

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

Scuola di Dottorato in Scienze Molecolari

Indirizzo: Scienze Chimiche

CICLO XXVI

Tesi di dottorato:

**Monostrati organici supportati su nanoparticelle d'oro
per catalisi e riconoscimento molecolare**

Direttore della Scuola : Prof. Antonino Polimeno

Supervisore : Prof. Leonard Jan Prins

Dottorando : Alessandro Cazzolaro

“Considerate la vostra semenza,
fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza”

Inferno, Canto XXVI

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	15
1.1 Overview	15
1.2 Self-Assembly e Self-Assemble Monolayers	16
1.3 Nanoparticella d'oro	19
1.4 Proprietà delle nanoparticelle d'oro	21
1.4.1 Banda Plasmonica di Superficie (SPB)	21
1.4.2 FRET e NSET su nanoparticelle d'oro	24
1.5 Catalisi mediata da nanoparticelle d'oro	27
1.6 Riferimenti	38
2. STUDIO E CARATTERIZZAZIONE DI MONOSTRATI ORGANICI SU NANOPARTICELLE D'ORO	43
2.1 Introduzione al progetto di dottorato	43
2.2 Sintesi dei tioli C6TACN, C9TACN, C12TACN	45
2.3 Sintesi di nanoaparticelle d'oro passivate da tioli C6TACN, C9TACN, C12TACN	47
2.4 Caratterizzazione di nanoparticelle d'oro C6TACN, C9TACN, C12TACN	50
2.4.1 Dimensione dei cluster d'oro: microscopia elettronica a trasmissione	50
2.4.2 Stato di aggregazione: analisi UV-Vis	52
2.4.3 Dimensioni delle nanoparticelle: Dynamic Light Scattering	54
2.4.4 Rapporto parte organica/inorganica: analisi termogravimetria	55
2.4.5 Analisi qualitativa del monostrato: analisi 1H-NMR	58
2.5 Determinazione della concentrazione di gruppi terminali	62
2.5.1 Determinazione di [TACN] mediante NMR con standard interno	62
2.5.2 Conferma di [TACN] mediante titolazione per catalisi con Zn(II)	63
2.5.3 Conferma di [TACN] mediante titolazione diretta con Cu(II)	65
2.6 Valutazione dell'attività catalitica di Au NPs C6TACN, C9TACN, C12TACN	66
2.7 Titolazione di nanoparticelle d'oro C6TACN, C9TACN, C12TACN con oligoanioni fluorescenti	71
2.8 Conclusioni	79
2.9 Sviluppi futuri	80
2.10 Parte Sperimentale	81

2.10.1	Materiali	81
2.10.2	Strumentazione	82
2.10.3	Procedure di sintesi	84
2.10.4	Metodi	96
2.11	Riferimenti	106
3.	STABILITA' DI NANOSISTEMI PER CATALISI E RICONOSCIMENTO MOLECOLARE	107
3.1	Introduzione	107
3.2	Stabilità della soluzione di nanoparticelle d'oro	108
3.2.1	Variazioni dimensionali e morfologiche del cluster d'oro	108
3.2.2	Variazioni dimensionali della nanoparticella	110
3.3	Stabilità temporale dei parametri cinetici	111
3.4	Stabilità della concentrazione di saturazione di oligoanione fluorescente sul monostrato	114
3.5	Conclusioni	117
3.6	Parte sperimentale	118
3.6.1	Reagenti, strumentazioni e metodi	118
3.7	Riferimenti	119
4.	Influenza del diametro della nanoparticella sull'attività catalitica	120
4.1	Sintesi di Au NPs C9TACN 13 nm	120
4.2	Caratterizzazione di Au NPs C9TACN 13 nm	122
4.2.1	Dimensioni e morfologia dei cluster d'oro	122
4.2.2	Dimensioni e stato di aggregazione delle nanoparticelle d'oro	123
4.2.3	Assorbimento Uv-Vis di Au NPs C9TACN 13 nm e stabilità a condizioni operative catalitiche	125
4.2.4	Determinazione qualitativa del campione	128
4.2.5	Determinazione di [TACN] in soluzione	129
4.3	Cinetica a concentrazione variabile di substrato	132
4.4	Conclusioni e prospettive future	133
4.5	Parte sperimentale	134
4.5.1	Sintesi di Au NPs C9TACN 13 nm	134
4.5.2	Caratterizzazione di AU NPs C9TACN 13 nm	135
4.6	Riferimenti	142
5.	Appendice	144

Riassunto

Nel corso dei decenni le nanoparticelle d'oro si sono dimostrate supporti estremamente attraenti per la realizzazione di sistemi ibridi inorganici-organici, sfruttando l'interazione stabile che si crea tra superfici d'oro e particolari classi di molecole organiche (come ammine, fosfonati o tioli) per formare monostrati autoassemblati.^[1]

Questo tipo di sistemi è stato sfruttato ampiamente per una vasta gamma di applicazioni, tra cui spicca la realizzazione di catalizzatori organici nano-supportati. La motivazione dietro l'interesse verso le nanoparticelle d'oro per applicazioni catalitiche risiede nella versatilità della realizzazione del monostrato, virtualmente applicabile ad ogni tipo di reazione catalizzata da molecole organiche, e dall'enorme rapporto superficie/volume dei colloidali d'oro.^[2]

In un recente lavoro di Prins et al.^[3], impiegando un sistema catalitico ideato da Scrimin et al. per l'idrolisi di fosfodiesteri^[4], si utilizzano nanoparticelle d'oro di 2 nm di diametro che espongono complessi di 1,4,7-triazaciclononano-Zn(II) come effettori di uno strumento di *sensing* per enzimi proteolitici. Tale sistema si basa sull'inibizione della reazione di transfosforilazione di HPNP (2-idrossipropil-4-nitrofenil fosfato) promossa dalle nanoparticelle ed osservabile per via spettrofotometrica seguendo la liberazione della molecola reporter p-nitrofenato, dovuta all'interazione tra la nanoparticella d'oro e oligopeptidi carichi negativamente. L'oligopeptide agisce nel doppio ruolo di inibitore della nanoparticella e di substrato enzimatico, regolando il sistema dipendentemente dalla presenza o meno di un enzima in grado di degradarlo in frammenti a carica inferiore che non inibiscono efficacemente la nanoparticella.

L'interesse verso il perfezionamento di tale sistema ha spinto allo studio discusso in questo elaborato di tesi, utilizzando la catalisi della transfosforilazione di HPNP e la capacità di interazione con oligoanioni come strumenti diagnostici di monostrati organici analoghi. Lo studio ha portato alla sintesi di tre building blocks organici, in cui il residuo tiolico e il macrociclo sono separati da catene alchiliche di diverse lunghezze (6, 9, 12 atomi di carbonio). In prima analisi viene discussa la sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle d'oro passivate con i tre tioli (C6TACN, C9TACN, C12TACN), in cui si evidenziano poche differenze in termini qualitativi tra Au NPs C9TACN e Au NPs C12TACN. Au NPs C6TACN dimostrano un monostrato più densamente popolato,

probabilmente dovuto ad interazione laterali reciproche più efficienti tra i tioli all'interno del monostrato.

La valutazione della catalisi dei tre sistemi sulla reazione modello ha evidenziato una similitudine tra Au NPs C9TACN e Au NPs C12TACN in termini di attività catalitica (k_{cat}) ed interazione con il substrato (K_M), senza discostarsi in maniera rilevante dai sistemi studiati nei lavori precedenti, dotati di un tiolo più lungo.^[5] Au NPs C6TACN, nonostante mantenga pressochè inalterato k_{cat} rispetto ai due sistemi analoghi, presenta un K_M di circa tre volte più elevato, indice di interazione più debole del sistema col substrato.

Al fine di studiare il processo di binding tra nanoparticella e oligoanione in maniera più ampia si è ricorso allo studio dell'interazione delle nanoparticelle sintetizzate con oligoanioni fluorescenti, sfruttando il peculiare quenching della luminescenza mediato dai core d'oro per determinare la concentrazione di saturazione del monostrato.^[6]

L'utilizzo di un primo probe fluorescente (fATP), in cui l'interazione con la nanoparticella è mediato in larga misura da carica elettrostatica, ha evidenziato differenze minime tra i tre diversi campioni. Utilizzando un probe (MANT-AMP) in cui vi è un bilancio tra interazione elettrostatica (con la superficie del monostrato) ed idrofobica^[7] (con la parte alchilica interna del monostrato) si sono evidenziate differenze sostanziali tra Au NPs C6TACN e Au NPs C9TACN. Tale esperimento è risultato in una assenza di quenching per Au NPs C12TACN, verificando l'avvenuto binding con un esperimento di displacement indipendente. Il fenomeno è ritenuto imputabile ad un orientamento sfavorevole al quenching del probe nel monostrato.

Lavorando in assenza di Zn(II) e a pH nettamente basico al fine di mantenere il monostrato privo di carica, si è potuto osservare una totale assenza di interazione tra MANT-AMP e Au NPs C6TACN, confermando come la differente natura del monostrato giochi un ruolo nell'interazione con molecole organiche che va al di là dell'interazione elettrostatica, riscontrabile anche nell'interazione con il substrato catalitico. Questo effetto, seppur sicuramente attribuibile a differenze nella struttura del building block componente il monostrato, può essere dovuto sia al diverso spessore del monostrato sia alla particolare densità del monostrato stesso per Au NPs C6TACN.

Le performances catalitiche e di binding per oligoanioni dei tre sistemi sono state testate in un arco di tempo di 4 mesi per stabilire quale sistema mantenesse tali parametri nel tempo, allo scopo di ottenere informazioni sulla stabilità dei tre sistemi. Tutti i sistemi si

sono rivelati relativamente ben stabili nel tempo, senza dimostrare aggregazione o deterioramento consistente dei parametri osservati. Au NPs C9TACN, contrariamente ai sistemi analoghi, non ha dimostrato alcuna variazione apprezzabile nei valori osservati, confermandosi il sistema più robusto.

In ultima analisi è stato preso in considerazione il ruolo delle dimensioni della nanoparticella nell'evento catalitico. La sintesi e caratterizzazione di un sistema composto da nanoparticelle di 13 nm di diametro e passivato da tiolo C9TACN ha permesso di confrontarne le performance catalitiche con quelle del sistema analogo utilizzato nello studio precedente. I risultati dimostrano come il sistema sia ancora cataliticamente attivo, con un netto peggioramento dell'attività catalitica e del binding del substrato rispetto all'analogo supportato su nanoparticelle di diametro 2 nm. Questi risultati possono essere imputati alla mancanza di "hot spot" catalitici presenti in nanoparticelle piccole e con curvature accentuate.

Riferimenti:

- [1]. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103;
- [2]. Pieters, G.; Prins, L. J., *New J. Chem.* **2012**, 36 (10), 1931-1939;
- [3]. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Sansone, A.; Scrimin, P.; Prins, L. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2307;
- [4]. Manea, F.; Houillon, F. B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6165;
- [5]. Zaupa, G.; Mora, C.; Bonomi, R.; Prins, L. J.; Scrimin, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17 (17), 4879-4889;
- [6]. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Prins, L. J., *Chem. Commun.* **2011**, 47 (1), 445-447;
- [7]. Pieters, G.; Pezzato, C.; Prins, L. J., *Langmuir* **2013**, 29 (24), 7180-7185.

Abstract

During the last decades gold nanoparticles have proven to be an attractive scaffold for the realization of inorganic-organic hybrid systems. This occurs by exploiting the stable interaction between gold surfaces and different classes of functional groups (like amines, phosphonates and -in particular- thiols) in order to prepare self-assembled monolayers.^[1]

This kind of system has been used in a wide range of applications in nanomedicine, diagnostics and nanotechnology. It has also become an attractive platform for the development of innovative, nanoparticle-based catalysts. This is motivated by different features of the gold nanoparticles, such as the ease and versatility of preparation, the possibility to retrieve the catalyst from solution and the high surface to volume ratio of gold colloids.^[2]

In a recent contribution by Prins et al.^[3] a model of artificial nuclease, based on TACN-Zn(II)-bearing 2 nm diameter nanoparticles, initially developed by Scrimin et al.^[4], has been exploited as a sensing tool for the detection of proteolytic enzymes in solution. The sensing mechanism relies on the inhibition of the transphosphorylation reaction of the substrate HPNP (2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate), which can be followed spectrophotometrically as the reporter molecule p-nitrophenate is released, due to the interaction between the nanoparticles and a negatively charged oligopeptide. The oligopeptide plays a double role in the system by acting both as a nanoparticle inhibitor (by blocking access to the substrate to the catalytic sites on the surface of the monolayer) and an enzymatic substrate. The cleavage of the oligopeptide allows for the regulation of the catalytic behavior of the system, depending on the presence of the specific enzyme, since the lesser charged fragments are not good inhibitors of the catalyst.

The interest towards the improvement of this system has directed the research presented in this thesis, in particular focusing on the role and stability of the monolayer. These studies relied on the analysis of the catalytic parameters and the binding of oligoanions of structurally related monolayers supported on gold nanoparticles. The first step of this research project was aimed at the synthesis of three organic building blocks,

in which the thiol moiety and the macrocycle are separated by alkyl chains of different lengths (6, 9, 12 carbon atoms). The preparation and characterization of three batches of gold nanoparticles, each coated with one of the thiols, demonstrated a similar behaviour for Au NPs C9TACN and Au NPs C12TACN, whereas Au NPs C6TACN showed a denser monolayer presumably due to a more efficient lateral interaction between thiols. The evaluation of the catalytic activity in this model reaction mediated by the three systems showed the similarity between Au NPs C9TACN and Au NPs C12TACN in terms of intrinsic catalytic activity (k_{cat}) and interaction with the substrate (K_M), in good agreement with published data referred to a monolayer composed of longer thiols.^[5] Au NPs C6TACN exhibited a similar value of k_{cat} , but displaying a K_M value that was 3-fold higher, indicative of the weaker interaction between the nanoparticles and the substrate.

In order to study this phenomenon in more detail, the interaction between gold nanoparticles and fluorescent oligoanion was studied. Exploiting the quenching of luminescence mediated by the gold cores, it was possible to observe differences in the saturation concentration of the monolayer for different fluorescent probes. A first probe (fATP), known for a predominantly electrostatic interaction with the surface of the monolayer^[6], gave hardly any differences between the three nanosystems. However a different probe (MANT-AMP), that binds the monolayer as a result of both electrostatic and hydrophobic interaction^[7], clear differences were observed between Au NPs C6TACN and Au NPs C9TACN.

By working in absence of Zn(II) at basic pH, in order to keep the monolayer uncharged, we were able to observe the lack of interaction between MANT-AMP and Au NPs C6TACN, confirming that for this system the apolar part of the monolayer does not participate to the binding process as we observed in the binding to the catalytic substrate. This is in agreement with the higher K_M values observed in the catalysis experiments. Nonetheless these experiments do not reveal whether this is a consequence of the different thickness of the monolayer or whether it's due to the peculiar density of the Au NPs C6TACN's monolayer.

Next, the binding and catalytic performances of the three systems were assessed over a time span of four months in order to understand their long term stability. So far few studies have appeared in the literature that address this important issue. All the

systems resulted stable in time, without displaying aggregation or a radical deterioration of the catalytic parameters. Au NPs C9TACN was the only system that shown no variation at all in the catalytic and binding behavior, thus emerging as as the most robust system for applications.

Finally, the effect of the nanoparticle dimensions on the catalytic activity was investigated by studying 13 nm gold nanoparticles passivated with thiol C9TACN. The catalytic parameters were then confronted with those obtained for Au NPs C9TACN (2 nm). The results showed that the system retains catalytic activity, but with a neat loss both in k_{cat} and K_M , probably imputable to the uniformity of the monolayer and the lack of “hot catalytic spots” that may occur in small nanoparticles with extreme curvatures.

References

- [1]. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103;
- [2]. Pieters, G.; Prins, L. J., *New J. Chem.* **2012**, 36 (10), 1931-1939;
- [3]. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Sansone, A.; Scrimin, P.; Prins, L. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2307;
- [4]. Manea, F.; Houillon, F. B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6165;
- [5]. Zaupa, G.; Mora, C.; Bonomi, R.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Chem. Eur. J.* **2011**, 17 (17), 4879-4889;
- [6]. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Prins, L. J., *Chem. Commun.* **2011**, 47 (1), 445-447;
- [7]. Pieters, G.; Pezzato, C.; Prins, L. J., *Langmuir* **2013**, 29 (24), 7180-7185.

1. INTRODUZIONE

1.1 Overview

Gli ultimi decenni hanno vissuto un enorme sviluppo delle nanoscienze, ossia lo studio di oggetti le cui dimensioni sono comprese tra i 1 e 100 nm. Alla luce di questa definizione, gli oggetti studiati in questo contesto hanno una dimensione intermedia tra quella degli atomi e piccole molecole e quella dei più piccoli oggetti che è possibile fabbricare con applicazioni microtecnologiche di nicchia.

L'acceso interesse verso questo tipo di sistemi è largamente motivato dal fatto che, in questo range di distribuzione delle dimensioni, tali nanosistemi possono manifestare comportamenti fisici che deviano da quelli che contraddistinguono i macrosistemi. Tale differenza è spiegata in termini di fenomeni quantici, come quantum confinement^[1], quantum entanglement^[2] e tunnelling elettronico^[3].

È di fondamentale importanza il ruolo della chimica nel contesto dello sviluppo di sistemi nanostrutturati: la capacità di formare nuovi legami o la capacità di rompere legami pre-esistenti consente al chimico di operare in ultima istanza l'assemblaggio di building blocks atomici o molecolari al fine di creare strutture supramolecolari dotate di un numero di forme altamente eterogeneo (si pensi alla diversità delle forme dei sistemi supramolecolari: sfere, bastoncelli, fili, tubi, stelle) e di natura eterogenea (nanosistemi supramolecolari inorganici, organici o ibridi). L'applicazione di questo tipo di strutture è assai variegata, spaziando dalla scienza dei materiali, come catalizzatori, o nella medicina, come componenti di sistemi di drug delivery o, ancora, come componenti di sistemi elettronici e ottici.

