello di riferimento.

4.2.4.2 - Analisi tramite Dynamic Light Scattering (DLS)

Il dynamic light scattering è stato testato come ultimo approccio, per vedere e valutare l'interazione tra peptidi e proteina. Si tratta di una tecnica analitica che si basa sulla

diffrazione della luce per la determinazione delle dimensioni di particelle presenti in sospensione o soluzione in un dato solvente. Lo strumento irradia con un raggio di luce ($\lambda = 675 \text{ nm}$) le particelle presenti in soluzione le quali. A causa dell'effetto Doppler esse subiscono una variazione apparente della lunghezza d'onda della luce incidente, correlata alla dimensione delle particelle in modo indipendente dalla loro concentrazione.

Innanzitutto è stata verificata la differenza che intercorreva, in quanto a dimensioni, tra le AuNPs-TACN·Zn(II) da sole, i peptidi da soli, SCCA da sola e i complessi peptide-nanoparticella in soluzione. Successivamente sono state analizzate le dimensioni dei complessi peptide-proteina, utilizzando sia preS1-Cys-Mal che preS1-Cys-Mal-TriAsp, e infine la dimensione dei complessi peptide-proteina-nanoparticella (tabella 4.2).

	AuNPs-TACN·Zn(II) $2 \times 10^{-5} \text{ M}$	No NPs	SCCA $1 \times 10^{-6} \text{ M}$	NPs+SCCA
TriAsp-Mal-Cys-preS1 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$	950-1050	0.8-0.9	5-6	1022-1100
Mal-Cys-preS1 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$	160	0.8-0.9	6-7	167-221
No peptide	8.5	/	2-3	10-18

Tabella 4.2: valori del diametro idrodinamico valutati al DLS (nm); [HEPES] = 10 mM, pH 7.0, 25°C.

Osservando la tabella, è saltato subito all'occhio come fosse impossibile un aumento così elevato di diametro idrodinamico per l'aggiunta, alle nanoparticelle, del peptide preS1-Cys-Mal-TriAsp, sia in presenza che in assenza di proteine. Anche considerando che la lunghezza calcolata del peptide preS1 è di poco superiore ai 100 Å (quindi 10 nm). Anche nel caso di preS1-Cys-Mal, mescolato alle NPs, i valori ricavati sono risultati eccessivi, ma in misura minore. All'interno delle soluzioni analizzate, in cui erano presenti sia NPs che peptide TriAsp, sono state notate minuscole particelle in sospensione. Dopo una notte sono aumentate di dimensioni, quasi a spiegare la formazione di aggregati di peptide-proteina-nanoparticella di notevoli dimensioni. Per questo si è proceduto con la preparazione di altre soluzioni nelle quali, assieme alle nanoparticelle e al peptide, è stato posto ATP in grande eccesso. Lo scopo era di causare spiazzamento del peptide: se fosse stato ottenuto un diametro idrodinamico inferiore e assenza di aggregazione sarebbe stato chiaro che il peptide causava una sorta di reticolazione tra nanoparticelle in soluzione. Invece sono stati ottenuti risultati esattamente analoghi ai precedenti: probabilmente il sistema ha formato dei super-

aggregati resistenti allo spiazzamento dell'ATP, oppure che lo hanno incluso al loro interno.

4.3 - CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro era quello di ottenere un sistema che fosse in grado di riconoscere specificatamente, in modo efficace e selettivo, la proteina SCCA. Occorreva costruire un sistema, basato sulle nanoparticelle, in grado di agire da diagnostico e in futuro, forse, da farmaco. Per questo era necessario dimostrare che il peptide preS1, quando disposto in una struttura multimerica organizzata attorno alle nanoparticelle d'oro, era in grado non solo di legarsi alla proteina, ma di farlo meglio rispetto al monomero in soluzione. Era quindi necessario ottenere un metodo che permettesse di verificare la capacità di legame tra il peptide preS1 e la proteina, nonché di misurare il miglioramento di tale interazione con la disposizione del peptide sulla superficie delle nanoparticelle. Purtroppo, le tecniche utilizzate non si sono dimostrate adeguate: si è cercato di indurre l'organizzazione di preS1 sulla superficie nanoparticellare grazie alla presenza della proteina in soluzione, ma questo non ha funzionato. Bisognava costruire prima il sistema nanoparticella-peptide, e successivamente testarne la capacità di legame con SCCA confrontandola col peptide libero. Con un sistema del genere, però, la fluorescenza non sarebbe stata utilizzabile: essa si basava sulla differente interazione con la superficie nanoparticellare. Costruendo sistemi stabili e già fissati sulle nanoparticelle tale fenomeno non si sarebbe verificato, non avrebbe dato luogo a variazioni quantificabili, e sarebbe stato perciò necessario trovare un altro sistema dal quale dedurre l'efficacia dell'interazione preS1-SCCA.

Sono quindi stati tentati approcci differenti, i quali hanno dato risultati non incoraggianti. Nel caso del DLS essi hanno suggerito problemi di aggregazione che potrebbero indicare problemi di fondo del sistema, costitutivi, non riconducibili al sistema di analisi; non ha però permesso, per sua stessa natura, di capire più a fondo il problema. Un'analisi migliore si sarebbe infatti avuta dall'uso del Blacore, con valutazione della variazione della banda SPR in base alle diverse interazioni tra peptide e proteina immobilizzata sul chip d'oro. L'uso di tale strumento era ancora alle fasi iniziali, essendo stato da poco acquistato, e quindi non era ancora stato stabilito un valido protocollo di analisi. Per questo il fallimento nell'uso di questa tecnica non ne precluderà l'utilizzo in futuro nello stesso ambito, e anzi potrà ancora dare importanti informazioni che forse riveleranno finalmente le potenzialità d'interazione del sistema

AuNPs-TACN-Zn(II)-TriAsp⁴⁻-Mal-Cys-preS1 con la proteina SCCA, le quali al momento non possono ancora essere dimostrate.

4.4 - PARTE SPERIMENTALE

4.4.1 - MATERIALI e STRUMENTAZIONE

I materiali e la strumentazione utilizzati sono i medesimi descritti nei capitoli precedenti, a differenza di quanto sotto riportato.

4.4.1.1 - Materiale per sintesi su fase solida

Tutte le sintesi su fase solida sono state effettuate su resina Wang, con granulometria 100-200 mesh e capacità di caricamento di 1.0×10^{-3} moli/g, oppure su resina Rink-ammide, granulometria 100-200 mesh e caricamento 0.59 mmoli/g.

4.4.1.2 - Analisi SPR con Biacore

Lo strumento Biacore analizza la banda plasmonica superficiale emessa dalle nanoparticelle quando colpite dalla luce a 520 nm. Al suo interno presenta due chip formati da una sottile lamina d'oro ricoperta di destrano, tramite il quale uno dei due (chip d'analisi) è funzionalizzato con una molecola di interesse. L'altro chip viene usato dallo strumento come riferimento. Su entrambi i chip viene fatta flussare una soluzione contenente un analita di interesse: irradiando con luce incidente si genera una risonanza plasmonica superficiale (banda SPR) con angolo di rifrazione diverso tra i due chip sulla base della differenza d'interazione con l'analita.

4.4.1.3 - Tampone HBS-EP

Per le analisi di SPR ogni campione è stato diluito in tampone composto da HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, NaCl $1,5 \times 10^{-1}$ M, EDTA 3×10^{-6} M e tensioattivo P20 0,05% v/v, a pH 7,4.

4.4.1.4 - Analisi DLS

Il dynamic light scattering si basa sulla diffrazione della luce per la determinazione delle dimensioni di particelle in sospensione o in soluzione. Lo strumento irradia con un raggio di luce le particelle (generalmente di λ 675 nm); a causa dell'effetto Doppler esse subiscono una variazione apparente della lunghezza d'onda che, registrata dallo strumento, è correlata alla dimensione delle particelle, in modo indipendente dalla loro concentrazione.

4.4.2 - METODOLOGIE GENERALI

4.4.2.1 - Soluzioni madre del substrato HPNP

Per gli studi cinetici è stato utilizzato come substrato HPNP, la cui sintesi⁴⁰ è stata effettuata nel nostro laboratorio. Il prodotto è stato ottenuto come sale bivalente di Ba(II). Le soluzioni madre sono state preparate in H₂O mQ per pesata.

4.4.2.2 - Condizioni per gli esperimenti cinetici realizzati con HPNP

La reazione d'idrolisi di HPNP è stata seguita per via spettrofotometrica, misurando nel tempo l'aumento di assorbanza a 400 nm dovuto al rilascio e conseguente accumulo del p-nitrofenolato come prodotto di reazione. Le cinetiche sono state condotte a 40°C e seguite per circa 3 ore, e i dati sono stati raccolti ad intervalli regolari di tempo di 30 secondi ciascuno. Le soluzioni analizzate sono state preparate aggiungendo l'opportuno volume di substrato alla soluzione acquosa di catalizzatore e tampone. Il tampone utilizzato è sempre stato HEPES 2.5 x 10⁻² M a pH 7.00.