Si può azzardare come fonte di ispirazione per la nanoscienza la cellula, il mattone fondamentale dell'organismo vivente. Infatti la cellula si può effettivamente considerare come un sofisticato meccanismo supramolecolare composto da nanomacchine che lavorano in armonia. Gran parte dei componenti della cellula (enzimi, ribozimi, acidi nucleici, proteine, elementi del citoscheletro, mitocondri) sono aggregati di dimensioni nanometriche che si auto-assemblano in maniera gerarchica a creare meccanismi

complessi che agiscono in cooperazione, con lo scopo di percepire l'ambiente al loro esterno e di modificarlo^[4].

La creazione di sistemi supramolecolari così complessi al momento è prerogativa della natura, ma rappresenta un obiettivo a cui la ricerca moderna anela. Solo relativamente di recente sono stati sviluppati strumenti in grado di osservare e manipolare oggetti nella scala del nanometro, permettendo alla nanoscienza di fare un importante salto di qualità, in quanto la capacità di vedere con i propri occhi ciò con cui si sta lavorando ha contribuito enormemente a dare impulso a idee sempre più audaci. Nonostante molte di queste idee al momento siano difficilmente adattabili ad applicazioni pratiche, l'interesse nei confronti delle nanotecnologie contribuisce a dare una spinta fenomenale alla ricerca sui nanosistemi, gettando le basi per le tecnologie del futuro.

1.2 Self-assembly e Self-Assembled Monolayers

Nel corso dei decenni la preparazione di sistemi supramolecolari nanometrici è stata approntata con diverse strategie, utilizzando diversi tipi di approcci in termini di building blocks e forze di legame in gioco, ottimizzando questi parametri al fine di ottenere un sistema che sia in grado di soddisfare le esigenze applicative.

Una delle caratteristiche più desiderabili in un nanosistema è la capacità di autoassemblarsi ("self-assembly"), ossia di formare aggregati ordinati a partire da subunità più semplici. Durante il processo di autoassemblamento le subunità si legano tra di loro (generalmente con legami non covalenti), formando una struttura secondaria più complessa con meno gradi di libertà rispetto alla forma dissociata^[5].

Il self-assembly molecolare è un approccio ubiquitario in chimica e scienze dei materiali: la formazione dei cristalli molecolari, colloidali, doppi strati lipidici e monostrati autoassemblati sono tutti esempi di applicazione pratica di questo principio^[6].

Questo tipo di approccio è molto diffuso in natura, basti pensare a strutture quali il doppio strato fosfolipidico che contraddistingue le membrane cellulari o al folding di catene peptidiche a formare sistemi proteici o, ancora, al folding di acidi nucleici nelle loro forme funzionali. Anche l'associazione ligando-recettore è una sofisticata forma di self-assembly: seppure il termine self-assembly di solito sia riservato a formazione di

sistemi complessi, i limiti semantici tra self-assembly, riconoscimento molecolare, complessazione e altri processi che formano strutture con un maggior grado di ordine a partire da building blocks meno ordinati sono decisamente fumosi.

Il self-assembly è scientificamente interessante e tecnologicamente rilevante in quanto offre una via di sintesi e preparazione di sistemi ad alto grado di complessità in maniera semplice e diretta, riducendo il lavoro sintetico alla mera preparazione dei building blocks^[7].

L'esempio più semplice di sistema autoassemblato è senza dubbio quello del monostrato autoassemblato (self-assembled monolayer, SAM), ossia una struttura secondaria formata da molecole adsorbite su una superficie, tra le quali intercorre una serie di forze intermolecolari tali da disporle ordinatamente in maniera spontanea^[8].

Ognuna di queste molecole può generalmente essere divisa in tre parti: un headgroup, una parte centrale (solitamente una catena alifatica) e un gruppo terminale specifico per l'ancoraggio alla superficie. L'headgroup, essendo la porzione di molecola esposta dalla superficie dopo il self-assembly sulla superficie stessa, determina solitamente le proprietà del monostrato e può essere usato come sito di legame per diverse molecole, biomolecole o ulteriori nanostrutture attraverso legame covalente o interazioni deboli.

La facilità di preparazione e la possibilità di preparare SAMs con diversi gruppi terminali hanno contribuito alla fortuna di questo sistema autoassemblato in campo scientifico, come hanno contribuito alla popolarità di questo approccio anche la possibilità di funzionalizzare non solo superfici piane, ma anche nano-oggetti di varie forme e dimensioni.

I SAMs possono essere di fatto considerati come un'interfaccia tra due mondi: da un lato metalli, semiconduttori e composti inorganici, dall'altro composti organici e materiale biologico, permettendo la preparazione di materiali ibridi organici-inorganici con caratteristiche innovative. L'applicazione dei SAMs alle nanotecnologie è una pratica ben sperimentata ed è risultata vincente in molte applicazioni: in letteratura sono presenti numerosi esempi di stabilizzazione e funzionalizzazione di nano-oggetti (come nanoparticelle^[6], nanostars^[9], nanorods^[10] e nanowires^[11]) attraverso la formazione di monostrati organici.

Esistono diverse strategie per preparare SAMs, che sfruttando l'interazione delle molecole organiche con substrati generalmente composti da metalli o ossidi di metalli,

come ad esempio l'interazione tioli e disolfuri con diversi metalli, seguito poi da altri formazione di SAMs su superfici idrossilate (SiO_2/Si , $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Al}$, TiO_2/Ti , mica, vetro) con silani (alchiltriclorosilani, alchilalcossisilani, alchilaminosilani, etc) o fosfonati^[12]. Superfici di metalli o ossidi di metalli sono sicuramente materiali di prima scelta, data la forte interazione che questi materiali hanno nei confronti di molecole organiche. Il significato chimico-fisico di questa interazione risiede nel fatto che il materiale organico avventizio assorbito sulla superficie metallica (i cui atomi di superficie sono energeticamente insoddisfatti) abbassa l'energia libera dell'interfaccia tra metallo o ossido di metallo e l'ambiente^[13]. Inoltre l'adsorbato ha un effetto desiderabile, in quanto altera considerevolmente le proprietà interfaciali del materiale e può determinare una influenza significativa sulla stabilità di nanostrutture; il materiale organico agisce di fatto da barriera fisica o elettrostatica, nel caso di molecole cariche, che impedisce l'aggregazione e limita molto la reattività del metallo.

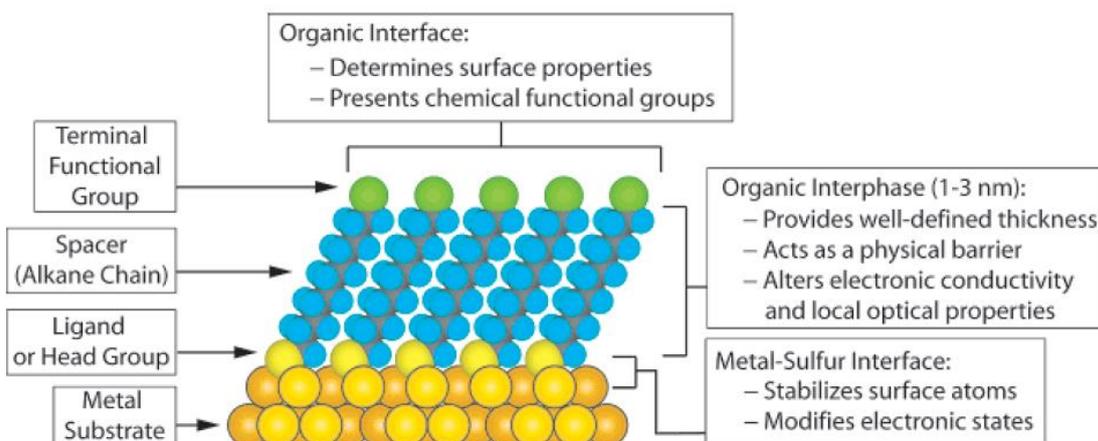


Fig. 1.1: Rappresentazione schematica di un monostrato di alcantioli adsorbito su una superficie metallica attraverso legame Au-S.

Tra tutti i metalli utilizzati per la preparazione di monostrati organici supportati di certo l'oro è da ritenersi l'elemento di elezione^[14]. Nonostante l'oro sia da secoli oggetto di indagine di ricerca scientifica, è solo da pochi decenni che ha conosciuto una nuova fortuna nel contesto delle emergenti nanoscienze e nanotecnologie con l'affermarsi nel panorama scientifico di nanoparticelle d'oro e dei monostrati autoassemblati su di esse.

I motivi per cui l'oro è la prima scelta nella realizzazione di monostrati su sistemi nanostrutturati e su superfici metalliche sono molteplici. L'oro è ben reperibile commercialmente, non solo come starting material, ma anche in forma colloidale o depositato su superficie. In secondo luogo l'oro è un materiale ragionevolmente inerte: non si ossida al di sopra della temperatura di fusione, non reagisce con l'ossigeno atmosferico o con la maggior parte degli agenti chimici. Alla luce di queste proprietà è possibile lavorare con sistemi basati sull'oro in condizioni atmosferiche, evitando condizioni di ultra-alto vuoto o il supporto di una clean room e permettendo una discreta interazione con materiale "sporco", necessaria per applicazione su substrati biologici, senza essere però tossico per cellule e batteri^[15].

Altri materiali comunemente usati per realizzare monostrati organici sono argento^[16] e rame^[17], entrambi ossidabili dall'ossigeno atmosferico e tossici per applicazioni biologiche, ed il palladio^[18], che sebbene non dimostri spiccata tossicità, è ancora poco studiato per la realizzazione di monostrati organici.

L'oro lega molecole organiche con un alta affinità senza determinare solitamente reazioni collaterali: è ben comprovata^[19] la capacità di superfici d'oro di interagire con diversi gruppi funzionali, preferenzialmente con tioli, acidi carbossilici, ammine, fosfine. Il gruppo funzionale di gran lunga più utilizzato per realizzare materiali ibridi metallo-organici è il residuo tiolico: è ben documentato in letteratura^[20] come il tiolo (molto probabilmente in forma di tiolato^[21]) legni stabilmente superfici metalliche con una forza di legame di circa 50 kcal/mol, paragonabile quindi alla forza di un legame covalente.

1.3 La nanoparticella d'oro

Una nanoparticella d'oro può essere trivialmente descritta come un aggregato di atomi d'oro di dimensioni nanometriche, la cui dimensione dipende dal numero di atomi d'oro che la compone.

Gli atomi d'oro assumono all'interno della nanoparticella una struttura cristallina che diventa sempre più definita con l'aumentare del diametro della nanoparticella stessa. È stato supposto che nanocristalli d'oro più grandi di 0.8 nm di diametro siano assimilabili

a una forma di ottaedro troncato o cubottaedro, con otto facce [111] troncate da sei facce più piccole [100]^[22] (Fig. 1.2).

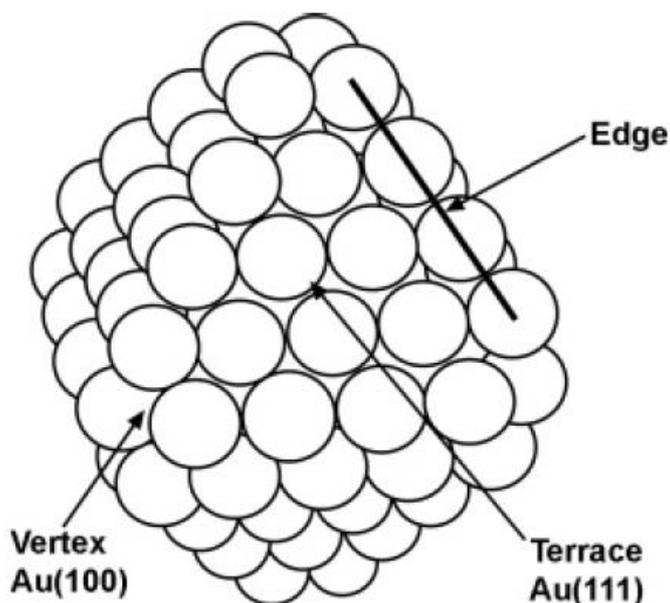


Fig. 1.2: Modello di nanocluster Au₁₄₀ con una geometria di ottaedro troncato, riportato da [22].

Diversi motivi spingono la ricerca nella direzione dell'oro colloidale rispetto all'oro massivo di una superficie. In primo luogo è stato stimato che nanoparticelle d'oro con diametro inferiore a 2 nm espongano la maggior parte degli atomi che la compongono direttamente a contatto con l'ambiente esterno; da un'ulteriore stima emerge che all'incirca il 45% di questi atomi risiedano su spigoli e vertici della nanoparticella.^[23] Questa peculiare distribuzione degli atomi d'oro all'interno della nanoparticella, in sinergia con l'elevata curvatura della superficie nanoparticellare determina una differenza quantitativa nella capacità di legare molecole organiche rispetto a una superficie d'oro.^[24] Venendo infatti a mancare limitazioni steriche all'interno del monostato organico, si è stimato che il loading di molecole organiche su una nanoparticella sia sempre maggiore rispetto a quello realizzabile sulla stessa area superficiale di una superficie piana^[25]. Inoltre la possibilità di utilizzare substrati nanostrutturati permette di ottenere sistemi caratterizzati da un ampio rapporto superficie/volume, particolarmente desiderabile in applicazioni catalitiche.^[26] Nonostante nanoparticelle d'oro non passivate dimostrino proprietà in grado di essere applicate, seppur limitatamente, in campo pratico, si preferisce di solito l'impiego

dell'aggregato d'oro come supporto per monostrati organici. L'oro colloidale assume quindi il ruolo di scaffold sul quale si autoassemblano le molecole che compongono il monostrato organico, permettendo di ottenere di fatto dei sistemi core-shell ibridi in grado di manifestare le caratteristiche chimiche del monostrato, mantenendo però di contro le peculiarità fisiche del core d'oro nanometrico.

Le caratteristiche qualitative del monostrato sono state e sono tuttora oggetto di intenso studio, in quanto la capacità di poter prevedere e controllare la formazione del monostrato è desiderabile per l'applicazione e la previsione del comportamento dei nanosistemi. L'interazione tra le molecole organiche che compongono il monostrato è stata descritta^[27] come un concerto di forze di Van Der Waals, interazioni idrofobiche e legami idrogeno, dipendente quindi dal tipo di molecole utilizzate. Molti studi, eseguiti principalmente su nanoparticelle passivate da alchiltiolati, utilizzando FTIR, VSFG, spettroscopia NMR e AFM^[28] hanno dimostrato come vi sia un elevato livello di ordine delle molecole all'interno del monostrato, presentando seppur maggior difetti rispetto al corrispondente monostrato su superfici metalliche piane.

1.4 Proprietà delle nanoparticelle d'oro

Come ricordato in precedenza, la scelta dell'oro colloidale come substrato per la crescita di un monostrato organico autoassemblato non è casuale, ma risponde a precise esigenze applicative che coniugano l'efficienza della formazione del monostrato stesso con le peculiari proprietà quantistiche dell'oro nanometrico.

In seguito sono presentate in dettaglio alcune caratteristiche salienti delle nanoparticelle d'oro, trattando in dettaglio quelle che verranno successivamente discusse nella realizzazione dell'elaborato di tesi.

1.4.1 Banda Plasmonica di Superficie (SPB)

Una delle caratteristiche peculiari più note di soluzioni di nanoparticelle metalliche è la banda plasmonica di superficie (Surface Plasmon Band, SPB), che corrisponde a un'intenso assorbimento di radiazioni incidenti da parte del sistema nanostrutturato.^[29]

La banda plasmonica di superficie è dovuta all'oscillazione collettiva della nuvola elettronica sulla superficie della nanoparticella (elettroni 6s della banda di conduzione nel caso di nanoparticelle d'oro) che interagisce con il campo elettromagnetico della luce incidente.^[30] La natura della SPB è stata razionalizzata nel 1908 da Mie: la teoria di Mie attribuisce la banda plasmonica di nanoparticelle sferiche a oscillazioni dipolari degli elettroni liberi nella banda di conduzione occupante gli stati energetici immediatamente al di sopra del livello di Fermi. La banda plasmonica superficiale è caratteristica delle dimensioni della nanoparticella d'oro: è assente per nanoparticelle con diametro inferiore a 2 nm, come pure per l'oro massivo. Nanoparticelle con diametro medio di 9,15, 22, 48, 99 nm mostrano dei massimi di assorbimento rispettivamente a 517, 520, 521, 533 e 575 nm, con modificazioni anche importanti dovute al contributo del monostato, che incide sull'indice di rifrazione del solvente.^[31]

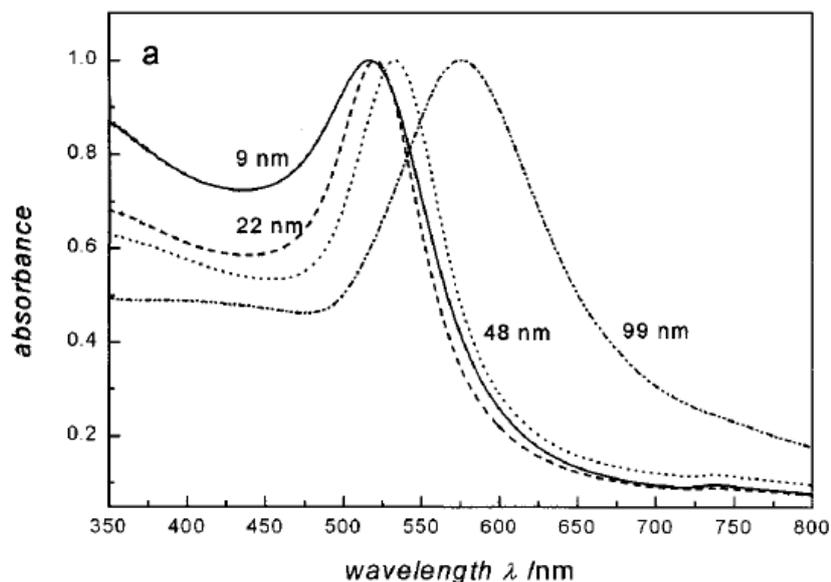


Fig. 1.3: Spettro di assorbimento UV-Vis di Au NPs di diametri diversi che evidenzia l'assorbimento caratteristico della SPB a seconda del diametro del core d'oro.

Il fatto che l'assorbimento cada nella regione della radiazione visibile ed il fatto che sistemi di questo tipo presentino coefficienti di estinzione molare molto elevati (nell'ordine di $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ossia quattro/cinque ordini di grandezza in più rispetto ai

valori di estinzione molare tipici dei comuni coloranti organici) permette di apprezzare l'assorbimento della SPB anche ad occhio nudo.^[32]

Questo tipo di fenomeno è influenzato non solo dal plasmone della singola nanoparticella, ma anche dalla vicinanza di altri nano-oggetti dotati di plasmone proprio: l'accoppiamento dei plasmoni (con la formazione di un plasmone collettivo) di più nanoparticelle provoca un red-shift della banda plasmonica, che si traduce nel viraggio di colorazione della soluzione.

L'accoppiamento dei plasmoni di superficie è stato impiegato diffusamente per la realizzazione di sensori. Mirkin et al. hanno contribuito in maniera pionieristica al campo del sensing mediato da nanoparticelle d'oro funzionalizzate: utilizzando nanoparticelle di 13 nm passivate con una breve sequenza oligonucleotidica^[33] dotata di un residuo tiolico ha dimostrato come queste interagissero con la sequenza oligonucleotidica complementare, aggregandosi.^[34]

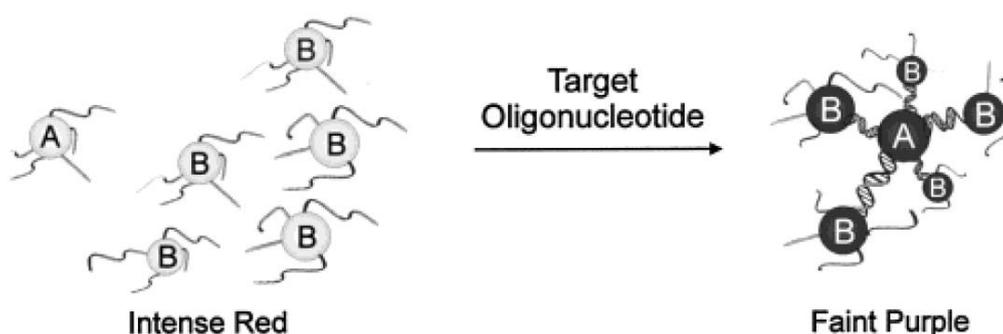


Fig. 1.4: Schema del funzionamento del saggio per aggregazione specifico per sequenze oligonucleotidiche presentato da Mirkin et al. in [34].

Questa interazione risulta in uno spostamento della banda plasmonica accompagnato dal viraggio della soluzione da rosso acceso a viola accennato, permettendo di monitorare l'avvenuta ibridazione delle sequenze di DNA non solo tramite spettrofotometria, ma anche ad occhio nudo. Ne consegue che il sensore realizzato, nonostante abbia una sensibilità limitata (arrivando a rilevare concentrazioni nanomolari di molecola target), si dimostra essere ben più economico dei saggi basati su sonde fluorescenti senza sacrificare la selettività del sistema per una data sequenza.

1.4.2 FRET e NSET su nanoparticelle d'oro

Classicamente il FRET^[35] (Forster Resonance Energy Transfer) si definisce come un trasferimento energetico tra un donatore e un accettore (nell'insieme definiti "coppia FRET"), in cui il donatore trasferisce tramite un processo non radiativo (corrispondente ad un'interazione dipolo indotto/dipolo indotto) un quanto di energia ad un fluoroforo ad esso vicino che abbia una differenza di livello energetico corrispondente al quanto di energia rilasciato.

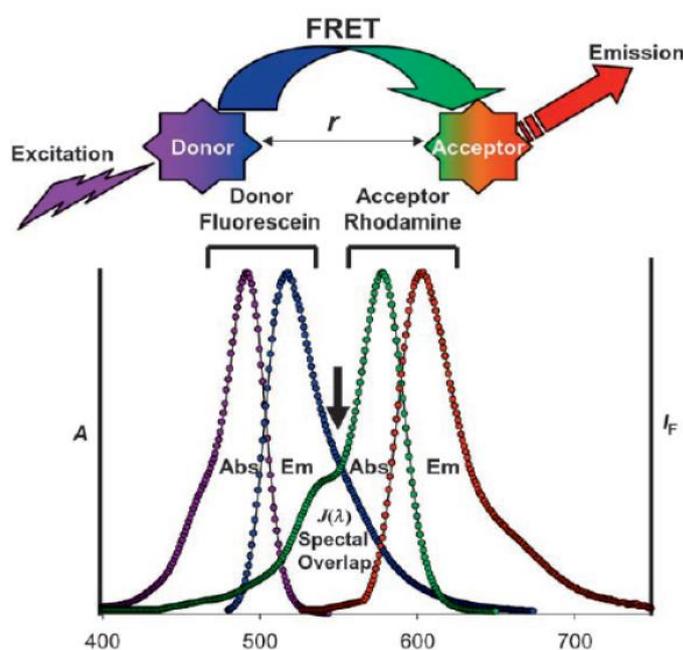


Fig. 1.5: Esempio del meccanismo di FRET tra due molecole fluorescenti tra le quali vi è sovrapposizione tra lo spettro di emissione della prima molecola e lo spettro di assorbimento della seconda molecola.

Le condizioni per osservare FRET sono i) la sovrapposizione tra lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di eccitazione dell'accettore ii) una distanza tra accettore e donatore intorno ai 5 nm. L'efficienza del processo di trasferimento energetico (E) è data da $[1+(R/R_0)^6]^{-1}$ in cui R è la distanza tra donatore ed accettore, R_0 la distanza alla quale il 50% di energia è trasferita ed è funzione del grado di sovrapposizione tra gli spettri di assorbimento di donatore ed accettore, indice di rifrazione del mezzo, resa quantica del

donatore e dall'orientazione relativa nello spazio tra i dipoli indotti di donatore ed accettore.^[36]

Questo fenomeno è osservato sia nel caso di molecole fluorescenti, sia nell'interazione tra molecola fluorescente-nanoparticella. La nanoparticella d'oro si comporta come un *black-hole quencher*, essendo prona all'assorbimento in tutto il range dell'UV-Vis, agendo efficientemente da accettore della coppia FRET: l'energia che riceve dal trasferimento viene poi dissipata attraverso moti vibrazionali e equilibratura di calore con il solvente.^[37]

Per nanoparticelle di dimensioni inferiori ai 5 nm il processo di FRET viene definito NSET (Nanoparticle Surface Energy Transfer), caratterizzata da una aumentata efficienza del trasferimento energetico: questa anomalia è stata spiegata come interazione dipolo-dipolo, similmente al FRET, ma geometricamente differente a causa della natura della distribuzione isotropica dei vettori dei dipoli che giacciono sulla superficie. Questo arrangiamento dei vettori dipolari aumenta la probabilità del trasferimento energetico ed è ritenuto responsabile della maggior efficienza del trasferimento energetico del NSET rispetto a FRET.^[38]

La possibilità di osservare fenomeni di quenching di fluorescenza associati a FRET o NSET hanno reso l'oro popolare per applicazioni bioanalitiche, anche considerando la relativa semplicità di funzionalizzazione e la stabilità nel tempo delle nanoparticelle.

Rotello et al. hanno sfruttato questi principi nello sviluppo di strategie di sensing originali in diversi lavori presentati in letteratura. In un recente lavoro si utilizza un sistema basato su nanoparticelle d'oro passivate da tioli che espongono gruppo ammoniacali quaternari, conferendo alla nanoparticella una carica netta positiva. Per interazione elettrostatica è quindi possibile legare alla nanoparticella una proteina fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP) osservando lo spegnimento della fluorescenza.^[39] In presenza di proteine del siero che abbiano maggior affinità per il sistema si può osservare l'accensione della fluorescenza che viene associata alle dimensioni della proteina del siero con cui il complesso Au NP-GFP interagisce. Questa strategia permette di realizzare in maniera triviale una strategia di sensing della composizione del siero.

Questo concetto è stato esplorato ulteriormente da Rotello et al., permettendo lo studio dell'interazione tra nanoparticelle caricate con il fluorescente e sistemi complessi, come

i batteri.^[40] Il sistema consiste nella possibilità di rilevare la carica batterica di una soluzione basandosi sul displacement di GFP, legato elettrostaticamente alla superficie carica positivamente di nanoparticelle d'oro, mediato dai residui carichi negativamente di acido teicoico presenti in abbondanza sulla superficie di batteri Gram + (Fig. 1.6).

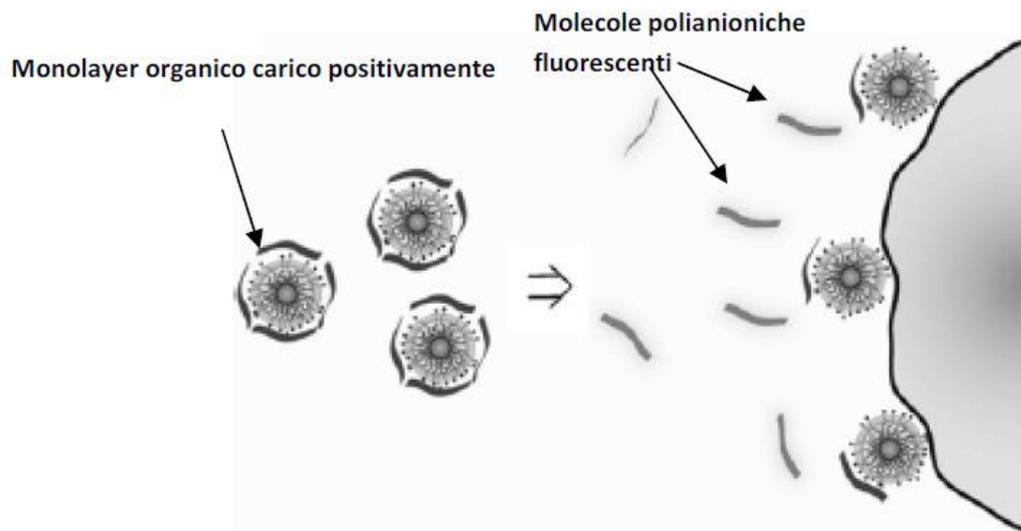


Fig. 1.6: Rappresentazione schematica della strategia di sensing della carica batterica di una soluzione basata sul displacement di GFP dal complesso GFP-Au NP presentata da Rotello et al. in [40].

1.5 CATALISI MEDIATA DA NANOPARTICELLE D'ORO

La scoperta di nuovi sistemi in grado di mediare in maniera efficiente reazioni chimiche è un obiettivo particolarmente ambito nella ricerca chimica, in quanto la necessità di sviluppare reazioni vantaggiose in termini di economia atomica e di impatto ambientale rimane di importanza centrale per lo sviluppo industriale.

In questo contesto si inseriscono bene le nanoparticelle, per una serie di ragioni: i) la dimensione nanometrica del catalizzatore permette non solo di massimizzare, come già ricordato, il rapporto superficie/volume, permettendo la maggior superficie possibile per l'interazione tra catalizzatore e substrato, ma anche permette di ottenere un sistema catalitico che così finemente sospeso all'interno del solvente da risultare praticamente in soluzione, assumendo caratteristiche di reattività tipiche dei catalizzatori omogenei^[41]; ii) la possibilità di recuperare dalla soluzione il catalizzatore attraverso processi di aggregazione indotta o, in sistemi che lo permettono, attraverso applicazione di una forza magnetica.

L'oro colloidale è una prima scelta nello sviluppo di sistemi catalitici nanostrutturati, coniugando i vantaggi delle dimensioni del sistema alla semplicità e versatilità della preparazione, dimostrando una modesta attività catalitica in reazioni di ossidazione mediata dalla reattività degli atomi d'oro superficiali.

Un esempio classico di questa capacità catalitica è stato osservato da Hiruta et al.^[42] studiando la capacità di nanocluster d'oro di ossidare CO a CO₂ in presenza di ossigeno atmosferico a temperatura ambiente, una proprietà che non era stata osservata in precedenza nel caso dell'oro massivo. La funzionalizzazione parziale della nanoparticella ha contribuito a mediare l'ossidazione nei confronti di substrati più complessi: un esempio è fornito dal lavoro di Jin et al.^[43] dimostrando come nanoparticelle passivate con lunghe catene alchiliche (tra i 6 e i 12 atomi di carbonio) possono mediare regioselettivamente l'ossidazione dello stirene (Fig. 1.7).

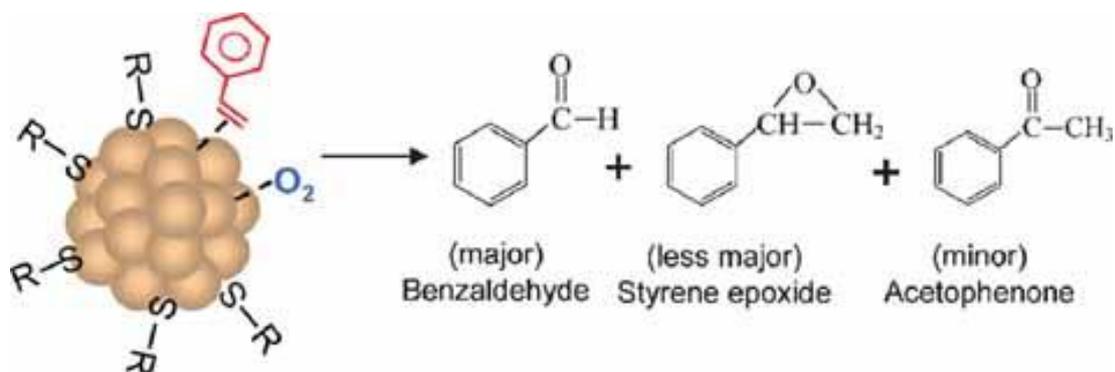


Fig.1.7: Ossidazione dello stirene mediata da nanoparticelle d'oro passivate con catene alchiliche proposta da Jin et al. in [43].

In questo caso si può osservare come il tiolo passivante non sia direttamente responsabile dell'evento catalitico, che invece è mediato dalla superficie metallica, ma invece contribuisce all'interazione con il substrato.

Ampliando questo concetto si può razionalizzare il ruolo del monostrato passivante come fattore contribuyente all'efficienza della catalisi. Questo ragionamento porta alla preparazione di monostrati saturi in cui l'oro svolge un'azione secondaria all'interno della catalisi, partecipando al sistema come scaffold per molecole organiche di per sé cataliticamente attive. La catalisi, con questo tipo di approccio, si sposta da inorganica a organica, ma attenendosi ad un supporto nanometrico. Numerosi esempi di processi catalitici mediati da SAMs sono stati studiati e presentati in letteratura. Un esempio molto elegante è quello fornito da Cooke, Kočovský et al.^[44] di riduzione asimmetrica di immine con triclorosilani mediate da nanoparticelle d'oro funzionalizzate con derivati formamidici derivati dalla valina (Fig. 1.8).

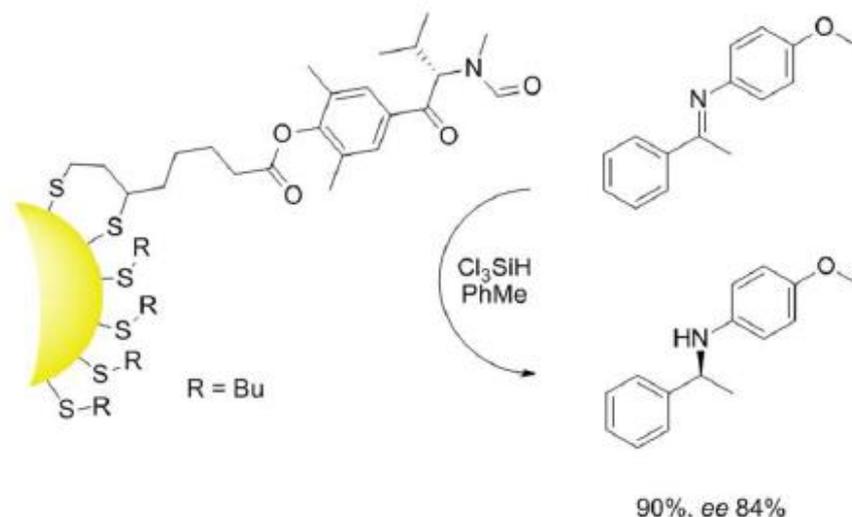


Fig. 1.8: Sistema catalitico per la riduzione di derivati imminici mediata da SAMs su Au NPs presentato da Cooke, Kočovský et al. in [44].

Il catalizzatore nanostrutturato è stato preparato per scambio di tioli da nanoparticelle funzionalizzate con tioli a catena alchilica C₄ con alte rese e buoni eccessi enantiomerici, presentando una reattività comparabile con quella di derivati solubili nel mezzo di reazione e superiore a quella dello stesso sistema organico supportato su polimero.

Il concetto della catalisi con nanoparticelle passivate con monostrati organici può essere ampliato ulteriormente alla catalisi mediata da cationi metallici, utilizzando ligandi in grado di chelare atomi metallici e esporli verso l'ambiente di reazione.

Un primo esempio di un complesso immobilizzato su nanoparticelle d'oro è stato descritto da Tremel et al.^[45]

Le nanoparticelle d'oro sono state passivate con 4-metilesa-3,5-diene-1-tiolo, in grado di complessare Ru(III), e sono state usate per mediare la polimerizzazione per metatesi ad apertura di anello (ring-opening metathesis polymerization) del norbornene (Fig. 1.9).