4.4.3 - SCELTA dell'ANCORA ANIONICA

4.4.3.1 - Sintesi di TriAsp-Triptofano

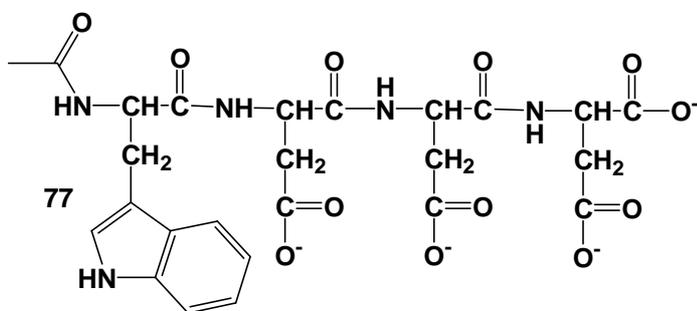


Grafico 4.5

Resina Wang-TriAsp-Fmoc (150 mg, 1.02 x 10⁻⁴ moli di gruppi amminici terminali, 1 eq), ottenuta come intermedio in passaggi sintetici precedenti (paragrafo 4.4.4.12), è stata posta in apposito reattore a rigonfiare in DMF per 30 minuti. Eliminato il solvente, si è operato il distacco del gruppo protettore (2 x soluzione di piperidina al 20% in DMF per 15 min, 3.4.3.2), per poi sottoporre la resina a lavaggio e al Kaiser test. Quindi, è stata preparata la miscela di reazione ponendo Triptofano Fmoc/Boc (161 mg, 3.1 x 10⁻⁴ moli, 3 eq), HOBT x 3 H₂O (46 mg, 3.1 x 10⁻⁴ moli, 3 eq) e HBTU (116 mg, 3.1 x 10⁻⁴ moli, 3 eq) in DMF, posta a contatto della resina con l'aggiunta di DIEA (52 µl, 3.1 x 10⁻⁴ moli, 3 eq).

Il reattore è stato posto in agitazione per 1,5 ore, al termine delle quali è stato svuotato del solvente, lavando la resina. Dopo Kaiser test, è stata aggiunta soluzione di distacco del gruppo Fmoc e, dopo ulteriore lavaggio, è stata aggiunta soluzione di acetilazione (tempo di contatto 30 minuti). Eliminata la soluzione e lavata nuovamente la resina, essa è stata trasferita in un pallone da 10 ml e aggiunta di soluzione di TFA 95% in acqua mQ (1,5 ml), lasciando il tutto in agitazione per 1,5 ore. Prelevata quindi la soluzione con una siringa, è stata filtrata su setto 0,45 μm direttamente etere etilico alla temperatura di 0°C (50 ml). Il peptide precipitato è stato isolato per centrifugazione, per poi essere purificato tramite HPLC preparativa [rampa (ACN+TFA 0.1%) dal 10 al 90 % in 30 min in (H₂O+TFA 0.1%)], leggendo i picchi in uscita a 280 nm, massimo d'assorbimento del triptofano. Eliminato il solvente organico per evaporazione, il residuo acquoso è stato posto a liofilizzare, ottenendo un solido bianco polverulento, composto **77** (31 mg, resa 52 %).

MS (ESI+, MeOH): m/z 592.3 ([M+H⁺], calcolata protonata 592.5).

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 280 nm]: 14.23 minuti.

4.4.3.2 - Sintesi di Tyr(OPO₃⁽²⁻⁾)-Triptofano

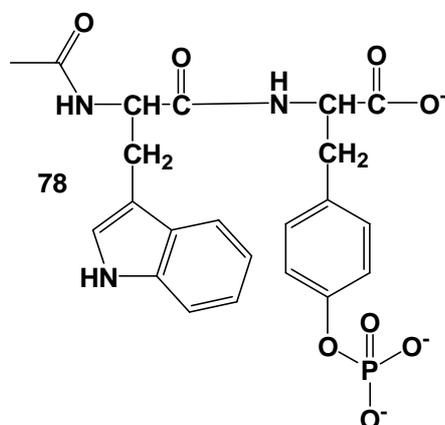


Grafico 4.6

Resina Rink-ammide (356 mg, caricamento 5.9×10^{-4} moli/g, 2.1×10^{-4} moli di gruppi amminici liberi, 1 eq) è stata posta in un reattore a rigonfiare in DMF per 30 minuti, e successivamente aggiunta di soluzione di distacco del gruppo Fmoc protettore. Dopo lavaggio, alla resina sono state aggiunte una soluzione di Tirocina fosfato (300 mg, 6.3×10^{-4} moli, 3 eq), HOBT x 3 H₂O (161 mg, 1.05×10^{-3} moli, 5 eq) e HBTU (398 mg, 1.05×10^{-3} moli, 5 eq) in DMF, seguita da DIEA (180 μl , 1.05×10^{-3} moli, 5 eq). Il reattore è stato lasciato in agitazione per 22 ore, per poi eliminare il solvente, lavare la resina ed

effettuare il Kaiser test. A questo punto la resina è stata divisa in due parti uguali, e in entrambe è stato rimosso il gruppo Fmoc, per poi procedere al lavaggio e al Kaiser test. Nel primo reattore è stata aggiunta una soluzione in DMF contenente Triptofano Fmoc/Boc (166 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq), HOBT x 3 H₂O (48 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq) e PyBoP (165 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq), seguita da DIEA (108 μ l, 6.3×10^{-4} moli, 6 eq), e la miscela è stata lasciata in agitazione per una notte. Dopo eliminazione del solvente, lavaggio della resina e Kaiser test, è stato staccato il gruppo Fmoc e, dopo ulteriori lavaggio e Kaiser test, si è proceduto con l'acetilazione. Eliminata la soluzione e lavata nuovamente la resina, essa è stata trasferita in un pallone da 10 ml e aggiunta di una soluzione di TFA 95% in acqua mQ (1.5 ml), lasciando il tutto in agitazione per 1,5 ore. Prelevata tale soluzione con una siringa, è stata filtrata su setto 0,45 μ m direttamente in etere etilico (50 ml) alla temperatura di 0 °C. Il peptide precipitato è stato isolato per centrifugazione, per poi essere purificato tramite HPLC preparativa [rampa (ACN+TFA 0.1%) dal 10 al 90 % in 30 min in (H₂O+TFA 0.1%)], leggendo i picchi in uscita a 280 nm, massimo d'assorbimento del triptofano. Eliminato il solvente organico per evaporazione, il residuo acquoso è stato posto a liofilizzare, ottenendo un solido bianco polverulento, il composto **78** (12 mg, resa 24 %).

MS (ESI+, MeOH): m/z 490.2 ([M+H⁺], calcolata protonata 490.4).

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 280 nm]: 14.63 minuti.

4.4.3.3 - Sintesi di DiTyr(OPO₃⁽²⁻⁾)-Triptofano

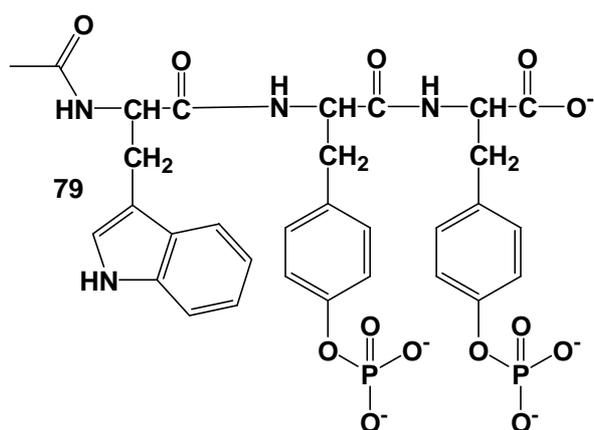


Grafico 4.7

Alla resina Rink-ammide tirosina posta nel secondo reattore (paragrafo 4.4.3.2), positiva al Kaiser test, è stata aggiunta una soluzione in DMF contenente Tirosina fosfato (150 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq), HOBT x 3 H₂O (48 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq) e PyBoP (165 mg,

3.1×10^{-4} moli, 3 eq), seguita da DIEA (108 μ l, 6.3×10^{-4} moli, 6 eq), lasciando il tutto in agitazione per una notte. Dopo eliminazione del solvente, lavaggio della resina e Kaiser test, è stata aggiunta soluzione di distacco del Fmoc; dopo ulteriore lavaggio e Kaiser test, è stata aggiunta un'altra soluzione in DMF contenente Triptofano Fmoc/Boc (166 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq), HOBT x 3 H₂O (48 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq) e PyBoP (165 mg, 3.1×10^{-4} moli, 3 eq), seguita da DIEA (108 μ l, 6.3×10^{-4} moli, 6 eq), ponendo il reattore in agitazione per 12 ore. Eliminata la fase liquida, dopo Kaiser test la resina è stata lavata e aggiunta di soluzione di distacco del gruppo Fmoc, ulteriormente lavata e sottoposta a Kaiser test. A questo punto è stata aggiunta la soluzione di acetilazione (tempo di contatto 30 minuti); eliminata la soluzione e lavata nuovamente la resina, essa è stata trasferita in un pallone da 10 ml e aggiunta di una soluzione di TFA 95% in acqua mQ (1.5 ml), lasciando il tutto in agitazione per 1,5 ore. Prelevata la soluzione con una siringa, è stata filtrata su setto 0,45 μ m direttamente in etere etilico (50 ml) alla temperatura di 0°C. Il peptide precipitato è stato isolato per centrifugazione, per poi essere purificato tramite HPLC preparativa [rampa (ACN+TFA 0.1%) dal 10 al 90 % in 30 min in (H₂O+TFA 0.1%)], leggendo i picchi in uscita a 280 nm, massimo d'assorbimento del triptofano. Eliminato il solvente organico per evaporazione, il residuo acquoso è stato posto a liofilizzare, ottenendo un solido bianco polverulento, il composto **79** (9 mg, resa 12%).