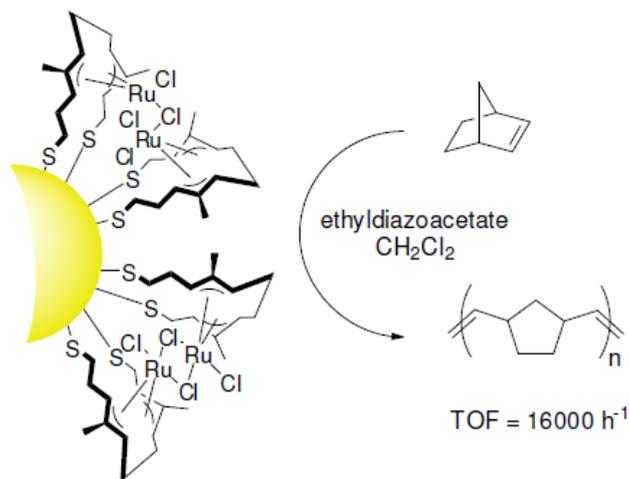


Fig. 1.9: Sistema catalitico basato su nanoparticelle d'oro passivate da tioli funzionalizzati con complessi di Ru(III) per ROMP di norbornene proposto da Tremel et al. in [45].

Nonostante il sistema non sia perfettamente solubile nel mezzo di reazione (diclorometano), il sistema è in grado di catalizzare la reazione in maniera migliore (TOF 16000 h^{-1}) rispetto al catalizzatore molecolare (TOF 3000 h^{-1}). Tale effetto è stato spiegato dagli autori come una conseguenza dell'orientamento del catalizzatore ancorato sulla superficie della nanoparticella.

In un altro esempio pionieristico, presentato da Mrksich et al., ligandi diidrochinonici sono immobilizzati su nanoparticelle d'oro e il sistema, in presenza di OsO_4 , è stato utilizzato per la diidrossilazione asimmetrica di stirene β -sostituito^[46] (Fig. 1.10).

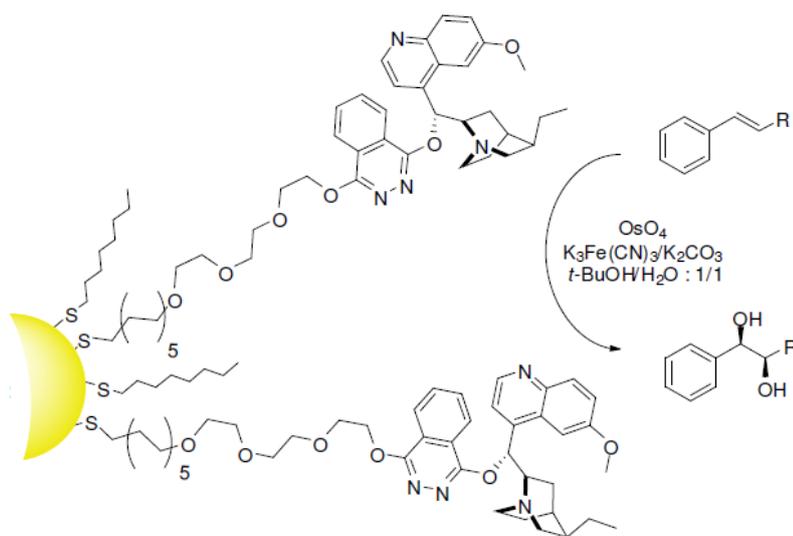


Fig. 1.10: Sistema catalitico basato su nanoparticelle d'oro passivate proposto da Mrksich et al. in [46].

Un secondo vantaggio di questo tipo di sistemi catalitici consiste nella possibilità, formalmente, di realizzare catalizzatori con una struttura secondaria fine, giocando sulla lunghezza dei building blocks.

Un esempio molto pertinente di questo tipo di approccio è stato introdotto da Pfaltz et al.^[48], descrivendo la possibilità di creare sulla superficie delle nanoparticelle dei siti catalitici di diversa struttura modificando la lunghezza dei building blocks utilizzati per preparare il monostrato organico, alternando tioli spaziatori ai tioli cataliticamente attivi. (Fig. 1.12).

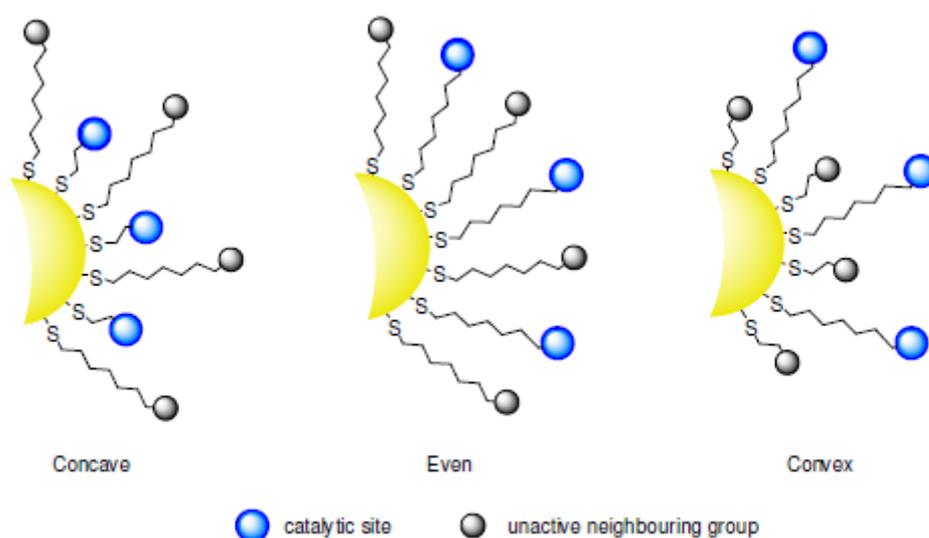


Fig. 1.12: Rappresentazione schematica della possibilità di ottenere siti catalitici concavi o convessi in monostrati organici su nanoparticelle d'oro, proposta da Pfaltz et al. in [48].

Questo accorgimento permette di ottenere catalizzatori con una diversa morfologia del sito attivo, spaziando da siti attivi convessi, dove il tiolo cataliticamente attivo è esposto all'ambiente esterno, fino a siti attivi concavi, dove il sito catalitico è racchiuso intorno a tioli cataliticamente inattivi. Questo accorgimento è particolarmente attraente in quanto permette di mimare la struttura della tasca enzimatica, garantendo non solo un ambiente che mima la forma del substrato, ma anche un microambiente adatto alla reazione di interesse, in cui le condizioni di pH e forza ionica sono effettivamente diverse da quelle dell'ambiente esterno.

Il terzo fattore che distingue le nanoparticelle d'oro funzionalizzate dal catalizzatore in soluzione è la possibilità di avere effetti di cooperatività tra i residui esposti dai singoli building blocks del monostrato, determinata dall'ordine formale che raggiunge il monostrato organico.

Il primo esempio di questo comportamento, determinante per lo sviluppo di questa tesi, è presentato da Scrimin et al.^[49] e sfrutta nanoparticelle d'oro passivate con un tiolo terminante in unità macrocicliche di 1,4,9-triazaciclononano (TACN), in grado di complessare Zn(II). Il complesso metallico, ottenuto *in situ* per aggiunta di Zn(II) nitrato alle nanoparticelle d'oro passivate sulla superficie della nanoparticella si è dimostrato cataliticamente attivo sull'idrolisi di 2-idrossipropil-p-nitrofenilfosfato (HPNP), una molecola modello dell'RNA (Fig. 1.13).

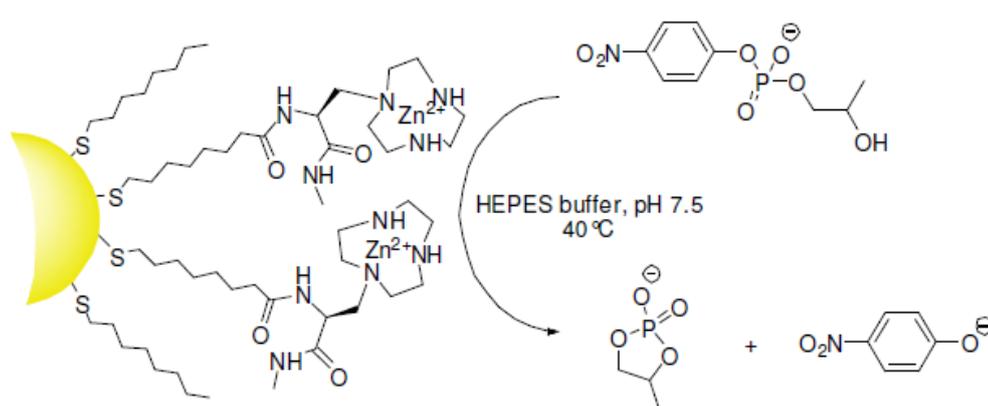


Fig. 1.13: Sistema catalitico basato su nanoparticelle d'oro funzionalizzate per la transfosforilazione di HPNP proposto da Scrimin et al. in [49].

L'idrolisi di un estere fosforico è una reazione importante nei processi cellulari dal punto di vista metabolico, del trasferimento energetico intracellulare e nei processi rigenerativi degli acidi nucleici. Tuttavia il legame fosfodiesterico è di per sé chimicamente inerte, soprattutto a causa della natura anionica del substrato che ne determina un difficoltoso avvicinamento del nucleofilo, riflettendosi sui tempi di emivita di composti che presentano tale legame, generalmente molto lunghi^[50].

Il sistema può essere definito a buona ragione nanozimatico, in quanto la nanoparticella presenta un comportamento catalitico che segue una cinetica di Michaelis-Menten a saturazione di substrato, dimostrando l'analogia con l'enzima nucleasi, deputato in

natura a degradare acidi nucleici. Il sistema catalitico ha dimostrato un'accelerazione della reazione di idrolisi di HPNP di oltre 40000 volte (k_{cat}/k_{uncat}), collocandosi tra i migliori sistemi basati su Zn(II) per questa reazione.

È interessante osservare come l'utilizzo di supporti diversi dalla nanoparticella d'oro (come ad esempio l'inserimento dell'unità catalitica in dendrimeri o leganti tripodali) permetta, nelle stesse condizioni, un'accelerazione della reazione più modesta, dimostrando come l'inserimento dei complessi TACN-Zn(II) in un monostrato apparentemente permetta un'impaccamento e orientazione delle unità catalitiche ottimale per la catalisi.

È stato dimostrato come il sito catalitico sia formato da due complessi TACN-Zn(II) stericamente vicini mediante valutazione della velocità iniziale della reazione di idrolisi di HPNP in funzione della concentrazione di Zn(II) in soluzione: il profilo sigmoideale indica come l'attività catalitica sia presente solo quando la concentrazione di complessi è abbastanza alta nel monostrato, sottolineando come complessi TACN-Zn(II) isolati non catalizzino la reazione (Fig. 1.14).

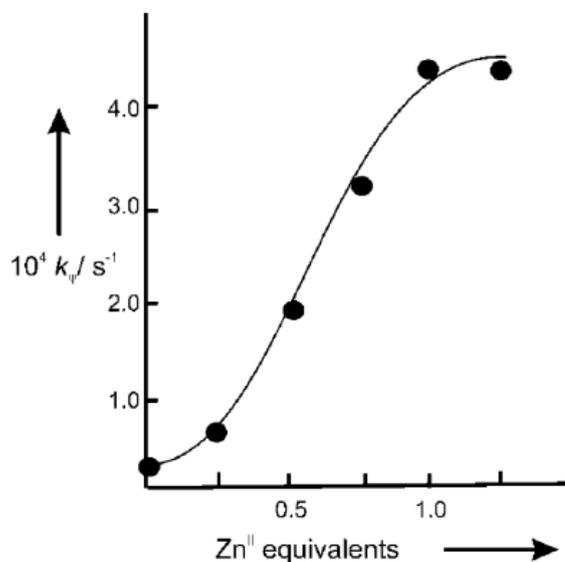
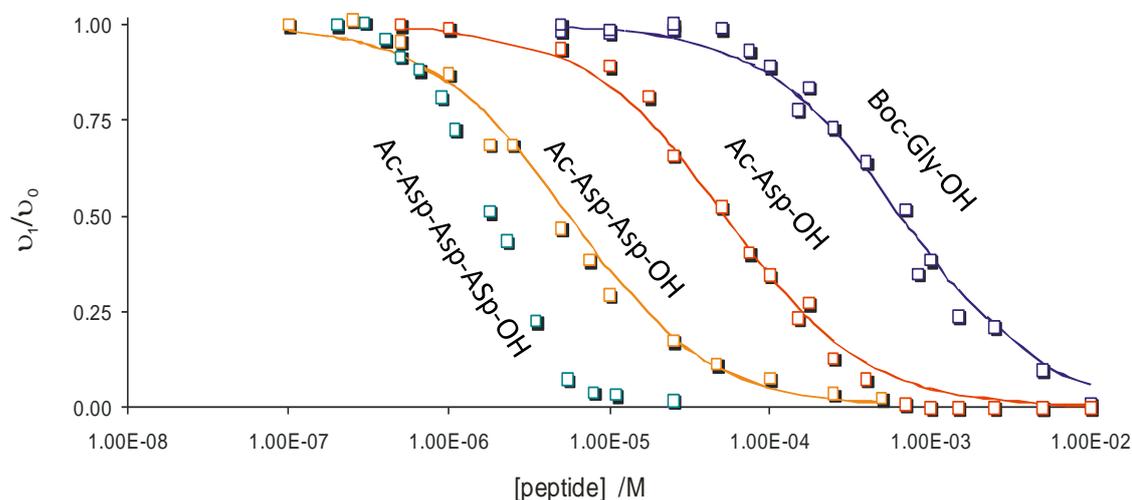


Fig. 1.14: Costanti di pseudo primo ordine osservate per la reazione di transfosforilazione di HPNP in funzione degli equivalenti di Zn(II) aggiunti in soluzione rispetto al TACN per il sistema proposto da Scrimin et al.

Studi successivi^[51] sul sistema hanno evidenziato una alta affinità della superficie cationica del monostrato, promossa dai complessi TACN-Zn(II), per oligoanioni. L'effetto di tale affinità per il monostrato organico è stato saggiato con un esperimento di

inibizione della capacità catalitica del sistema mediato da una serie di peptidi caratterizzati da un diverso numero di cariche, come presentato in Fig. 1.15 e descritto in dettaglio in Tab.I.



Substrato	Numero di cariche	Log K_i	ΔG [kJ mol ⁻¹]
Boc-Gly-OH	1	-3.18	-19.1
Ac-Asp-OH	2	-4.28	-25.6
Ac-Asp-Asp-OH	3	-5.25	-31.6
Ac-Asp-Asp-Asp-OH	4	-6.27	-37.6

Fig. 1.15: velocità iniziale (normalizzata rispetto alla velocità iniziale del sistema in assenza di analita) in funzione della concentrazione di Ac-Asp-Asp-Asp-OH, Ac-Asp-Asp-OH, Ac-Asp-OH e Boc-Gly-OH. [TACN-Zn(II)]=5 μ M, [HEPES]=10 mM, pH 7.0, 40°; Tab.I: costanti di dissociazione per l'inibizione con peptidi oligoanionici e corrispondenti variazioni di energia libera.

I dati mostrano come la costante di dissociazione diminuisca di un fattore 10 per ogni carica aggiunta all'analita. In maniera analoga, l'energia libera di binding, ΔG , aumenta in maniera lineare in funzione del numero di cariche presenti nell'oligoanione, suggerendo come il contributo al binding della serie di oligoanioni sia dovuto in larga misura alla carica della molecola.

L'abilità di modulare il grado di inibizione del sistema mediante la conversione di un oligoanione in un oligomero più corto da parte di un effettore esterno è stata

fondamentale per l'elaborazione di un sistema di sensing di enzimi proteolitici, come presentato da Prins et al.^[52] in un recente lavoro.

In principio su cui si basa il saggio enzimatico è il riconoscimento specifico tra una proteasi e un oligopeptide bersaglio, dotato di cariche negative multiple, nel duplice ruolo di substrato enzimatico e inibitore della nanoparticella.

L'oligopeptide così selezionato è in grado di inibire efficacemente l'attività catalitica del nanozima legandosi alla superficie organica in virtù della carica positiva netta dovuta agli atomi di Zn(II) complessati negli anelli di TACN. Incubando l'oligopeptide con l'enzima avviene l'interazione tra enzima e substrato: la proteasi idrolizza l'oligopeptide fino ai singoli aminoacidi, i quali, avendo molta meno affinità rispetto alla sequenza peptidica integra, non sono in grado di inibire la catalisi. Il nanozima è perciò in stato attivato e, per idrolisi di HPNP, produce un gran numero di molecole reporter di p-nitrofenato. Se al contrario non vi è interazione tra oligopeptide e enzima, l'oligopeptide non viene idrolizzato e rimane legato alla nanoparticella, inibendo la catalisi (Fig. 1.16).

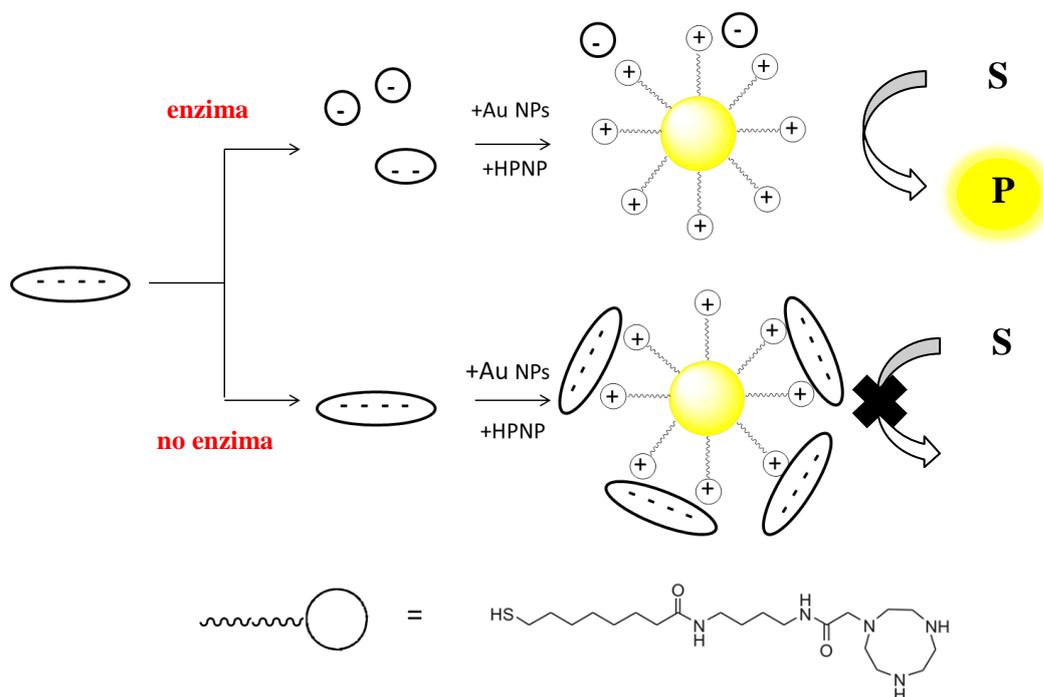


Fig. 1.16: Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del saggio enzimatico per la rilevazione di enzimi proteolitici basato su amplificazione del segnale mediante nanoparticelle d'oro funzionalizzate proposto da Prins et al. in [52].