MS (ESI+, MeOH): m/z 733.5 ([M+H⁺], calcolata protonata 733.6.

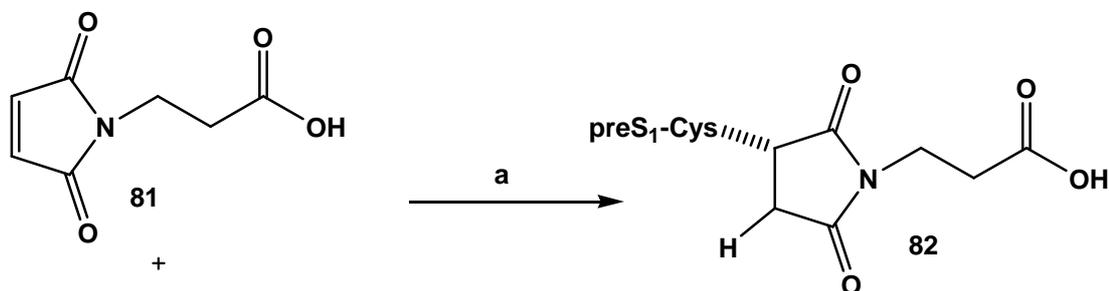
HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H₂O+TFA 0.1%), λ 280 nm]: 13.42 minuti.

4.4.3.4 - Confronto della capacità di legame tra fosfati e carbossilati

Sono state preparate tre soluzioni 7.5×10^{-5} M, rispettivamente dei peptidi TriAsp-Trp, Tyr(OPO₃⁽²⁻⁾)-Trp e DiTyr(OPO₃⁽²⁻⁾)-Trp, in miscela acqua mQ:ACN 1:1. Sono state poi preparate tre soluzioni identiche in cuvette da fluorescenza (volume totale 3000 μ l) di AuNPs-TACN·Zn(II) 5×10^{-6} M in tampone HEPES 10 mM a pH 7.0. Ad ogni soluzione sono state fatte aggiunte progressive da 4 μ l di una delle tre soluzioni peptidiche, irradiando con luce di λ 280 nm e registrando l'emissione di fluorescenza a λ 360 nm (finestre eccitazione 5 - emissione 20).

4.4.4 - SINTESI del PEPTIDE preS1(21-47)

4.4.4.1 - Sintesi manuale di Mal-Cys-preS1



$\text{H}_2\text{N-PLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNP-Cys-COOH}$

80

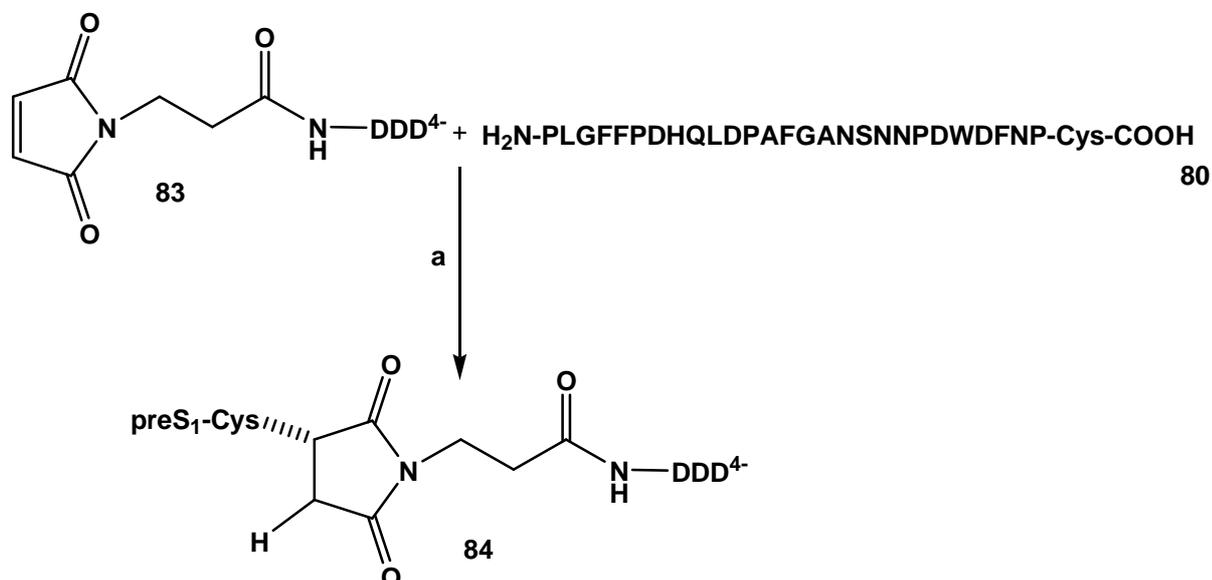
Schema 4.6: a) 2 giorni, RT, resa quantitativa.

È stata preparata una miscela composta da ACN e da una soluzione acquosa di NH_4Cl 0.2 M a pH 7.0 (500 μl + 500 μl), contenente preS1-cisteina (composto 80, 4.5 mg, 1.4×10^{-6} moli, 1 eq) ed N-maleoil- β -alanina (composto 81, 1.42 mg, 8.4×10^{-6} moli, 6 eq). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per due giorni, al termine dei quali è stata iniettata direttamente in HPLC preparativa (gradiente 0-100% ACN + TFA 0.1% in H_2O + TFA 0.1% in 30 min, lettura 226 nm), ottenendo Mal-Cys-preS1 puro (composto 82, 4.7 mg, resa quantitativa).

MS (ESI+, MeOH): m/z 1680 [$\text{M}+2\text{H}^+$], 1120 [$\text{M}+3\text{H}^+$], calcolata 3360.

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H_2O +TFA 0.1%), λ 280 nm]: 28.51 minuti.

4.4.4.3 - Sintesi manuale di TriAsp-Mal-Cys-preS1



Schema 4.7: 2 giorni, RT, resa 98%.

È stata preparata una soluzione di ACN e NH_4Cl 0.2 M a pH 7.0 (500 μl + 500 μl), contenente preS1-cisteina (composto **80**, 4.5 mg, 1.4×10^{-6} moli, 1 eq) ed N-maleoil-B-alanina-TriAsp (composto **83**, 4.3 mg, 8.4×10^{-6} moli, 6 eq). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per due giorni, al termine dei quali è stata iniettata direttamente in HPLC preparativa (gradiente 0-100% ACN + TFA 0.1% in H_2O + TFA 0.1% in 30 min, lettura 226 nm), ottenendo TriAsp-Mal-Cys-preS1 puro (composto **84**, 5.3 mg, resa 98 %).

MS (ESI+, MeOH): 1852 [$\text{M}+2\text{H}^+$], 1235 [$\text{M}+3\text{H}^+$], calcolata 3704.

HPLC [Jupiter Proteo 4 μ , (ACN+TFA 0.1%) 10-90 %, 30 min, in (H_2O +TFA 0.1%), λ 280 nm]: 18.53 minuti.

4.4.5 - INTERAZIONI IONICHE SUPERFICIALI di AuNPs-TACN·Zn(II) e preS1

4.4.5.1 - Titolazione di AuNPs-TACN·Zn(II) con preS1

È stata preparata in una cuvetta da fluorescenza una soluzione di AuNPs-TACN·Zn(II) (1.0×10^{-5} M), con HEPES 10 mM a pH 7.0 (2901 μL), AuNPs (61 μL di soluzione madre 4.9×10^{-4} M) e Zn^{2+} (38 μL di soluzione madre 2.64×10^{-4} M). A tale soluzione sono state fatte aggiunte di TriAsp-preS1 (soluzione madre 1.25×10^{-4} M) secondo l'ordine [2 μL x 4] [4 μL x 6] [6 μL x 5] [8 μL x 5], misurando dopo ogni aggiunta l'emissione a 356 nm (con eccitazione a 280 nm, finestre eccitazione 10 - emissione 20).

4.4.5.2 - Inibizione della capacità idrolitica del TACN·Zn(II)

Sono state preparate ventisette cuvette contenenti tampone HEPES 25 mM a pH 7.0, AuNPs-TACN·Zn(II) (**87**) 1.0×10^{-5} M (38 μl da soluzione 2.63×10^{-4} M) e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 1.0×10^{-5} M (38 μl da soluzione 2.63×10^{-4} M). In ognuna di esse è stata posta una quantità crescente di peptide **84**, inizialmente [6 x 5 μl] (da una soluzione 7.5×10^{-6} M), seguito da aggiunte nell'ordine [12 x 3 μl], [3 x 5 μl], [2 x 10 μl] e [3 x 20 μl] (da una soluzione 7.5×10^{-5} M). Infine in ogni cuvetta è stato aggiunto HPNP (composto **85**) alla concentrazione finale di 1.0×10^{-3} M (20 μl da soluzione 5×10^{-2} M), portando il volume finale a 1 ml. Ogni cuvetta è stata posta in spettrofotometro, andando a valutare la variazione dell'assorbanza a 400 nm nel tempo: da ogni valore di assorbanza registrato ($\epsilon_{\text{HPNP}} = 8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) è stata ricavata la concentrazione di p-nitro-fenato (composto **86**) liberato nel tempo. Stessa cosa è stata effettuata con il peptide Mal-Cys-preS1 (composto **82**), aggiunto come soluzione 1.3×10^{-5} M.

4.4.5.3 - Titolazione di AuNPs-TACN·Zn(II) con 2'-deossi-3'-O-(N-metilantraniloil)-adenosina-5'-O-trifosfato (F-ATP)

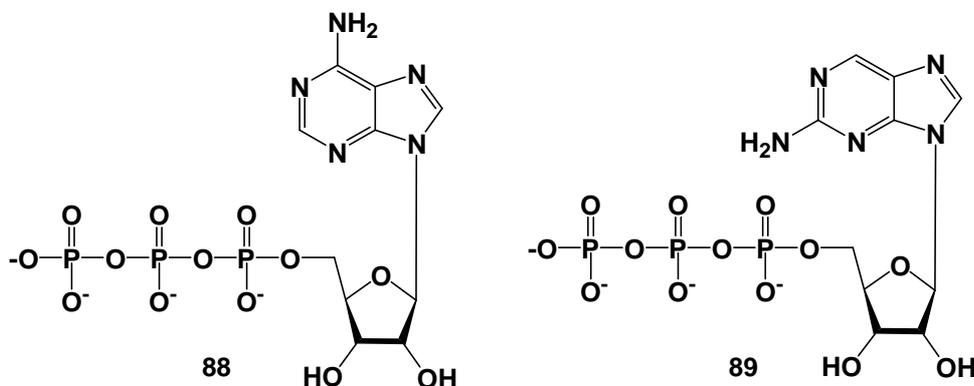


Grafico 4.8 (ATP 88, F-ATP 89)

È stata preparata una soluzione di AuNPs-TACN·Zn(II) (1.0×10^{-6} M) in tampone HEPES 10 mM a pH 7.0 in cuvetta da fluorescenza, con volume finale pari a 3000 μ L. A tale soluzione sono state fatte aggiunte di F-ATP (MANT-dATP, 1.0×10^{-5} M), secondo l'ordine di aggiunta [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 5] [8 μ L x 5], registrando la fluorescenza emessa a 370 nm (λ_{ecc} 305 nm).

4.4.5.4 - Prove di spiazzamento di F-ATP da AuNPs-TACN·Zn(II)

Sono state preparate, in cuvette da fluorescenza, due soluzioni contenenti AuNPs-TACN·Zn(II) (1.0×10^{-6} M) ed F-ATP (1.0×10^{-7} M) in HEPES 10 mM pH 7.0. Ad esse sono state fatte aggiunte rispettivamente di ATP (composto **88**) e di TriAsp-preS1 (da soluzioni 7.5×10^{-4} M), seguendo l'ordine di aggiunta [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 3]. È stata registrata la fluorescenza emessa a 370 nm (λ_{ecc} a 305 nm).

4.4.5.5 - Spiazzamento di F-ATP con TriAsp-preS1 e preS1

In cuvetta da fluorescenza sono state preparate due soluzioni in tampone HEPES 10 mM pH 7.0, contenenti entrambe AuNPs-TACN(Zn) (1.0×10^{-6} M) e F-ATP (1.0×10^{-7} M). Ad esse sono state fatte aggiunte rispettivamente di TriAsp-Mal-Cys-preS1 e di Mal-Cys-preS1 (da soluzioni 7.5×10^{-4} M) seguendo l'ordine [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 3], registrando la fluorescenza emessa (λ_{ecc} 305 nm, λ_{emiss} 370 nm). Le aggiunte sono poi continuate, sempre con lo stesso ordine [2 μ L x 4] [4 μ L x 6] [6 μ L x 3], con ATP (da soluzione 7.5×10^{-4} M).

4.4.6 - INTERAZIONE di SCCA con preS1 e AuNPs

4.4.6.1 - Titolazione di AuNPs-TACN·Zn(II) in micropiastra con F-ATP

Sono stati preparati, in micropiastra, due pozzetti contenenti una soluzione di AuNPs-TACN (5.0×10^{-6} M) e $Zn(NO_3)_2$ (5.0×10^{-6} M) in tampone HEPES 10 mM a pH 7.0 (200 μ L totali, esperimenti in doppio). In essi sono state effettuate aggiunte progressive da 4 μ L di F-ATP (1.0×10^{-5} M), registrando dopo ogni aggiunta la fluorescenza della soluzione (λ_{ecc} 320(\pm 20) nm, λ_{emiss} 380(\pm 20) nm, gain 50, 25°C).

4.4.6.2 - Spiazzamento di F-ATP con oligoanioni

Sono stati preparate in micropozzetti, in doppio, quattro soluzioni di AuNPs-TACN·Zn(II) (5.0×10^{-6} M) e F-ATP (9.0×10^{-7} M) in tampone HEPES 10 mM a pH 7.0. In ogni coppia di pozzetti sono state fatte continue e progressive aggiunte da 4 μ L, rispettivamente di ATP, TriAsp-Mal-Cys-preS1, Mal-Cys-preS1 ed SCCA, registrando dopo ogni aggiunta la fluorescenza delle soluzioni (λ_{ecc} 320(\pm 20) nm, λ_{emiss} 380(\pm 20) nm, gain 50, 25°C).

4.4.6.3 - Spiazzamento di F-ATP con TriAsp-preS1 e preS1 in presenza di SCCA

Sono state preparate, in micropozzetto, due soluzioni di AuNPs-TACN·Zn(II) (5.0×10^{-6} M) e F-ATP (9.0×10^{-7} M), in tampone HEPES 10 mM a pH 7.0 (volume totale 200 μ L): in una di esse è stata posta proteina SCCA (1.0×10^{-6} M). In entrambe le soluzioni sono state effettuate aggiunte da 4 μ L di peptide TriAsp-Mal-Cys-preS1 (7.5×10^{-4} M). La stessa cosa, in analoghe due soluzioni, è stata effettuata con peptide Mal-Cys-preS1 (7.5×10^{-4} M). Dopo ogni aggiunta è stata registrata la fluorescenza delle soluzioni (λ_{ecc} 320(\pm 20) nm, λ_{emiss} 380(\pm 20) nm, gain 50, 25°C).

4.4.7 - ANALISI NON FLUORESCENTI delle INTERAZIONI preS1-SCCA

4.4.7.1 - Analisi tramite Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)

Allo strumento Biacore è stato posto un chip d'analisi funzionalizzato con la proteina SCCA (ligando) tramite destrano. Successivamente in esso sono state fatte fluire miscele di vari analiti quali: AuNPs-TACN, $Zn(NO_3)_2$, AuNPs-TACN + $Zn(NO_3)_2$, peptide Mal-Cys-preS1, peptide TriAsp-Mal-Cys-preS1, AuNPs-TACN + $Zn(NO_3)_2$ + Mal-Cys-preS1, AuNPs-TACN + $Zn(NO_3)_2$ + TriAsp-Mal-Cys-preS1. Ogni analita era in soluzione tampone HBS-EP e concentrato 14.4×10^{-6} M (riferendosi, nel caso delle NPs, alla concentrazione di tioli superficiali, equivalenti a 1.57×10^{-7} M di AuNPs effettive).

4.4.7.2 - Analisi tramite Dynamic Light Scattering (DLS)

Sono stati preparati diversi campioni (volume totale 1000 μL), contenenti rispettivamente TriAsp-Mal-Cys-preS1 (5.0×10^{-6} M), peptide con AuNPs-TACN-Zn(II) (2.0×10^{-5} M), peptide con SCCA (1.0×10^{-6} M) e peptide con NPs e proteina. Lo stesso è stato ripetuto con Mal-Cys-preS1 (5.0×10^{-6} M). I campioni così preparati sono stati analizzati tramite DLS.