Il metodo è stato inizialmente testato su Subtilisina A. Tale enzima è di limitato interesse diagnostico, ma è in grado di idrolizzare con facilità sequenze peptidiche senza necessità di uno specifico substrato, permettendo di utilizzare un oligopeptide di comodo con carica netta negativa (Ac-Asp-Asp-Asp-OH) al fine di stabilire un modello che confermasse la bontà del principio.

Il sistema in questo caso si è dimostrato affidabile nel distinguere concentrazioni sub-micromolari di enzima con una eccellente linearità della risposta anche nel nanomolare, permettendo, previa modificazione del peptide bersaglio, la specificità per un particolare enzima. Allo stesso modo, scegliendo substrati con carica negativa netta multipla, è stato possibile saggiare la presenza in soluzione di enzimi specifici di maggior interesse clinico, come ad esempio asparaginasi, glutammasi, glutammato carbossipeptidasi II e caspasi 1.

L'utilizzo di un sistema catalitico di questo tipo nella sensoristica desta l'interesse sulla possibilità di modificare il monostrato organico per modulare l'attività catalitica della nanoparticella stessa e giustifica lo studio di monostrati organici su sistemi nanometrici, in quanto la previsione del comportamento del monostrato in funzione della modificazione di parametri strutturali è necessaria per adattare il sistema a applicazioni pratiche.

1.6 RIFERIMENTI

- [1]. a) Petroff, P. M.; Lorke, A.; Imamoglu, A. *Phys. Today* **2001**, 46; b) Empedocles, S. A.; Neuhauser, R.; Shimizu, K.; Bawendi, M. G.; *Adv. Mat.* **1999**, 11, 1243;
- [2]. Bao, J.; Bragas, A. V.; Furdyna, J. K., Merlin, R. *Nat. Mater* **2003**, 2, 175;
- [3]. Wang, W.; Lee, T.; Reed, M.A. *Phys. Rev. B: Condens. Matter* **2003**, 68, 035316/1;
- [4]. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff M.; Roberts, K; Walter, P.; *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: London, 2002;
- [5]. Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1805;
- [6]. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103;
- [7]. Whitesides, G.M.; Boncheva, M.; *PNAS*, **2002**, 99, 4769;
- [8]. a) Bareman, J. P.; Klein, M. L. *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 5202; b) Ferguson, M. K.; Low, E. R.; Morris, J. R., *Langmuir* **2004**, 20, 3319 c) Gurau, M. C.; Kim, G.; Lim, S.M.; Albertorio, F.; Fleisher, H.C.; Cremer, P. S. *ChemPhysChem* **2003**, 4, 1231; d) Valiokas, R.; Oestblom, M.; Svedhem, S.; Svensson, S. C. T.; Liedberg, B., *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 10401;
- [9]. Khoury, C.G.; Vo-Dinh, T. *J Phys. Chem. C Nanomater. Inter.* **2008**, 112, 18849-18859;
- [10]. Mitamura, K.; Imae, T., *Plasmonics* **2009**, 4 (1), 23-30;
- [11]. Sakai, H.; Watanabe, K.; Asanomi, Y.; Kobayashi, Y.; Chuman, Y.; Shi, L.; Masuda, T.; Wytttenbach, T.; Bowers, M. T.; Uosaki, K.; Sakaguchi, K. *Adv. Funct. Mat.* **2013**, 23, 4881-4887;
- [12]. Ulman, A.; *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533-1554;

- [13]. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (1), 321-335;
- [14]. Whitesides, G.M.; Kriebel, J. K.; Love, J. C.; *Science Progress*, **2005**, *88*, 17-48;
- [15]. Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (19), 3268-3279
- [16]. Walczak, M. M.; Chung, C.; Stole, S. M.; Widrig, C. A.; Porter, M. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2370;
- [17]. Laibinis, P .E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Praikh, A. N.; Nuzzo, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7152;
- [18]. Carvalho, A.; Geissler, M.; Schmid, H.; Micel, B.; Delmarche, E.; *Langmuir*, 2002, *18*, 2406;
- [19]. Sperling, R. A.; Parak, W. J., *Phil. Trans. R. Soc. A*, **2010**, *368* (1915), 1333-1383;
- [20]. Nuzzo, R.G.; Allara, D.L. ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 4481;
- [21]. Hasan, M.; Bethell, D.; Brust, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1132; Widrig, C. A.; Chung, C.; Porter, M. D.; *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **1991**, *310*, 335; Zhong, C. J.; Woods, N. T.; Dawson, B. G.; Porter, M. D. *Electrochem.Comm.*, **1999**, *1*, 17;
- [22]. Luedtke, W.D.; Landman, U. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6566;
- [23]. Hostetler, M. J.; Stokes, J. J.; Murray, R. W., *Langmuir* **1996**, *12*, 3604-3612;
- [24]. Vericat, C; Benitez, G.A.; Grumelli, D.E; Vela, M.E.; Salvarezza, R.C.; *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 184004;
- [25]. Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G.D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R.W. *Langmuir* **1998**, *14*, 17-30;
- [26]. Pieters, G.; Prins, L. J., *New J. Chem.* **2012**, *36* (10), 1931-1939;

- [27]. a) Bareman, J. P.; Klein, M. L. J.; *Phys. Chem.* **1990**, 94, 5202 b) Ferguson, M. K; Lohr, J. R.; Day, B. S. ; Morris, J.R. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 92, 073201/1;
- [28]. Jackson, A. M.; Myerson, J. W.; Stellacci, F.; *Nat. Mater.*, **2004**, 3, 330;
- [29]. Moores, A.; Goettmann, F.; *New J. Chem.*, **2006**, 30, 1121-1132;
- [30]. Daniel, M. C.; Astruc, D.; *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293-346;
- [31]. Link, S.; El-Sayed, M.A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4212
- [32]. Wilson, R.; *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 2028-2045;
- [33]. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R.C.; Storhoff, J. J.; *Nature*, **1996**, 382, 607;
- [34]. Reynolds, R.A.; Mirkin, C.A.; Letsinger, R.L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3795;
- [35]. Forster, T., *Ann Phys.* **1948**, 2, 55;
- [36]. Griffin, J.; Singh, A.K.; Senapati, D.; Rhodes, P.; Mitchell, K.; Robinson, B.; Yu, E., Ray, P.C. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 342;
- [37]. Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4562;
- [38]. a) Darbha, G. K.; Rai, U. S.; Singh, A. K.; *ACS Nano* **2007**, 1, 208 b) Tiwari, V. S.; Oleg, T.; Darbha, G. K., Hardy, W. Singh, J. P.; Ray, P. C. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, 446, 77. c) Jennings, T.L.; Schlatterer J. C.; Singh M.P.; Greenbaum, N. L.; Strouse, G. F.; *Nano Lett.* **2006**, 6, 131;
- [39]. De, M.; Rana, S.; Akpınar, H.; Miranda, O. R.; Arvizo, R. R.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M.; *Nat. Chem.* **2009**, 1 (6), 461-465;
- [40]. Phillips, R. L.; Miranda, O. R.; You, C.-C.; Rotello, V. M.; Bunz, U. H. F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (14), 2590-2594;
- [41]. Astruc, D.; Lu, F.; Aranzaes, J. R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7852;
- [42]. Haruta, M.; *CATTECH* **2002**, 6, 102;
- [43]. Zhu, Y.; Quian, H.; Zhu, M.; Jin, R.; *Adv. Mater.* **2010**, 22, 1;

- [44]. Malkov, A.V.; Figlus, M.; Cooke, G.; Caldwell, S.T.; Rabani, G.; Prestly, M.G.; Kočovský, P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1878;
- [45]. Bartz, M.; Kuther, R.; Seshadri, R.; Tremel, W.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2466;
- [46]. Li, H.; Luk, Y. Y.; Mrksich, M.; *Langmuir*, **1999**, *15*, 4957;
- [47]. Marubayashi, M.; Takizawa, S.; Kawakusu, T.; Arai, T.; Sasai, H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4409;
- [48]. Belser, T.; Stohr, M.; Pfaltz, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8720;
- [49]. Manea, F.; Houillon, F. B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165;
- [50]. Bonora, G. M.; Drioli, S.; Felluga, F.; Mancin, F.; Rossi, P.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44* (3), 535-538;
- [51]. Pieters, G. ; Cazzolaro, A.; Bonomi, R.; Prins, L. J., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1916;
- [52]. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Sansone, A.; Scrimin, P.; Prins, L. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2307.

2. STUDIO E CARATTERIZZAZIONE DI MONOSTRATI ORGANICI SU NANOPARTICELLE D'ORO

2.1 Introduzione al progetto di dottorato

Il progetto di dottorato discusso in questo elaborato di tesi è stato sviluppato nel contesto dell'ottimizzazione del saggio per la rilevazione di proteasi presentato nella sezione introduttiva, sulla base di una osservazione derivata dallo sviluppo di un tiolo che fosse contraddistinto da una sintesi più agile senza però compromettere le caratteristiche catalitiche e di interazione con oligoanioni del sistema usato precedentemente. Questo studio aveva portato alla sintesi del tiolo (b) in Fig. 2.1, che è stato utilizzato per la preparazione di nanoparticelle in alcuni lavori di riconoscimento molecolare^[8b]. Tale molecola è un analogo del tiolo (a), che era stato usato per lo sviluppo del lavoro precedentemente riportato, in termini di gruppi funzionali alle estremità. La differenza tra le due molecole risiede nella porzione centrale, interrotta da legami ammidici per tiolo (a), mentre consta di un'unica catena alchilica per il tiolo (b).

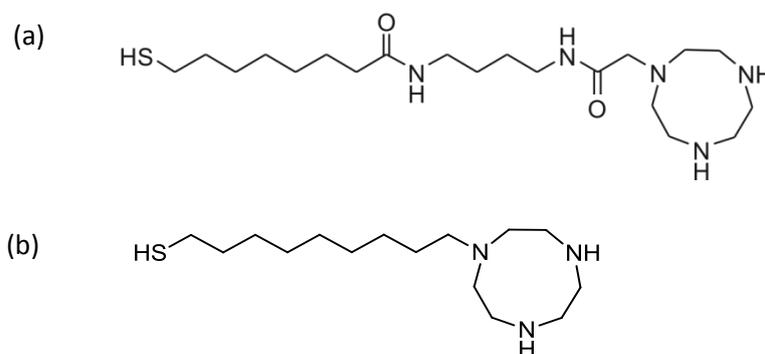


Fig. 2.1: Molecole utilizzate come building block per il monostrato organico su nanoparticelle d'oro.

Nanoparticelle passivate con il tiolo (b) sono state studiate nella catalisi della reazione di transfosforilazione di HPNP, con i risultati presentati in Tab. 2.1.

Au NPs	k_{cat}, s^{-1}	K_M, M
Tiolo (a) ^[1]	6.7×10^{-3}	3.1×10^{-4}
Tiolo (b)	5.7×10^{-3}	4.1×10^{-4}

Tab. 2.1: Confronto tra le performances catalitiche dei due nanosistemi passivati con i due tioli, [TACN-Zn(II)]= 20 μ M, [HEPES]=10 mM pH 7.5, 40°C.

Come si osserva dai dati presentati, i due sistemi sono molto simili sia in termini di attività catalitica intrinseca (sottolineata dal valore di k_{cat}) che in termini di interazione con il substrato (K_M). Questo confronto è particolarmente interessante in quanto si può ottenere, partendo da un tiolo con una sintesi più semplice (passando da 11 passaggi sintetici a 4), una attività catalitica molto simile al sistema precedentemente impiegato. Ci si è quindi interrogati sull'effetto di variazioni di morfologia del monostrato e sulla possibilità di variare le caratteristiche catalitiche e di binding nei confronti di oligoanioni modificando lo spessore del monostrato organico sulla superficie della nanoparticella d'oro, intervenendo quindi sulla lunghezza delle catene alchiliche che separano il macrociclo di TACN dal tiolo.

A questo scopo è stata progettata la sintesi di tre campioni di Au NPs passivati da tre diversi tioli composti da una catena alchilica rispettivamente di 6, 9 e 12 atomi di carbonio (Fig. 2.2).

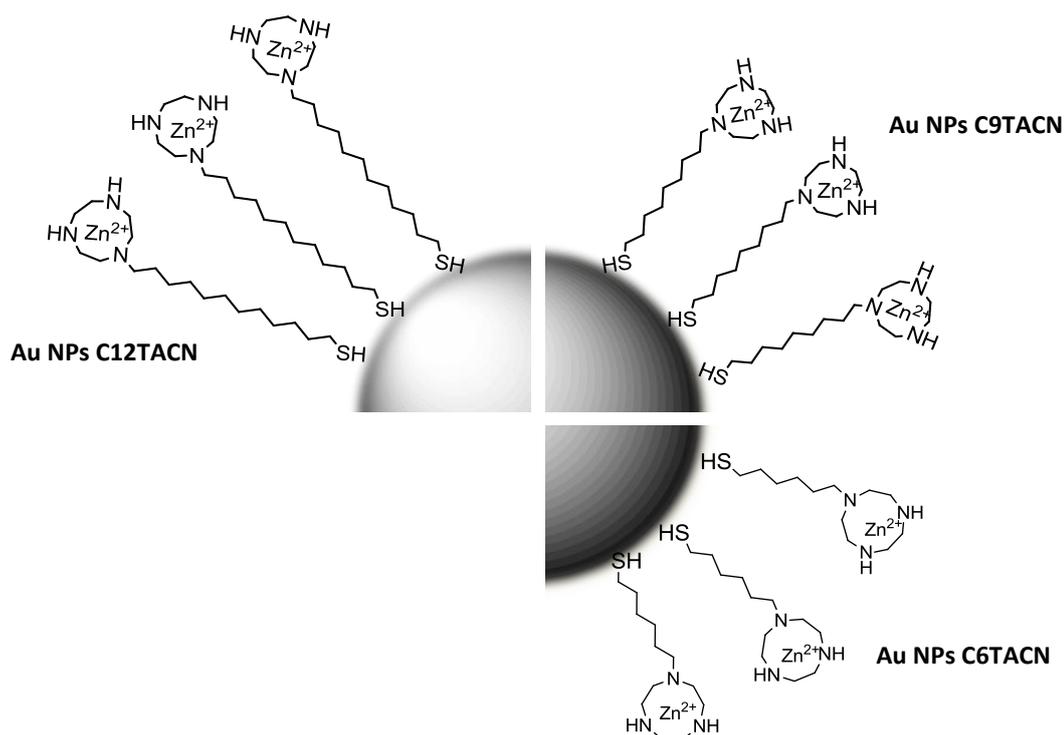


Fig. 2.2: Rappresentazione schematica dei tre nanosistemi sintetizzati nel corso dello studio proposto in questa tesi, passivati da monostrati composti da tioli di diversa lunghezza.

Questi tre sistemi, simili dal punto di vista della composizione strutturale del monostrato, sono stati studiati nella morfologia, nelle loro capacità catalitiche che nelle capacità di legare oligoanioni al fine di osservare e spiegare quale sia il ruolo dello spessore e della morfologia del monostrato stesso nell'orientare i residui di TACN e l'interazione della nanoparticella con altre molecole.

2.2 Sintesi dei tioli C6TACN, C9TACN, C12TACN

Come già illustrato nella parte introduttiva, la strategia utilizzata per modificare lo spessore del monostrato organico sulle nanoparticelle d'oro consiste nel modificare la lunghezza delle catene alchiliche delle molecole che compongono il monostrato stesso. In questa prospettiva è stato possibile sintetizzare i tioli che verranno utilizzati per passivare le nanoparticelle con la medesima strategia, mediante due sostituzioni nucleofile consecutive su α,ω -dibromoalcani di diversa lunghezza. Essendo i tioli soggetti

La prima reazione di sostituzione sfrutta l'attacco nucleofilo del potassio tioacetato su 1,6-dibromoesano, 1,9-dibromononano, 1,12-dibromododecano, favorita da un solvente polare aprotico (acetone), portando alla sintesi dei tioacetili corrispondenti. Nonostante la diversa lunghezza delle catene alchiliche la resa delle tre reazioni è molto simile, attestandosi intorno al 60%. Per effettuare la sostituzione nucleofila dell'anello macrociclico alle catene alchiliche si è scelto di proteggere l'1,4,7-triazaciclononano su due dei tre atomi di azoto disponibili come N-Boc, reazione che avviene per aggiunta goccia a goccia di una soluzione di 2-(tert-butossicarbonilossimino)-2-fenilacetone nitrile (Boc-ON) al TACN, al fine di ridurre il più possibile prodotti secondari di di- e tri-sostituzione all'anello macrociclico.

Il passaggio di sintesi successivo comporta la reazione tra i prodotti ottenuti dalla reazione i) con TACN-diBoc in ambiente basico, che avviene nuovamente con rese molto simili per le tre reazioni (30-40%).

Contestualmente alla preparazione delle nanoparticelle d'oro viene effettuata la deprotezione sia del tioacetile che protegge il tiolo sia dei gruppi Boc che proteggono gli atomi di azoto non impegnati nel legame con la catena alchilica. La deprotezione è operata in miscela HCl/MeOH a caldo contestualmente alla sintesi delle nanoparticelle, con resa quantitativa, come confermato da analisi $^1\text{H-NMR}$.