5 - BIBLIOGRAFIA

- [1] Suh, J.; Hah, S.; *S. J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10088-10093. Liu, L.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4978-4979. Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9578-9579. Delaney, E. J.; Leigh, E. W.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 799-807. Spetnagel, W. J.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 8199-8204. Klotz, I. M.; Stryker, V. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2717-2719.
- [2] Wulff, G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1-27. Suh, J.; Hah, S. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10088-10093. Sellergren, B.; Karmalkar, R. N.; Shea, K. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4009-4027.
- [3] Hof, F.; Trembleau, L.; Ullrich, E. C.; Rebek, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3150-3153. Hof, F.; Rebek, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *98*, 4775-4777. Linton, B.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1669-1680.
- [4] Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 246-254. Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621-630.
- [5] Murakami, Y.; Kikuchi, J.-I.; Hisaeda, Y.; Hayashida, O. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 721-758.
- [6] Lindoy, L. F.; Atkinson, I. M. in "Self-Assembly in Supramolecular Systems" RSC Monographs in Supramolecular Chemistry.
- [7] Lasic, D. D.; Needham, D. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2601-2628.⁸ Reinhoudt, D. M.; Crego-Calama, M. *Science* **2002**, *295*, 2403-2407.
- [8] Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, *295*, 2418-2421. Menger, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *98*, 4818-4822.
- [9] Choi, J. S.; Lee, E. J.; Jang, H. S.; Park, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 108-113.
- [10] DeFrees, S. A.; Phillips, L.; Guo, L.; Zalipsky, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6101-6104.
- [11] Astruc, D.; Chardac, F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2991-3023. Twyman, L. J.; King, A. S. H.; Martin, I. K. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 69-82.
- [12] Breinbauer, R.; Jacobsen, E. N.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3604-3607.
- [13] Shenhar, R.; Rotello, V. M. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 549-561.
- [14] Sadavisan, S.; Khushalani, D.; Mann, S. *J. Mater Chem.* **2003**, *13*, 1023-1029. van Blaaderen, A.; Vrij, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *156*, 1-18.
- [15] Rajamathi, M.; Ghosh, M.; Sescadri, R. *Chem. Commun.* **2002**, 1152-1153. Kumar, R.V.; Diamant, Y.; Gedanken, A. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2301-2305.
- [16] Grieve, K.; Mulvaney, P.; Grieser, F. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 168-172. Spreitzer, G.; Whitling, J. M.; Madura, J. D.; Wright, D. W. *Chem. Commun.* **2000**, 209-210. Vossmeier, T.; Katsikas, L.; Giersig, M.; Popovich, I. G.; Diesner, K.; Chemseddine, A.; Eychmüller, A.; Weller, H. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7665-7673.
- [17] Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 2888-2894.
- [18] Jortner, J.; Rao, C. N. R. *Pure Appl. Chem.*, **2002**, *74*, 1491-1506. Schmid, G.; Chi, L. F. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 515-526. Schmig, G. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1709-1727.
- [19] (a) Zhao, M.; Crooks, R. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4877-4878. (b) Balogh, L.; Tomalia, D. A. **1998**, *120*, 7355-7356.

- [20] Vogel, W.; Borse, P. H.; Deshmukh, N.; Kulkarni, S. K. *Langmuir* **2000**, *16*, 2032-2037. Gaponik, N.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Eychmüller, A.; Weller, H. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 803-806. Herron, N.; Calabrese, J. C.; Farneth, W. E.; Wang, Y. *Science* **1993**, *259*, 1426-1428. Kortan, A. R.; Hull, R.; Opila, R. L.; Bawendi, M. G.; Steigerwald, P. L.; Carrol, P. J.; Brus, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1327-1332. Green, M.; O'Brien, P. *Chem. Commun.* **1999**, 2235-2241.
- [21] Hyeon, T.; Lee, S.S.; Park, J.; Chung, Y.; Bin-Na.; H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798-12801 e riferimenti ivi citati. Boal, A. K.; Das, K.; Gray, M.; Rotello, V. M. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2628-2636. Sun, Shouheng, S.; Zeng, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205.
- [22] Mayya, K. S.; Patil, V.; Sastry, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 1757-1761.
- [23] Carotenuto, G.; Nicolais, L. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 1038-1041.
- [24] Niu, Y.; Crooks, R. M.; *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3463-3467. Crooks, R.M.; Zhao, M.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L. K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 181-190 e riferimenti ivi citati. Garcia-Martinez, J.; Scott, R. W. J.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11190-11191. Gopidas, K. R.; Whitesell, J. K.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6491-6502.
- [25] Thomas, K. G.; Zajicek, J.; Kamat, P. V. *Langmuir* **2002**, *18*, 3722-3727.
- [26] Qu, L.; Peng, Z. A.; Peng, X. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 333-337. Peng, Z. A.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 183-184. Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. *Science* **1995**, *270*, 1335-1338.
- [27] Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2754-2794. Spaltenstein, A.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686-687. Gupta, S.; Sampson, N. S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3333-3335.
- [28] J. S. Bradley, in *Clusters and Colloids*, ed. G. Schmid, VCH, Weinheim, **1994**, 469-473.
- [29] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, *147*, 145-153.
- [30] J. S. Bradley, in *Clusters and Colloids*, ed. G. Schmid, VCH, Weinheim, **1994**, 469-473; N. Toshima, T. Yonezawa, *New J. Chem.* **1998**, 1179-1201; J. D. Aiken III, R. G. Finke, *J. Mol. Catal. A* **1999**, *145*, 1-44.
- [31] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Disc. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55-75. J. Turkevich, G. Kim, *Science* **1970**, *169*, 873. J. Turkevich, *Gold Bulletin* **1985**, *18*, 86-91.
- [32] T. Leisner, C. Rosche, S. Wolf, et al., *Surf. Rev. Lett.* **1996**, *3*, 1105-1108.
- [33] Michael P. Rowe M.P., Plass K.E., Kim K., Kurdak C., Zellers E.T., Matzger A.J., *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3513-3517
- [34] Schmid, G.; Pfeil, P.; Boese, R.; Bandermann, F.; Meyer, S.; Calis, G. H. M.; van der Velden, J. W. A. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 3634-3642.
- [35] Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801-802.
- [36] Hernandez J, Solla-Gullon J, Herrero E, *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *574*, 185-196
- [37] Manna A, Imae T, Yogo T, Aoi K, Okazaki M *J. Coll. Int. Sci.*, **2002**, *256*, 297-303.
- [38] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- [39] Yee CK, Jordan R, Ulman, A, White H, King A, Rafailovich M, Sokolov J, *Langmuir* **1999**, *15*, 3486-3491.
- [40] Wang F.Y., *Foreign Med.* **1991**, *12*, 145.

-
- [41] Goia D.V., Matijević E., *Colloids Surf. A* **1999**, *146*, 139-152; Hirai H., *Macromol. Chem. Suppl.* **1985**, *14*, 55.
- [42] *Gmelin Handbook of Inorganic and Organometallic Chemistry*, vol. *Gold*, eighth ed., Springer-Verlag, Berlin, **1992**, p. 235.; Brown K.R., Natan M.J., *Langmuir* **1998**, *14*, 726; Wilcoxon J.P., Williamson R.L., Baughmann R., *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 9933.
- [43] Andreescu D, Sau TK, Goia DV, *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *298*, 742-751; Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700-15707
- [44] Richardson M. J., Johnston J. H., Borrmann T, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *12*, 2618-2623
- [45] Wagner J., Kohler J.M., *Nano Lett.* **2005**, *5*, 685; Heller W., Pugh T.L., *J. Polym. Sci.* **1960**, *47*, 203.
- [46] Bartlett, P. A., Bauer, B.; Singer, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5085-5089.
- [47] Hainfeld, J. F.; Furuia, F. R. *J. Histochem. Cytochem.* **1992**, *40*, 177.
- [48] Hainfeld, J, F. *Science* **1987**, *236*, 450.
- [49] Segon von Banchet, G.; Heppelman, B. *J. Histochem. Cytochem.* **1995**, *43*, 821.
- [50] Gregori, L.; Hainfeld, J. F.; Simon, M. N.; Goldgaber, D. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 58.
- [51] Skripkin, E.; Yusupova, G.; Yusupov, M.; Kessler, P.; Ehresman, C.; Ehresman, B. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *4*, 549.
- [52] Lipka, J. J.; Hainfeld, J. F.; Wall, J. S. *J. Ultrastruct. Res.* **1983**, *84*, 120.
- [53] Hainfeld, J. F.; Liu, W.; Halsey, C. M. R.; Freimuth, P.; Powell, R. D. *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 120.
- [54] Weare, W. W.; Reed, S. M.; Warner, M. G.; Hutchison, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12890-12891.
- [55] Stefanescu, D.M.; David S. Glueck, D.S.; e Siegel, R.; Roderick E.; Wasylshen, R.E. *Langmuir* **2004**, *20*, 10379-10381
- [56] (a) Johnson, S. R.; Evans, S. D.; Brydson, R. *Langmuir* **1998**, *14*, 6639-6647. (b) Chen, S.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 682-689.
- [57] Brust, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1655-1656.
- [58] Tan, Y.; Li, Y.; Zhu, D. *Langmuir* **2002**, *18*, 3392-3395.
- [59] Sandhyarani, N.; Pradeep, T. *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*, 981-986.
- [60] Shelley, E. J.; Ryan, D.; Johnson, S. R.; Couillard, M.; Fitzmaurice, D.; Nellist, P. D.; Chen, Y.; Palmer, R. E.; Prece, J. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 1791-1795.
- [61] (a) Yonezawa, T.; Yasui, K.; Kimizuka, N. *Langmuir* **2001**, *17*, 271-273. (b) Gopidas, K. R.; Whitesell, J. K.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6491-6502.
- [62] Shon, Y.-S.; Gross, S. M.; Dawson, B.; Porter, M.; Murray, R. W. *Langmuir* **2000**, *16*, 6555-6561.
- [63] Zhang, J.; Whitesell, J. K.; Fox, M. A. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2323-2331.
- [64] Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 27-36.
- [65] Templeton, A.C.; Wuelfing, W.P.; Murray, R.W. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 27-36. Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346. Shon, Y.-S.; Choo, H. *Organic Reactions of Monolayer-Protected Metal Nanoparticles*. In *Dendrimers and Nanosciences*; Astruc, D., Ed.; C. R. Chime: Paris, **2003**; Vol. 6, 1009-1018.
- [66] Paulini, R.; Frankamp, B.L.; Rotello, V.M. *Langmuir* **2002**, *18*, 2368-2373.
- [67] Foos, E.E.; Snow, A.W.; Twigg, M.E.; Ancona, M.G. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2401-2408.

-
- [68] Yonezawa, T.; Onoue, S.; Kimizuka, N. *Langmuir* **2001**, *17*, 2291-2293.
- [69] Choo, H.; Cutler, E.; Shon, Y.-S. *Langmuir* **2003**, *19*, 8555-8559.
- [70] Link, S.; Beeby, A.; FitzGerald, S.; El-Sayed, M.A.; Schaaff, T.G.; Whetten, R.L. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3410-3415.
- [71] Shon, Y.-S.; Mazzitelli, C.; Murray, R.W. *Langmuir* **2001**, *17*, 7735-7741; Porter, L.A., Jr.; Ji, D.; Westcott, S.L.; Graupe, M.; Czernuszewicz, R.S.; Halas, N.J.; Lee, T.R. *Langmuir* **1998**, *14*, 7378-7386.
- [72] Shelley, E.J.; Ryan, D.; Johnson, S.R.; Couillard, M.; Fitzmaurice, D.; Nellist, P.D.; Chen, Y.; Palmer, R.E.; Preece, J.A. *Langmuir* **2002**, *18*, 1791-1795; Hasan, M.; Bethell, D.; Brust, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1132-1133; Maye, M.M.; Chun, S.C.; Han, L.; Rabinovich, D.; Zhong, C.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4958-4959.
- [73] Suzuki, M.; Miyazaki, T.; Hisamitsu, H.; Kadoma, Y.; Morioka, Y. *Langmuir* **1999**, *15*, 7409-7410.
- [74] Shon, Y.-S.; Gross, S.M.; Dawson, B.; Porter, M.; Murray, R.W. *Langmuir* **2000**, *16*, 6555-6561; Shon, Y.-S.; Wuelfing, W.P.; Murray, R.W. *Langmuir* **2001**, *17*, 1255-1261.
- [75] Tzhayik, O.; Sawant, P.; Efrima, S.; Kovalev, E.; Klug, J.T. *Langmuir* **2002**, *18*, 3364-3369.
- [76] Gomez, S.; Philippot, K.; Collie`re, V.; Chaudret, B.; Senoeq, F.; Lecante, P. *Chem. Commun.* **2000**, 1945-1946.
- [77] Manea, F.; Bodar-Houillon, F.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165-6169.
- [78] Gucci, L.; Beck, A.; Horváth, D. *Top. Catal.* **2002**, *19*, 157-163. Králik, M.; Biffis, A. *J. Mol. Cat. A*, **2001**, *177*, 113-138.
- [79] Labande, A.; Ruiz, J.; Astruc, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1782-1789.
- [80] Watanabe, S.; Sonobe, M.; Arai, M.; Tazume, Y.; Matsuo, T.; Nakamura, T.; Yoshida, K. *Chem. Commun.* **2002**, 2866-2867.
- [81] Otsuka, H.; Akiyama, Y.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8226-8230. Si veda anche: Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 403-419.
- [82] De la Fuente, J.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3052-3055.
- [83] Elghanian, R.; Storhoff, J.J., Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078-1081.
- [84] Nam, J.-M.; Park, S.-J.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3820-3821.
- [85] Simard, J.; Briggs, C.; Boal, A. K.; Rotello, V. M. *Chem. Commun.* **2000**, 1943-1944
- [86] Fischer, N. O.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Rotello, V. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5018-5023.
- [87] Boal, A. K.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4914-4915. Boal, A. K.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 734-735.
- [88] Fantuzzi, G.; Pengo, P.; Gomila, R.; Ballestrer, P.; Hunter, C. A.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Chem. Commun.* **2003**, 1004-1005.
- [89] Bunton, C.; Nome, F.; Quina, F. H.; Romsted, L. S. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 358-364.
- [90] Murakami, Y.; Kikuchi, J.-I.; Hisaeda, Y.; Hayashida, O. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 721-758. Murakami, Y.; Hisaeda, Y.; Song, X.-M.; Ohno, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 1527. Groves, J. T.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2900-2909. Groves, J. T.; Ungashe, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*,

-
- 7796-7797. Ueoka, R.; Matsumoto, Y.; Moss, R. A.; Swarup, S.; Sugii, A.; Harada, K.; Kikuchi, J.; Murakami, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1588-1595.
- [91] Suh, J.; Hah, S.; *S. J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10088-10093. Liu, L.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4978-4979. Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9578-9579. Delaney, E. J.; Leigh, E. W.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 799-807. Spetnagel, W. J.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 8199-8204. Klotz, I. M.; Stryker, V. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2717-2719.
- [92] Wulff, G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1-27. Suh, J.; Hah, S. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10088-10093. Sellergren, B.; Karmalkar, R. N.; Shea, K. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4009-4027.
- [93] Bunton, C. A.; Romsted, L. S.; Thamavit, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3900-3903. Bunton, C. A.; Hamed, F. H.; Romsted, L. S. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2103-2108.
- [94] (a) Simmons, M. R.; Patrickios, C. S. *Macromolecules*, **1998**, *31*, 9075-9077. (b) Kunitake, T.; Shimada, F.; Aso, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2716-2723. (c) Kunitake, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4256-4263. (d) Kunitake, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4247-4255.
- [95] Overberger, C. G.; Pierre, T. St.; Vorchheimer, N.; Lee, J.; Yaroslavsky, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 296-301. Suh, J. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 562-570.
- [96] Klotz, I. M.; Royer, G. P.; Sloniewsky, A. R. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4752-4756.
- [97] Schultz, P. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 287-294. Pollack, S. J.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1929-1931. Tanaka, F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4885-4906.
- [98] Pasquato, L.; Rancan, F.; Scrimin, P.; Mancin, F.; Frigeri, C. *Chem. Commun.* **2000**, 2253-2254.
- [99] Pasquato L, Pengo P, Scrimin P *Supramolecular Ch* **2005** *17* (1-2), 163-171
- [100] Pengo, P.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 2521-2524.
- [101] Li, H.; Luk, Y.-Y.; Mrksich, M. *Langmuir* **1999**, *15*, 4957-4959.
- [102] Non è possibile distinguere tra i due meccanismi con i dati sperimentali finora raccolti.
- [103] L. Pasquato, P. Scrimin, F. Manea, F. Bodari *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 6165-6169.
- [104] P. Pengo, S. Polizzi, L. Pasquato, P. Scrimin *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1616-1617.
- [105] P. Pengo, L. Baltzer, L. Pasquato, P. Scrimin *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 400-404.
- [106] F. Manea, C. Bindoli, F. Mancin, P. Scrimin, *Adv. Mat.*, **2008**, *20* (22), 4348-4352.
- [107] M. C. Daniel, D. Astruc; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346.
- [108] E. Boisselier, L. Salmon, J. Ruiz, D. Astruc; *Chem. Comm.* **2008**, 5788-5790.
- [109] Stites, W.E.; *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.
- [110] Kitov, P.I.; Bundle, D.R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271-16284.
- [111] Lee, R.T.; Lin, P.; Lee, Y.C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4255-4261.
- [112] Gestwicki, J.E.; Cairo, C.W.; Strong, L.E.; Oetjen, K.A.; Kiessling, L.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [113] Ehrlich, P.H. *J. Theor. Biol.* **1979**, *81*, 123-127.
- [114] Mammen, S. K. Choi, G. M. Withesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.
- [115] Seok-Ki Choi, *Synthetic Multivalent Molecules, Concepts and Biomedical Applications*. Wiley, **2004**
- [116] H. L. Handl, J. Vagner, H. Han, E. Mash, V. J. Hruby, R. J. Gillies, *Expert Opin. Ther. Targets*,

2004, 8, 565-586.

[117] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2348-2368.

[118] Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 174-183.

[119] Pasquato, L.; Rancan, F.; Scrimin, P.; Mancin, F.; Frigeri, C. *Chem. Commun.* **2000**, 2253-2254.