2.3 Sintesi di Au NPs passivate da tioli C6TACN, C9TACN e C12TACN

Il metodo per la sintesi delle nanoparticelle utilizzato è stato scelto tra le diverse procedure sintetiche presenti in letteratura in accordo con le necessità dello studio che si intende effettuare.

In primo luogo, al fine di poter studiare il sistema sintetizzato per via catalitica, si deve cercare di mantenere il più elevato possibile il rapporto tra area superficiale e volume della nanosistema: questo accorgimento permette di avere un maggior numero unità catalitiche per cluster d'oro, avvantaggiando la catalisi. Questo si traduce nella necessità di disporre di sistemi solubili in acqua e di dimensioni estremamente ridotte, preferibilmente tra gli 1.5 e i 2.0 nm. Allo stesso modo si richiede al protocollo di sintesi

un elevato grado di monodispersione, così da minimizzare comportamenti catalitici e/o di binding irregolari dovuti al contributo di una singola popolazione di nanoparticelle d'oro. Tra i metodi sintetici disponibili in letteratura, quello che più soddisfa le esigenze sintetiche è il protocollo elaborato dal gruppo di Scrimin et al.^[2a] (riassunto in Fig. 2.4) e riadattato da un lavoro di Peng et al.^[2b] che porta alla sintesi di Au NPs di piccole dimensioni, monodisperse e facilmente dissolubili in solvente acquoso.

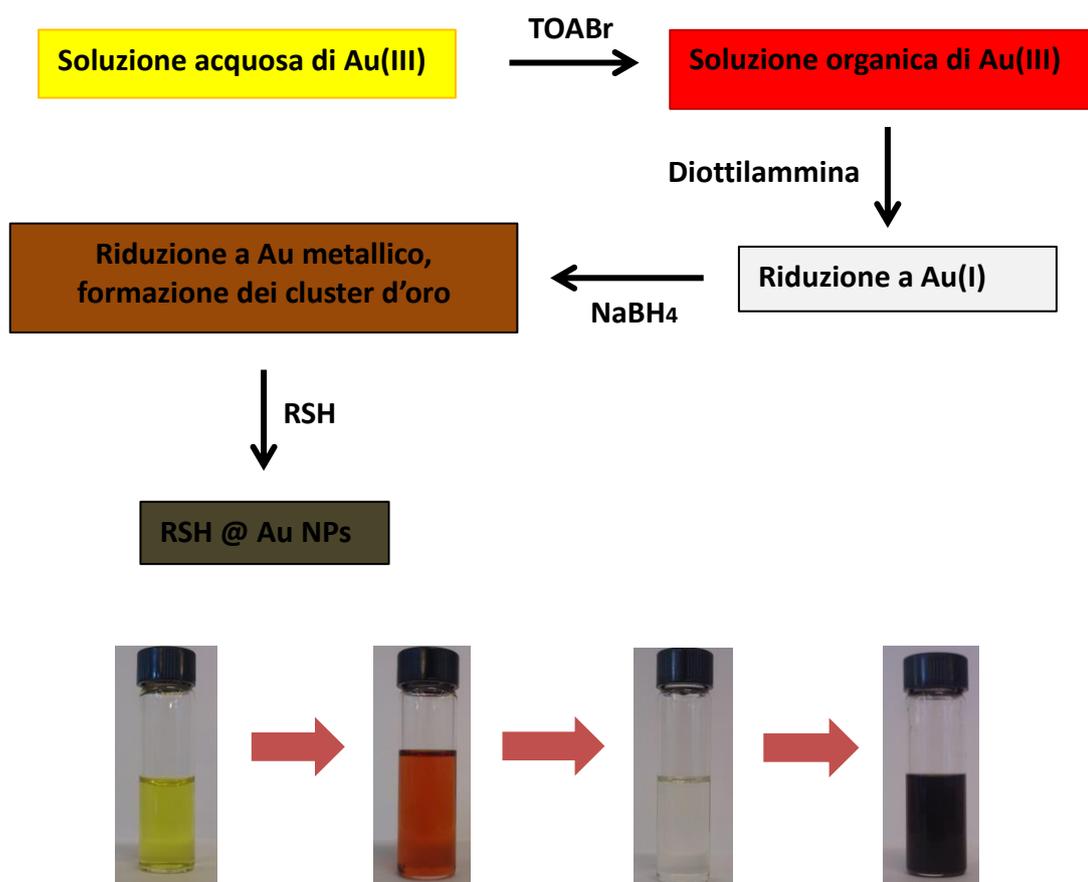


Fig. 2.4: Schema di sintesi di Au NPs con diametro di 2 nm secondo la procedura descritta in [2a] da Scrimin et al.

Questo approccio sintetico prevede il trasferimento di fase dell'Au(III) dalla fase acquosa a toluene, processo mediato da tetraottilammonio bromuro.

Successivamente alla soluzione di Au(III) in toluene viene aggiunta diottilammina in largo eccesso. L'aggiunta di diottilammina gioca due ruoli ben distinti nella sintesi. In primo luogo, in virtù del fatto che Au(III) tende a ridursi molto facilmente, agisce da blando

riducente in un processo di trasferimento elettronico di Marcus^[3]: questo provoca la riduzione da Au(III) a Au(I) in fase organica, osservabile ad occhio nudo con il lento viraggio della soluzione da rosso/arancio a trasparente. Il secondo ruolo della diottilammina è di agire da template per le nanoparticelle dopo la riduzione da Au(I) a Au metallico con NaBH₄. La quantità di diottilammina aggiunta è determinante al momento dell'aggiunta di NaBH₄ al fine di ottenere le dimensioni desiderate, in quanto le ammine vanno a passivare in maniera metastabile la superficie metallica esposta al solvente, abbassando l'energia libera della superficie metallica. Più la diottilammina è abbondante nella soluzione al momento della formazione dei cluster di Au metallico, più le nanoparticelle saranno di dimensione ridotta, in quanto si impedisce l'accrescimento dei cluster d'oro immediatamente successivo alla nucleazione.

È stato osservato che la sintesi proposta da Scrimin et al. può portare a AuNPs di dimensioni comprese tra i 2 e i 10 nm variando la quantità di diottilammina in soluzione (*Cfr. Parte Sperimentale*), mantenendo per nanoparticelle di piccole dimensioni un maggior grado di monodispersività.

Le nanoparticelle passivate con diottilammina sono stabili solo per un arco di tempo ridotto, in quanto il legame oro-diottilammina non è abbastanza forte da garantire una passivazione definitiva del colloide. Il passaggio successivo richiede l'aggiunta dei tioli sintetizzati alla soluzione organica, disciolti in un solvente opportuno. Nonostante il comportamento molto simile dei tioli C6TACN, C9TACN e C12TACN in fase di sintesi in termini di solubilità e reattività, una volta effettuata la deprotezione la solubilità dei tre tioli è risultata diversa. Mentre C6TACN e C9TACN risultano molto ben solubili in acqua, C12TACN al contrario è solubile solo in MeOH. Questa osservazione suggerisce come, prevedibilmente, procedendo verso molecole composte da una catena alchilica più lunga si sacrifichi parzialmente la solubilità di acqua.

L'aggiunta dei tioli alla soluzione organica di cluster di Au metallico provoca l'immediata passivazione dei nuclei d'oro con spiazzamento della diottilammina dalla superficie del metallo, causando conseguente precipitazione delle nanoparticelle dalla fase organica. In seguito all'aggiunta di acqua si può osservare come tutte le Au NPs passivate con i tre tioli passino nella fase acquosa.

La purificazione dei tre sistemi così sintetizzati prevede lavaggi sequenziali della fase acquosa con diversi solventi organici al fine di rimuovere l'eccesso di TOABr e

diottilammina residui; inoltre sui tre campioni vengono effettuati altri due ulteriori passaggi di purificazione per gel filtrazione con Sephadex LH-20 (eluente: MeOH) e Sephadex G-25 (eluente: H₂O).

Tutti i campioni vengono ridotti di volume con evaporazione del solvente a pressione ridotta, senza però mai essere portati totalmente a secco, al fine di evitare fenomeni di aggregazione indesiderati. Le nanoparticelle sintetizzate si dimostrano dopo purificazione ben solubili in solvente acquoso.

2.4 Caratterizzazione di AuNPs C6TACN, C9TACN, C12TACN

La caratterizzazione completa dei tre sistemi sintetizzati è fondamentale per garantire l'accuratezza dei dati ottenuti dagli studi catalitici e di binding che vengono effettuati successivamente.

Cinque parametri fondamentali, che verranno discussi in seguito, sono stati accertati attraverso opportune caratterizzazioni:

- Dimensioni dei cluster d'oro (TEM, UV-Vis)
- Dimensioni del nanosistema (DLS)
- Rapporto tra parte organica e inorganica (TGA)
- Analisi qualitativa e quantitativa (in termini di concentrazione di headgroups) del monostrato, valutazione dell'assenza di impurezze organiche (¹H-NMR)
- Stato di aggregazione (DLS, UV-Vis)

2.4.1 Dimensioni dei Cluster d'oro: microscopia elettronica a trasmissione

Il metodo più affidabile per caratterizzare sistemi nanostrutturati metallici è la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), che permette un'analisi rapida delle dimensioni e della distribuzione dei core metallici delle nanoparticelle. Di contro questo metodo è viziato dall'osservazione di ridotte porzioni del campione e, perciò, non è

sempre indicativo per identificare la presenza di aggregati ed è quindi limitato nell'accertamento della monodispersività del campione (comunque fattibile analizzando porzioni di campione sufficientemente grandi).

Di seguito sono riportate le immagini TEM relative ai tre campioni analizzati e la relativa distribuzione dimensionale.

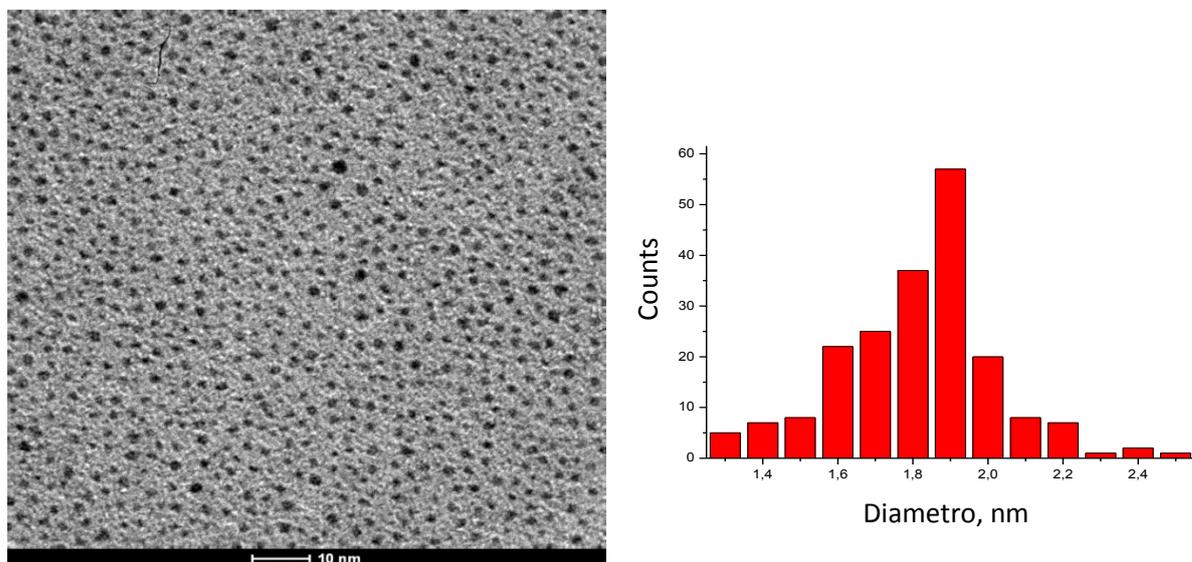


Fig. 2.5: Analisi dimensionale di Au NPs C6TACN tramite microscopia elettronica a trasmissione (diametro medio 1.8 ± 0.2 nm).

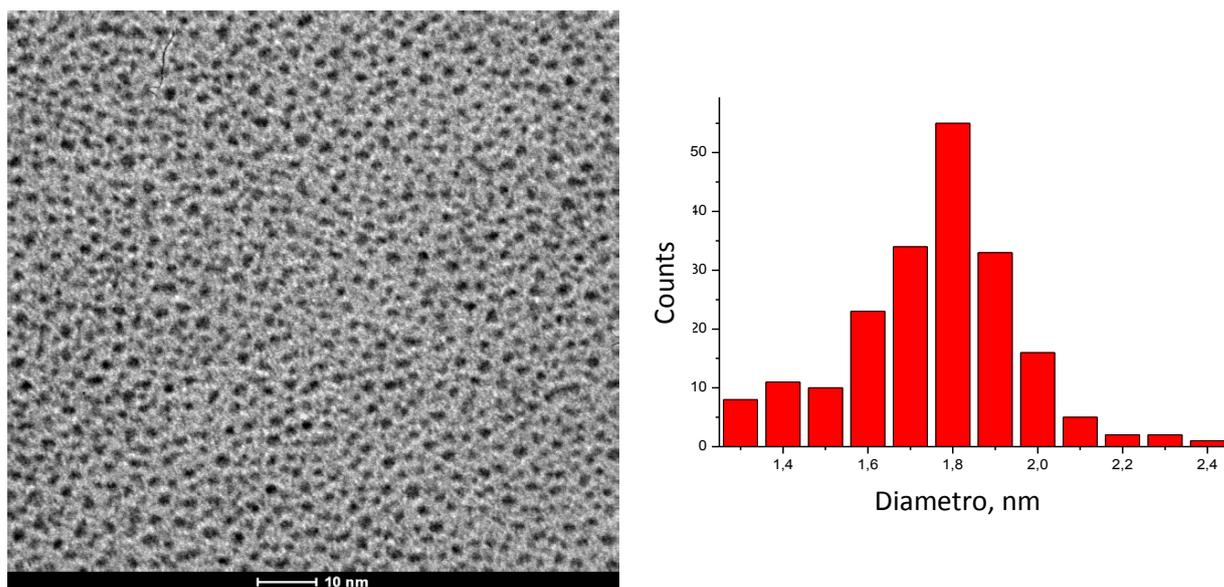


Fig. 2.6: Analisi dimensionale di Au NPs C9TACN tramite microscopia elettronica a trasmissione (diametro medio 1.7 ± 0.2 nm).

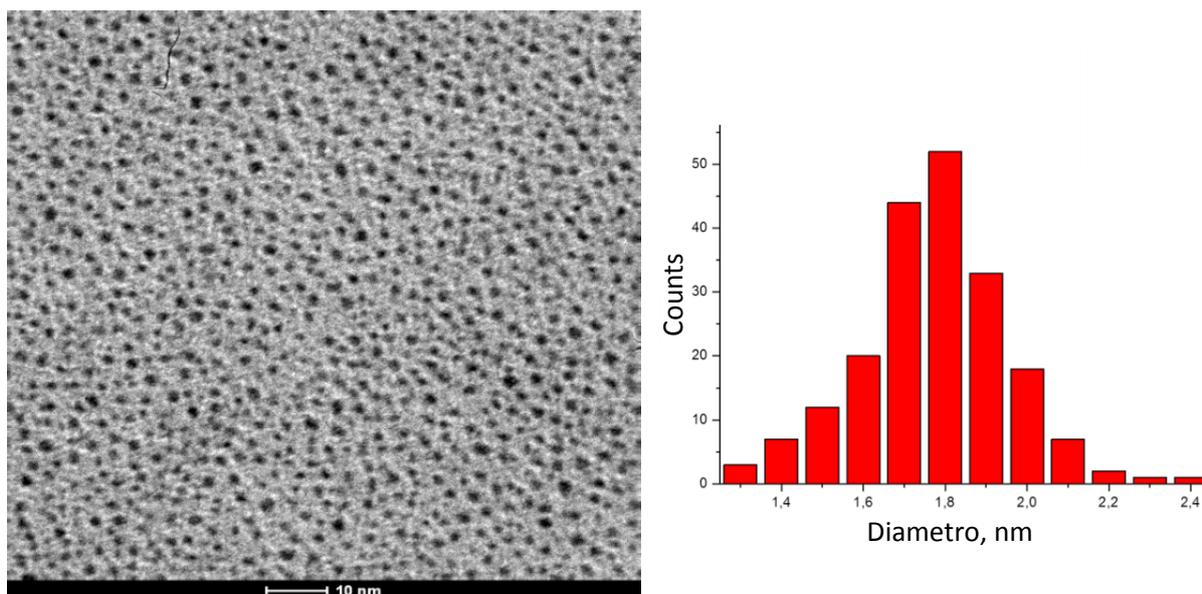


Fig. 2.7: Analisi dimensionale di Au NPs C12TACN tramite microscopia elettronica a trasmissione (diametro medio 1.8 ± 0.2 nm).

Come si può osservare nei tre casi (Fig. 2.5-2.7) le dimensioni dei core metallici si confermano attorno a un diametro leggermente inferiore ai 2.0 nm, garantendo l'omogeneità dei core metallici dei tre diversi campioni al variare del legante. Nonostante l'apparente mancanza per i tre campioni di aggregati di grandi dimensioni, si preferisce accertare questo tipo di dato con tecniche (spettrofotometria, DLS) che siano in grado di analizzare la presenza di aggregati in soluzione piuttosto che in un campione portato a secco.

2.4.2 Stato di aggregazione: analisi UV-Vis

È noto in letteratura ormai da decenni come le dimensioni di un oggetto nanometrico influenzino le proprietà ottiche dello stesso^[5]. In termini pratici questo concetto può trovare applicazione nell'analisi di campioni di Au NPs in quanto permette una valutazione rapida e affidabile delle dimensioni e della monodispersione delle nanoparticelle nel campione attraverso l'accertamento dell'assenza della banda plasmonica di superficie (520 nm per nanoparticelle d'oro, che si sposta verso lunghezze

d'onda più alte per aggregati di grosse dimensioni) a conferma delle dimensioni inferiori ai 3.0 nm dei nano-oggetti in soluzione.

In seguito sono riportati gli spettri di assorbimento dei tre campioni sintetizzati:

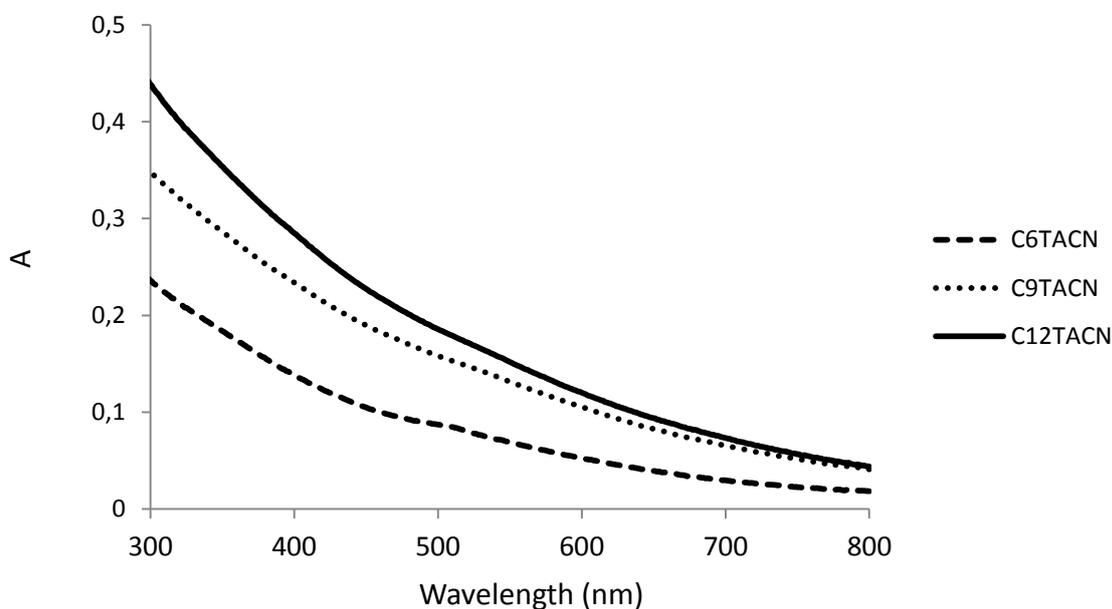


Fig. 2.8: Spettri UV-Vis dei tre batch di Au NPs C6TACN, C9TACN, C12TACN. [TACN]=50 μ M, [HEPES]=10 mM pH 7.0, 25°C.

Nei tre casi non si distingue alcun picco di assorbimento definito a 520 nm, potendo quindi certamente collocare le dimensioni delle nanoparticelle dei tre campioni al di sotto dei 3 nm. Questa analisi è riprova del fatto che in soluzione non sono presenti nanoparticelle di grosse dimensioni e che i tre campioni sono stabili in ambiente acquoso. È inoltre interessante distinguere come, a parità di concentrazione di gruppi TACN in soluzione (la determinazione della concentrazione di macrociclo nelle stock solutions di nanoparticelle è discussa nella Sez. 2.3.6), l'assorbimento di Au NPs C6TACN sia notevolmente più basso. Tale risultato è imputabile ad una diversa stechiometria oro/tiolo nei diversi campioni preparati. Questo fatto si riflette direttamente sull'assorbimento su tutto lo spettro (tipico della nanoparticella d'oro): quando la concentrazione di TACN in soluzione è normalizzata tra i tre campioni (50 μ M) il contributo all'assorbimento apportato dal core d'oro per Au NPs C6TACN è inferiore in quanto la stechiometria tra oro e tiolo è diversa (Cfr. 2.4.4).

2.4.3 Dimensioni della nanoparticella: Dynamic Light Scattering

Nonostante la microscopia TEM sia indiscutibilmente utile per determinare le dimensioni del core inorganico della nanoparticella e fornisca un riscontro visivo dell'assenza di aggregati, non rivela alcuna informazione riguardante la nanoparticella nella sua interezza, in quanto il monostrato non è sufficientemente elettrone-denso da permetterne diretta osservazione. Per accertare le dimensioni della nanoparticella è stato necessario effettuare misure DLS (Dynamic Light Scattering) in grado di valutare il volume idrodinamico delle nanoparticelle sintetizzate, correlando la capacità di scattering della luce incidente con le dimensioni del nano-oggetto.

In seguito sono riportate le misure relative ai profili DLS relativi alle nanoparticelle preparate:

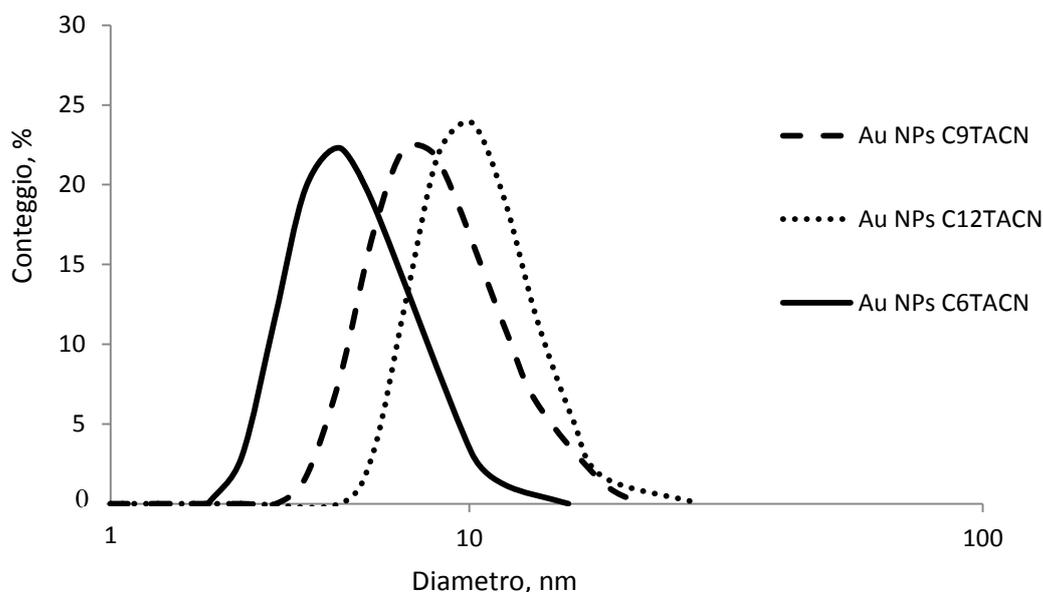


Fig. 2.9: Distribuzione dei diametri relativi ai volumi idrodinamici di Au NPs C6TACN, C9TACN, C12TACN valutata attraverso DLS (mQ water, 25°C).

In Tab. 2.2 sono riportati i valori calcolati come diametro della popolazione maggiormente rappresentata, basati sui dati di distribuzione osservati dalla misura DLS per i tre campioni.

Campione	Diametro (nm)
Au NPs C6TACN	5.6
Au NPs C9TACN	8.1
Au NPs C12TACN	10.9

Tab. 2.2: Diametri modali ottenuti dall'analisi DLS per i tre campioni di Au NPs sintetizzati.

Nei tre casi si può escludere la presenza di aggregati di grosse dimensioni, dimostrando la stabilità dei tre campioni in ambiente acquoso. È interessante osservare come con DLS si possa seguire l'andamento dei diametri nanoparticellari all'aumentare dello spessore del monostrato organico, dovuto alla modificazione della lunghezza della catena alchilica. Nonostante sia noto in letteratura^[4] come il confronto diretto tra dimensioni della nanoparticella effettive e dimensioni teoriche partendo da una stima della lunghezza dei leganti e del diametro della nanoparticella sia poco affidabile, è interessante osservare come l'aumento delle dimensioni delle nanoparticelle a seconda della lunghezza del legante si dimostri essere lineare. Tale informazione permette quindi di correlare tale aumento di diametro della nanoparticella con l'aumento di lunghezza dei tioli stessi.

2.4.4 Rapporto parte organica/inorganica: analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA), permette di accertare il rapporto tra parte organica e parte inorganica di sistemi ibridi organici-inorganici. I tre campioni di nanoparticelle d'oro vengono sottoposti a combustione per graduale aumento di temperatura, registrando la perdita di peso dovuta all'ossidazione ed allontanamento della componente organica (come ossidi di carbonio, azoto e zolfo) mantenendo solo la frazione inorganica.

Nelle tre figure seguenti sono riportati i grafici relativi alla perdita di peso percentuale per i tre campioni di nanoparticelle d'oro.

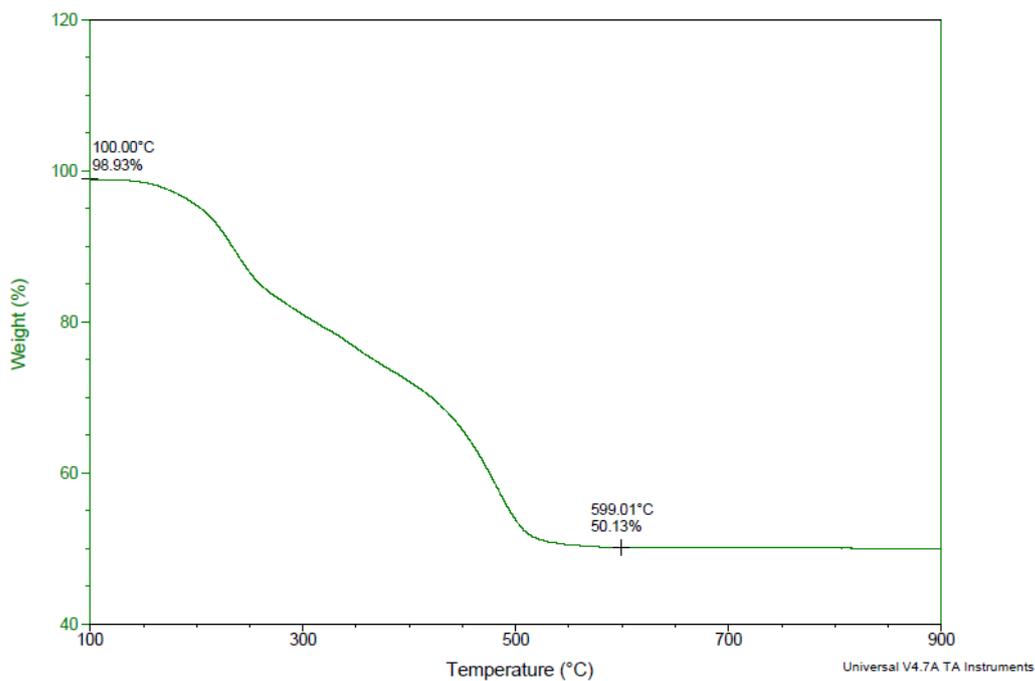


Fig. 2.10: Profilo termogravimetrico di Au NPs C6TACN (Rampa 10°C/min, aria)

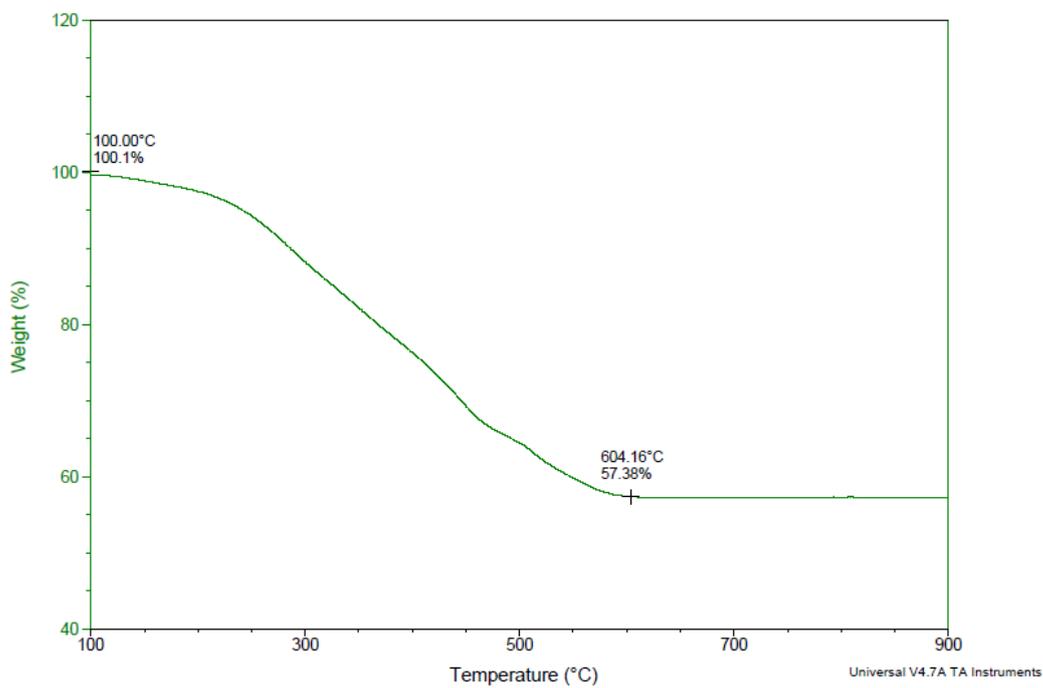


Fig. 2.11 Profilo termogravimetrico di Au NPs C9TACN (Rampa 10°C/min, aria)

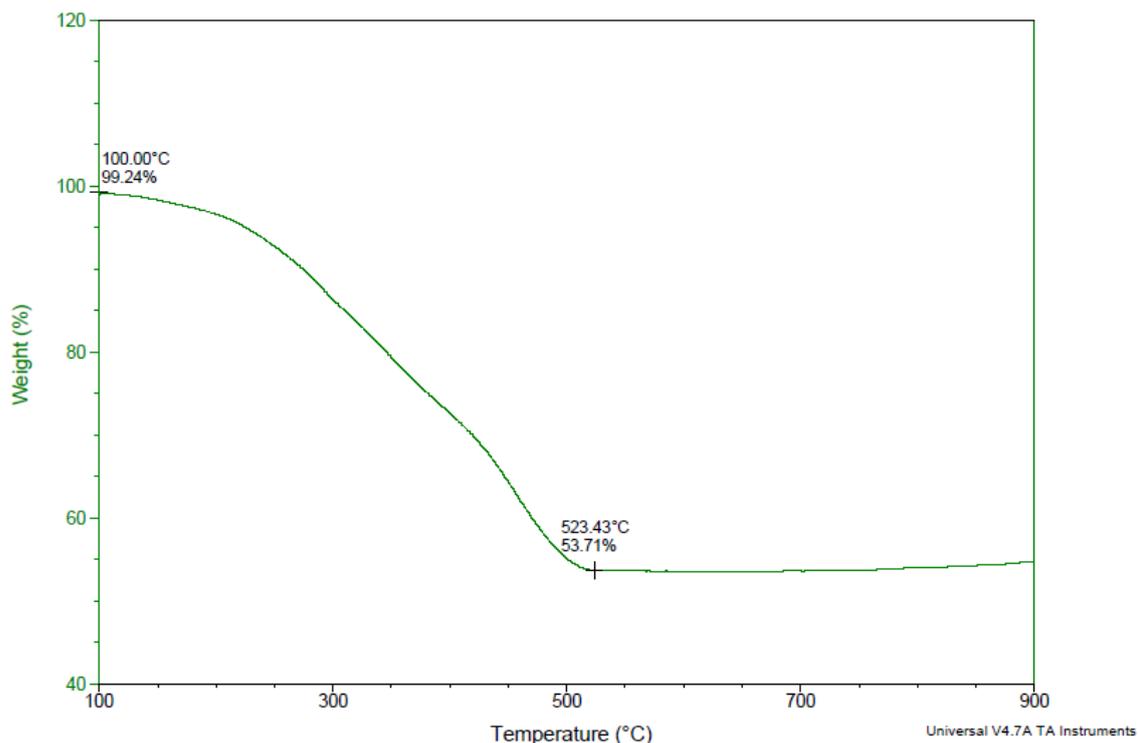


Fig. 2.12: Profilo termogravimetrico di Au NPs C12TACN (Rampa 10°C/min, aria)

Campione	Parte inorganica %	Parte organica %	Ratio RSH/Au
Au NPs C6TACN	50.6	49.3	0.78
Au NPs C9TACN	57.4	42.6	0.51
Au NPs C12TACN	54.1	45.8	0.5

Tab. 2.3: Percentuali di frazione organica e inorganica dei campioni analizzati, calcolati mediante termogravimetria.

Dalle percentuali relative alla perdita di peso dei tre diversi campioni è possibile, conoscendo il peso dei campioni, ottenere i valori molari relativi alla componente inorganica (Au metallico) e alla componente organica (tioli), più facilmente confrontabili tra loro come rapporto molare.

Lo studio dei rapporti molari tra tiolo e oro evidenzia come tale rapporto sia sensibilmente più elevato per Au NPs C6TACN rispetto a Au NPs C9TACN e Au NPS C12TACN, che invece si attestano su un rapporto tiolo/oro molto simile tra di loro.

L'aumento di oltre il 50% del rapporto RSH/Au testimonia come il tiolo più corto sia più rappresentato sulla superficie della nanoparticella rispetto a tioli di maggior lunghezza.

Il risultato ottenuto è compatibile con l'osservazione di un minore assorbimento dei core d'oro in Au NPs C6TACN riscontrato per via spettrofotometrica.

Questo fenomeno può essere dovuto a interazioni laterali di carattere idrofobico che promuovono l'impaccamento delle catene alchiliche corte (quindi con meno gradi di libertà) che compongono le subunità del monostrato su Au NPs C6TACN, o interazioni di tipo legame idrogeno tra gli anelli macrociclici che si intensificano con l'avvicinamento dell'headgroup di TACN alla superficie d'oro.

2.4.5 Analisi qualitativa del monostrato: spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

Gli studi precedentemente discussi non prendono in considerazione la composizione qualitativa del monostrato adsorbito alla nanoparticella metallica, ma si soffermano su parametri meramente quantitativi. Per la determinazione dell'omogeneità qualitativa del monostrato e per valutare l'assenza di impurezze organiche in soluzione si ricorre alla spettroscopia $^1\text{H-NMR}$.