[120] Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; *Chem. Commun.* **2005**, 2540-2548.

[121] Williams, N.H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485-493.

[122] Morrow, J.R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 192-200.

[123] Livieri, M.; Mancin, F.; Saielli, G.; Chin, J.; Tonellato, U. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2246-2256.

[124] Scarso, A.; Zaupa, G.; Bodar Houillon, F.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 376-385.

[125] Manea, F.; Bodar-Houillon, F.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165-6169.

[126] M. Brust, D. J. Schiffrin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801.

[127] F. Manea, C. Bindoli, P. Scrimin, *Langmuir*, **2008**, *24* (8), 4120-4124.

[128] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004.

[129] J. L. Brennan, N. S. Hatzakis, A. E. Rowan, M. Brust, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 1373-1375.

[130] D. A. Flemming, C. J. Thode, M. E. Williams, *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 2327-2334.

[131] E. Boisselier, D. Astruc, *Chem. Commun.* **2008**, 5788-5790.

[132] C.D. Hahn, C. Leitner, R. Tamp, T. Weinbrenner, M. Hlzl, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18* (1), 247-253.

[133] Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 174-183.

[134] Pengo, P.; Baltzer, L.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 400-404

[135] Manea, F.; Bodar-Houillon, F.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165-6169.

[136] Morrow, J.R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 192-200.

[137] S. De Falco, M. G. Ruvoletto, A. Verdoliva, M. Ruvo, A. Raucci, M. Marino, S. Senatore, G. Cassani, A. Alberti, P. Pontisso, G. Fassina, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276* (39): 36613-36623.

[138] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801.

[139] C.D. Hahn, C. Leitner, R. Tamp, T. Weinbrenner, M. Hlzl, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18* (1), 247-253.

[140] F. Manea, C. Bindoli, S. Polizzi, L. Lay, P. Scrimin, *Langmuir*, **2008**, *24* (8), 4120-4124.

[141] G. Zaupa, C. Mora, R. Bonomi, L. J. Prins, P. Scrimin; *Chemistry - A European Journal*, **2011**, *17* (17), 4879-4889.

[142] A. Adronov, S. L. Gilat, J. M. J. Fréchet, K. Ohta, F. V. R. Neuwahl, G. R. Fleming, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 1175-1185.

-
- [143] R. Bonomi, A. Cazzolaro, A. Sansone, P. Scrimin, and L. J. Prins, *Angew. Chem. - Int. Ed.*, **2010**, 50 (10): 2307-2312.
- [144] R. Bonomi, A. Cazzolaro, L. J. Prins, *Chem Comm.*, **2011**. 47 (1) : 445-4477.
- [145] Miranda, O. R. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 5285-5289.
- [146] S. De Falco, M. G. Ruvoletto, A. Verdoliva, M. Ruvo, A. Raucci, M. Marino, S. Senatore, G. Cassani, A. Alberti, P. Pontisso, G. Fassina, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 (39), 36613-36623.
- [147] G. Schneider, G. Decher, *Nano Lett.*, **2006**, 6 (3), 530-536.

RIASSUNTO

Questo progetto si inquadra nell'ambito della nanomedicina. Sfruttando sistemi multivalenti esso si propone di ottenere nanostrutture che siano in grado di riconoscere specificatamente le cellule tumorali epatiche. La multivalenza, molto frequente in natura, si basa sulla capacità di un sistema di instaurare molteplici interazioni deboli, ottenendo un'interazione complessiva superiore rispetto al singolo legame forte. Essa si presta ad essere utilizzata in applicazioni pratiche come il riconoscimento molecolare e la catalisi. Tra i vari sistemi multivalenti artificiali utilizzabili (dendrimeri, micelle, liposomi ...), la scelta è ricaduta sulle nanoparticelle d'oro: esse sono piccoli nuclei di atomi d'oro con diametri che tipicamente variano da 1 a 20 nanometri, che possono facilmente essere funzionalizzate tramite l'autoassemblaggio di un monostrato di molecole sulla superficie. Tale monostrato può portare sulla superficie esterna gruppi funzionali di interesse, dotati di capacità catalitica o di riconoscimento. Per legare le molecole del monostrato organico ai nuclei d'oro è stata utilizzata l'interazione oro-zolfo; lo zolfo, infatti, lega l'oro con un legame più forte rispetto alla maggior parte degli altri elementi, come azoto e fosforo. La ricerca descritta in questa tesi si è focalizzata sull'ottenimento di un sistema nanoparticellare "universale", cioè un sistema che si presta ad una post-funzionalizzazione dopo la sintesi e la purificazione. Tale post-funzionalizzabile deve essere compatibile con la sopravvivenza delle nanoparticelle stesse, permettendo di assemblarvi un monostrato misto sulla sua superficie. L'ottenimento di un metodo di riconoscimento per le cellule tumorali epatiche sarebbe stato un ottimo campo di prova per verificare in tal senso le capacità del sistema.

Innanzitutto è stata verificata la possibilità di ottenere nanoparticelle funzionalizzabili tramite legami covalenti. Per farlo, sono state sintetizzate AuNPs ricoperte con tioli dotati di gruppi aldeidici all'estremità, in grado di reagire in modo quantitativo con ammine tramite la formazione di legami imminici.. I gruppi aldeidici, però, sono facilmente soggetti agli attacchi nucleofili da parte dei tioli a livello del loro carbonile elettrofilo. È stato quindi necessario trovare un sistema di protezione delle aldeidi da rimuovere dopo la sintesi. Le prime aldeidi erano aromatiche, protette in forma di acetale metilico, scelte per la loro capacità di formare immine con alta stabilità termodinamica. Purtroppo non sono stati superati gli ostacoli della deprotezione del gruppo protettore dovuto ad un'eccessivamente stabilità. Questa alta stabilità era in

parte dovuta alla presenza di un gruppo nitro in posizione para rispetto all'aldeide, inserito per aumentarne la reattività. Rinunciando a tale gruppo funzionale, invece, la protezione stessa è risultata troppo labile, incapace di impedire la polimerizzazione dei tioli prima dell'ottenimento delle NPs. Si è quindi passati all'utilizzo di aldeidi alifatiche. Si è provato a sintetizzare nanoparticelle ricoperte con tioli la cui aldeide terminale fosse protetta come dietilacetale, ma si è andati incontro a numerosi problemi di insolubilità. L'utilizzo di dioli ossidabili ad aldeidi non ha dato migliori risultati. Cambiando approccio, si è cercato di sfruttare la sostituzione nucleofila su AuNPs ricoperte con tioli bromurati. Purtroppo, la post-funzionalizzazione con ammine ha avuto come risultati la sola formazione di prodotti insolubili. Infine, la sintesi di nanoparticelle ricoperte con tioli aventi, nell'estremità esterna del monostrato, acidi carbossilici ha dato ulteriori problemi di solubilità, fossero essi in monostrati misti con tioli alchilici oppure no.

Visto l'insuccesso della via covalente ci si è successivamente concentrati sull'utilizzo di interazioni elettrostatiche per la funzionalizzazione di AuNPs. Sono state sintetizzate nanoparticelle ricoperte con un monostrato cationico, composto da tioli dotati di gruppi ammoniacali oppure di gruppi TACN·Zn(II). Esse sono state usate come AuNPs "universali", per poi essere coperte con molecole oligoanioniche tramite la formazione di complessi ad alta affinità. Il metodo scelto per la rilevazione della formazione di questi complessi è stata la fluorescenza, sfruttando il principio secondo il quale una sonda fluorescente vede smorzata la propria emissione in prossimità di una nanoparticella d'oro. Come sonde sono state scelte cumarina 343 ($\lambda_{\text{eccitazione}}$ 450, $\lambda_{\text{emissione}}$ 492) e cumarina 2 ($\lambda_{\text{eccitazione}}$ 353, $\lambda_{\text{emissione}}$ 450), entrambe legate a un oligopeptide anionico formato da tre acidi aspartici (TriAsp-Cum343 e TriAsp-Cum2). Con esse è stata studiata la possibilità di formare un secondo monostrato eterofunzionalizzato, sfruttando il fenomeno FRET. Esso si basa sulla capacità di due fluorofori di comunicare tra loro quando si trovano vicini. Negli esperimenti effettuati, è stata registrata l'emissione della ricevente (cum343) eccitando solamente la donatrice (cum2). Questo è stato fatto in presenza di diversi rapporti percentuali tra le due molecole, alla concentrazione di saturazione del monostrato. Gli esperimenti sono stati condotti anche in presenza di un grande eccesso di ATP, oppure in assenza di nanoparticelle cationiche. Da queste prove è emerso che, quando co-localizzate sullo stesso monostrato, le due sonde fluorescenti sono in grado di generare un segnale FRET. Quando invece sono libere in soluzione, per assenza di

nanoparticelle o perché in presenza di un eccesso del competitore ATP, non è stato osservato il medesimo effetto. Il risultato ottenuto ha mostrato che, tramite interazioni elettrostatiche, è possibile assemblare un monostrato eterofunzionalizzato su nanoparticelle “universali” pre-sintetizzate.

A questo punto si è proceduto allo sviluppo di un sistema nanoparticellare coperto con il peptide preS1 per il riconoscimento della proteina SCCA. Il peptide preS1 è noto per la capacità di riconoscere specificatamente SCCA, una proteina di membrana sovraespressa negli epatociti cancerosi. Innanzitutto è stato verificato quale fosse la diversa affinità per le AuNPs-TACN·Zn(II) da parte del peptide tal quale piuttosto che legato all’ancora anionica TriAsp⁴. Sono state effettuate prove di fluorescenza diretta ($\lambda_{\text{eccitazione}} = 280$, $\lambda_{\text{emissione}} = 360$, smorzamento del triptofano), fluorescenza indiretta ($\lambda_{\text{eccitazione}} = 305$, $\lambda_{\text{emissione}} = 370$, spiazzamento F-ATP) e di inibizione della catalisi di HPNP operata dai gruppi TACN·Zn(II) (con liberazione di *p*-nitro-fenato, assorbanza 400 nm). Tutti e tre gli esperimenti hanno dimostrato la capacità di TriAsp-preS1 di formare un complesso polivalente con le nanoparticelle. È stato osservato che la presenza della sequenza TriAsp ha causato un piccolo miglioramento dell’affinità rispetto al peptide privo dell’ancora anionica. Successivamente è stato verificato il legame del sistema nanoparticella-peptide con la proteina SCCA. Il peptide preS1, quando si trova in forma tetrameric, è in grado di legare con maggiore affinità la proteina SCCA. È stato quindi teorizzato che la presenza della proteina SCCA dovesse stabilizzare il nanosistema composto da nanoparticelle e preS1. Purtroppo non sono state rilevate grandi differenze di stabilità in presenza o in assenza di SCCA, sia per il peptide preS1 che per TriAsp-preS1. Il metodo di analisi basato su studi di spiazzamento è stato quindi accantonato, poiché non garantiva una valida valutazione dell’interazione. Sono stati usati altri metodi per verificare l’interazione del sistema nanoparticella-peptide con la proteina. Tramite analisi DLS è stato visualizzato l’aumento di volume delle nanoparticelle a seguito del legame col peptide prima e con la proteina poi, ma fenomeni di aggregazione hanno reso poco attendibili le misurazioni. Analisi SPR, invece, miravano a quantificare l’intensità dell’interazione tra il sistema nanoparticella-peptide e la proteina SCCA sfruttando la variazione della banda plasmonica superficiale. Questo non è stato possibile a causa di interazioni aspecifiche tra le nanoparticelle e il supporto di destrano del sistema di analisi. Il tempo a disposizione non ha poi permesso di mettere a punto un protocollo di analisi adeguato.

SUMMARY

This project is carried out within the context of nano medicine, which is the branch of research that tries to implement nanotechnology for therapeutic applications. The specific target of this project was the development of artificial multivalent systems for the selective recognition of liver cancer cells. Multivalency, which is very common in nature, relies on the ability of a system to develop multiple interactions with a target, resulting in a very high overall binding strength. Among various synthetic multivalent systems available (dendrimers, micelles, liposomes, ...) it was chosen to use gold nanoparticles as a multivalent scaffold. These are small cluster of gold atoms with dimensions that typically vary between 1 and 20 nanometers, which can be covered with a monolayer of organic molecules. The monolayer is spontaneously formed upon the addition of molecules able to form a stable bond with the gold surface. Terminal functional groups on these molecules are exposed to the solvent and can be used for recognition or catalytic purposes. For the formation of the monolayer, it was relied on the gold-sulfur interaction, which is sufficiently strong to provide for stability under physiologically relevant conditions. The particular research target of this project was the development of 'universal' nanoparticles, which are intended as a class of monolayer protected Au nanoparticles that can be further functionalized after their synthesis and purification. Here, the key issue is the development of a post-functionalization reaction compatible with the stability of the nanoparticles. For this purpose the liver cancer cells form an attractive biological target as it is known that multiple copies of the preS1 peptide bind strongly to the transmembrane protein SCCA localized on the surface of the cells.

A first approach was aimed at obtaining monolayer protected gold nanoparticles that could be further functionalized through covalent bond formation. For that purpose, gold nanoparticles coated with aldehyde-terminating thiols were investigated, since the aldehyde-group is perfectly suited for covalent imine-bond formation with amines. As the aldehyde group is prone to nucleophilic attack by thiols, this approach critically relies on the use of appropriate protecting groups. At first, aromatic aldehydes, protected as dimethyl acetal, were studied, since these form particularly stable imines. Regrettably, after monolayer formation it appeared impossible to remove the aldehyde protecting group without destroying the nanoparticle system. This problem found its

origin in the excessive stability of the protecting group owing to the presence of a nitro-group in para-position. However, removal of the nitro-group created the opposite problem of a protecting group with too low stability unable to protect the aldehyde against nucleophilic attack. Subsequently, it was tried to synthesize nanoparticles containing aliphatic aldehydes as end groups, but in this case only insoluble products were obtained. Identical problems were obtained when it was tried to oxidize vicinal diols to aldehydes. Abandoning the aldehyde pathway, it was tried to perform post-functionalization reactions through a nucleophilic attack of amines on gold nanoparticles coated with brominated thiols. Also these attempts yielded exclusively insoluble products. Finally, also the use of carboxylic acid as a reactive group proved unsuccessful for the same reason, independent whether the carboxylic acid was used in a mixed monolayer or not.

The low success of the covalent post-functionalization approach led us to consider a noncovalent alternative, relying on the use of electrostatic interactions between small oligoanions and a cationic monolayer. For this purpose, gold nanoparticles coated with a cationic monolayer composed of thiols terminating with ammonium of TACN·Zn(II) groups were used. The interaction between oligoanionic peptide sequences was studied using fluorescence, taking advantage of the fact that gold nanoparticles quench the fluorescence of bound fluorophores. In order to study the possibility of forming a heterofunctionalized surface on top of the monolayer, two probes were prepared consisting of either coumarin 343 or coumarin 2 linked to an oligopeptide composed of three aspartic acids. These fluorophores were chosen for their ability to give fluorescence resonance energy transfer (FRET) when in close proximity. In the experiments, the fluorescence emission of the receiver (cum 343) was measured upon exciting the donor (cum2). This was done for various ratios of the probes at a constant surface saturation concentration of the monolayer surface. From these studies it emerged that, when anchored on the cationic surface, the probes are able to communicate with each other. In the absence of gold nanoparticles, or in the presence of a large excess of ATP, a strong competitor for binding, FRET was not detected. This provides unequivocal evidence for the possibility of creating a multivalent heterofunctionalized surfaces relying on a double self-assembly strategy.

The final part of the research project was then dedicated to the development of a peptide-nanoparticle conjugate using the developed strategy. The peptide pre S1 (21-

47) is known for its ability to recognize specifically SCCA, a transmembrane protein overexpressed in cancerous hepatocytes. The first studies were aimed at studying the possibility of ligating multiple copies of the preS1 peptide to the surface of cationic gold nanoparticles. The difference in binding affinity of preS1 and preS1 equipped with an anionic triAsp tail were studied by a series of experiments, relying on direct fluorescence titrations ($\lambda_{\text{excitation}} = 280$, $\lambda_{\text{emission}} = 360$), fluorescence displacement studies ($\lambda_{\text{eccitazione}} = 305$, $\lambda_{\text{emissione}} = 370$), and inhibition studies of TACN·Zn(II) catalysed hydrolysis (measuring the release of *p*-nitrophenate, absorbance 400 nm). All these studies not only confirmed the possibility of forming a multivalent peptide-nanoparticle structure through self-assembly, but also pointed to a slight stabilizing effect of the triAsp anionic tail. Next the ability of the system to interact with SCCA was investigated. From literature studies it is known that the preS1 peptide in tetrameric form has a higher affinity for SCCA compared to the single peptide. It was thus hypothesized that the presence of SCCA would cause an enhanced stabilization of the nanoparticle-peptide complex. Regrettably, from fluorescence displacement studies it was impossible to obtain evidence that this was indeed the case. No difference in stability was observed for the same system in the presence or absence of SCCA. Since the assay was not conclusive, the stability of the system was studied using a series of other analytical techniques. DLS measurements provided the increase of hydrodynamic radius of the system as consequence of complex formation, but aggregation phenomena made these data difficult to interpret. SPR analysis was used to quantify the strength of interaction using the variation of the surface plasmon resonance band of a functionalized gold chip. In this case, unspecific binding interactions of the nanoparticles and the dextran layer of the gold chip prevented an analysis of the binding event.

In conclusion, the research described in this thesis has led towards the development of multivalent peptide-nanoparticle conjugates that can be obtained through a hierarchical self-assembly process. In the first step, an organic monolayer is spontaneously formed on the surface of gold nanoparticles. Subsequently, oligoanionic peptide sequences spontaneously cover the surface through electrostatic interactions with the monolayer. The formation of multivalent peptide surfaces has been demonstrated, but their effective application in multivalent recognition has proven difficult for the lack of an appropriate analytical readout system.