Questo tipo di tecnica risente molto delle limitazioni poste dal sistema molecolare. In primo luogo i segnali di molecole legati alla superficie metallica non sono ben definiti come nel caso dei picchi relativi a molecole in soluzione. Questo effetto, conosciuto come *broadening* dei segnali è dovuto a due motivi:

1. Allungamento dei tempi di rilassamento spin-spin;
2. Eterogeneità di intorno magnetico nei siti di legame oro-tiolo che cambiano in maniera anche significativa il chemical shift del protone, fatto che si riflette in una distribuzione gaussiana del segnale piuttosto che in un singolo picco;
3. Gradiente di densità dei leganti tiolici muovendosi dal core d'oro verso l'interfaccia nanoparticella-solvente.

Il *broadening* dei segnali si traduce in una difficoltà di interpretazione dei singoli picchi, che si inasprisce all'aumentare delle dimensioni del nano-oggetto, fino a rendere l'analisi NMR improponibile per oggetti con diametro superiore ai 10 nm.

I tre campioni di nanoparticelle sono stati sottoposti ognuno a due diversi tipi di analisi $^1\text{H-NMR}$:

- Spettro in assenza di gradiente di campo: acquisizione di un normale spettro $^1\text{H-NMR}$. Tale analisi permette di valutare il campione nella sua interezza ed è utile per intuire cosa componga il monostrato organico per l'effetto di broadening e cosa invece sia impurezza in soluzione, specie se associato a uno spettro acquisito imponendo un gradiente di campo.
- Spettro acquisito imponendo un gradiente di campo (LEDBP, Low Eddy Currents Distortion Bipolar Gradient Pulses). Rispetto all'analisi NMR descritta nel punto precedente, in questa analisi si impone un gradiente monodimensionale del campo B_0 attraverso una sequenza di impulsi, che permette di registrare selettivamente solo i segnali di molecole che diffondono più lentamente e quindi non sono in grado di rispondere velocemente a variazioni rapide del campo magnetico. In termini pratici questo si traduce nella registrazione di uno spettro in cui sono presenti unicamente i segnali di molecole facenti parte del monostrato organico, prescindendo invece da segnali attribuibili a solventi residui ed eventuali impurezze organiche.

In seguito sono riportati gli spettri NMR registrati con entrambi i metodi per i tre campioni.

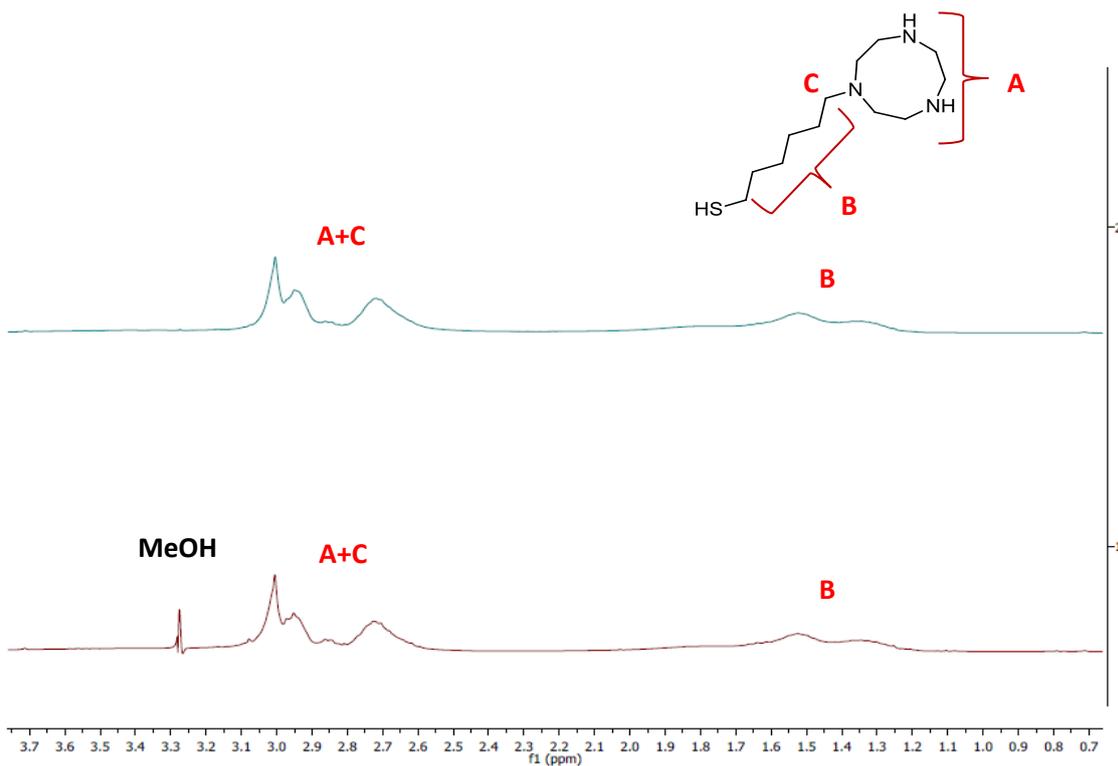


Fig. 2.13: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di Au NPs C6TACN (300 MHz, D_2O), supr. con gradiente di campo, inf. senza gradiente di campo

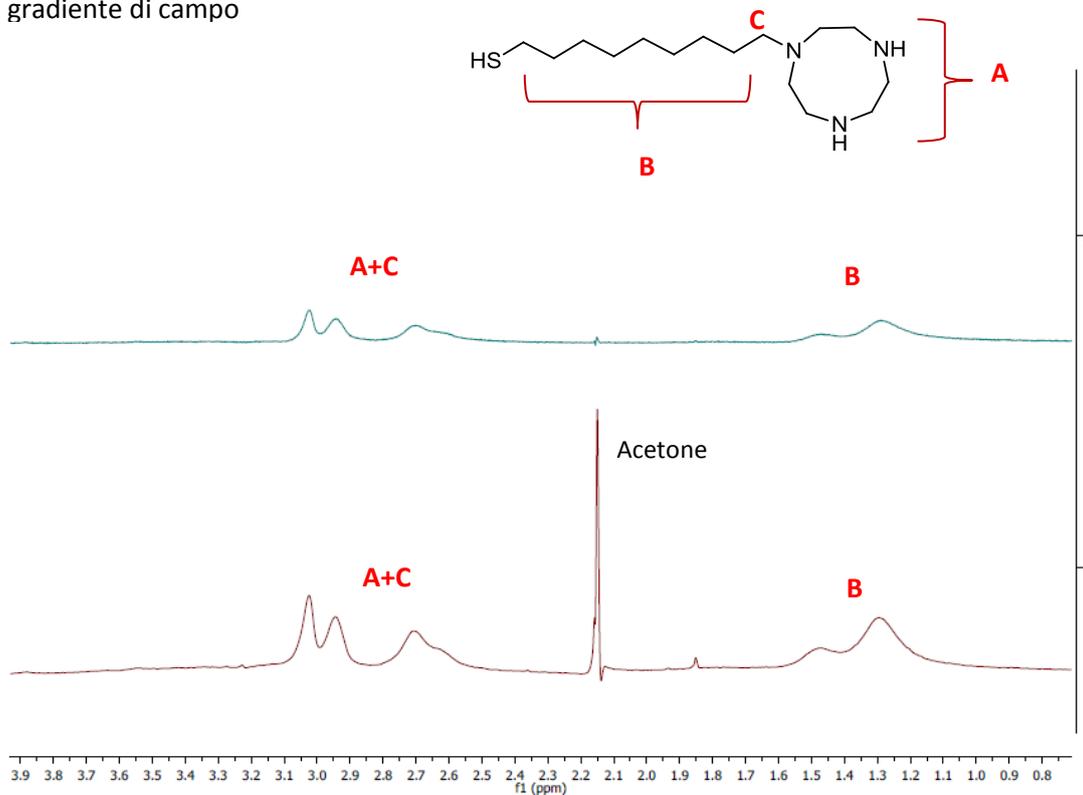


Fig. 2.14: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di Au NPs C9TACN (300 MHz, D_2O), supr. con gradiente di campo, inf. senza gradiente di campo.

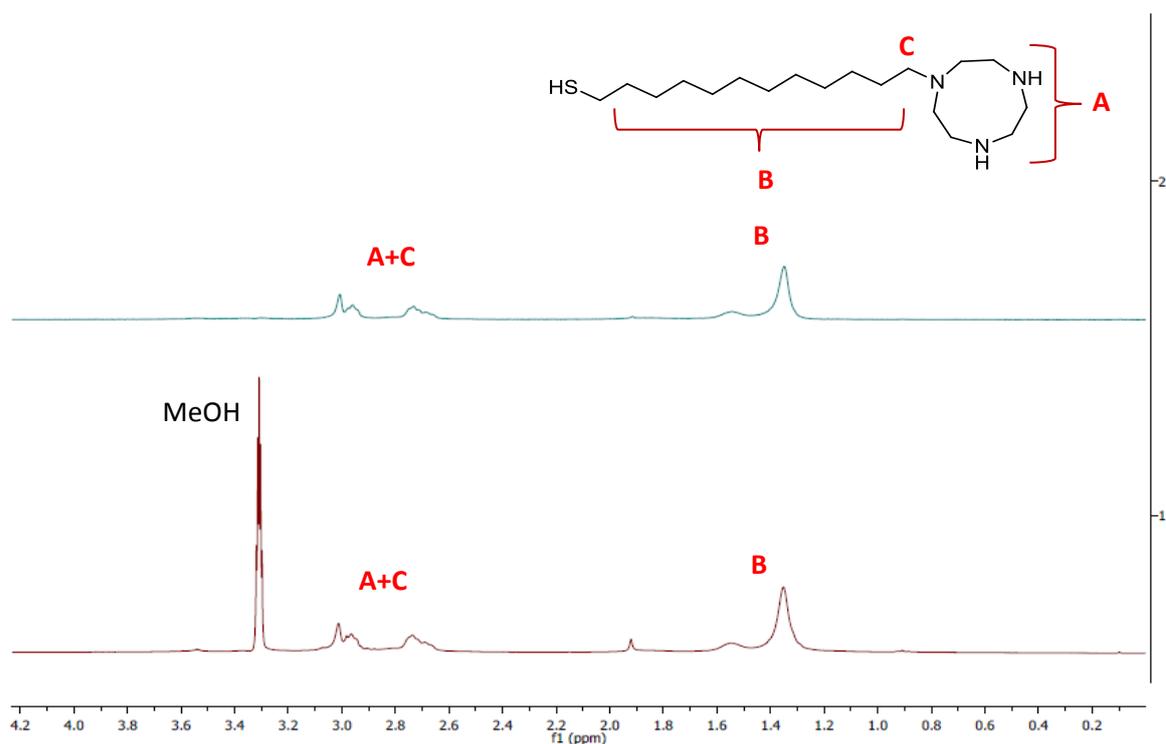


Fig. 2.15: Spettro $^1\text{H-NMR}$ di Au NPs C12TACN (300 MHz, MeOD), supr. con gradiente di campo, inf. senza gradiente di campo.

Dal confronto tra gli spettri ottenuti con e senza gradiente di campo emerge come i campioni siano privi di impurezze, se non attribuibili a trascurabili tracce residue di solventi. Per una pronta solubilizzazione di Au NPs C12TACN si è preferito operare lo spettro NMR in MeOD. Imponendo **A+C** come 14 protoni (in quanto i protoni in posizione α allo zolfo sono troppo vicini alla superficie d'oro per essere osservati) è possibile ottenere i valori relativi agli integrali dei picchi contraddistinti come **B** in Fig. 2.13-2.15 (*Cfr. Appendice*), in buona corrispondenza con i valori teorici.

Campione	H corrispondenti a B	Integrale di B
Au NPs C6TACN	8	7.9
Au NPs C9TACN	14	13.7
Au NPs C12TACN	20	20.1

Tab. 2.4: Valori di integrale dei picchi contrassegnati come **B** ottenuti contro valori teorici.

2.5 Determinazione della concentrazione di gruppi terminali

La determinazione della concentrazione in soluzione di tioli passivanti la nanoparticella è di importanza fondamentale per ogni considerazione successiva sull'attività catalitica e di binding dei sistemi sintetizzati, richiedendo quindi una particolare attenzione. Per convenzione si preferisce lavorare considerando la concentrazione di headgroups in soluzione piuttosto che quella di nanoparticelle; tale accorgimento permette di normalizzare effetti dovuti alle differenze di stechiometria tra oro e tiolo tra i diversi campioni di nanoparticelle che possano essere evidenziate in fase di caratterizzazione.

In alcuni lavori precedenti che impiegavano sistemi catalitici basati su TACN la determinazione della concentrazione di macrociclo in soluzione è stata stabilita principalmente effettuando una titolazione catalitica con $Zn(II)^{[1]}$. Essendo l'attività catalitica mediata dal complesso TACN- $Zn(II)$, con solo un marginale contributo alla catalisi fornito dallo $Zn(II)$ libero, un esperimento di questo tipo permette di valutare la concentrazione di metallo in soluzione in grado di produrre un effetto catalitico massimale, corrispondente quindi alla concentrazione di TACN in soluzione.

Questo metodo, utilizzato senza riserve per determinare la concentrazione di sistemi basati su scaffold dendrimerici e su nanoparticelle, richiede maggior cautela nel caso della determinazione della concentrazione di gruppi TACN nel caso di nanoparticelle in cui il monostrato sia molto impaccato.

Per sistemi a catena corta, infatti, si potrebbero creare problemi di interferenza in termini di legame del catione metallico dovuti all'impaccamento eccessivo del monostrato, risultando in una quantità maggiore di catione metallico richiesta per un effetto catalitico massimale.

In questo contesto, si è preferito utilizzare per la determinazione della concentrazione un pool di metodi, descritti in dettaglio in seguito, per poi compararne i risultati.

2.5.1 Determinazione di [TACN] mediante NMR con standard interno

Questo metodo di determinazione della concentrazione di gruppi terminali è sicuramente il più affidabile, in quanto è diretto ed indipendente dal legame di metallo al macrociclo.

In questo tipo di analisi i tre campioni vengono addizionati di una quantità nota dello standard interno CH_3NO_2 (nitrometano), composto attivo all’NMR che presenta un caratteristico singoletto a 4.40 ppm in D_2O e MeOD attribuibile ai protoni metilici, altamente deschermati dal nitrogruppo.

Conoscendo la concentrazione dello standard interno nel campione si può risalire alla concentrazione dell’analita come proporzione tra i protoni del nitrometano e i protoni dei segnali relativi all’anello TACN (12 protoni) e al metilene della catena alchilica in α all’azoto terziario del TACN (*Cfr. Parte Sperimentale*).

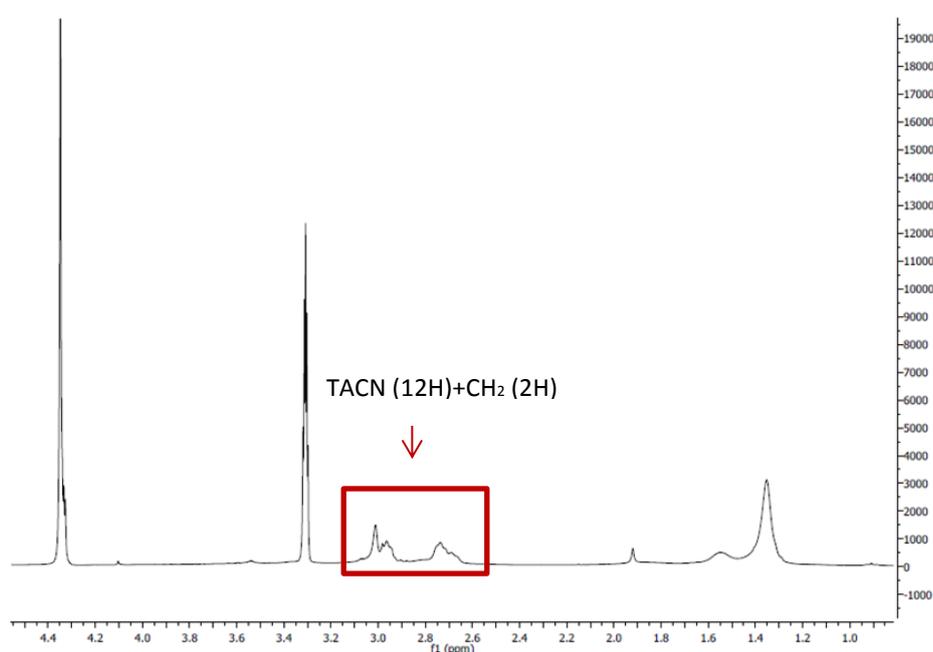


Fig. 2.16: Spettro ^1H -NMR di Au NPs C12TACN (MeOD, 500 MHz) in presenza di standard interno CH_3NO_2 .

I valori ottenuti da questa analisi sono stati usati per stabilire delle concentrazioni operative di TACN nelle successive determinazioni, che serviranno da conferma al dato ottenuto.

2.5.2 Conferma di [TACN] mediante titolazione per catalisi con Zn(II)

Come già ricordato, questo metodo si è rivelato ben affidabile per determinare la concentrazione di nanosistemi basati su leganti macrociclici, ma non può essere

considerato valido a priori per sistemi il cui monostrato sia di diverso spessore, a causa della possibile interferenza dell'ingombro sterico degli anelli di macrociclo nella stechiometria e nella cinetica di formazione del complesso TACN-Zn(II).

Ottenuta una serie di soluzioni madri dei diversi campioni di Au NPs C6TACN, C9TACN e C12TACN in H₂O mQ si è testata l'attività catalitica dei diversi sistemi al variare della concentrazione di Zn(II). Al variare di *loading* di metallo sui leganti macrociclici il sistema avrà attività catalitica massimale solo quando tutte le unità di TACN saranno saturate con lo ione metallico, rimanendo inalterata per concentrazioni più alte di ione metallico. Occorre ricordare che, nonostante lo Zn(II) possieda di per sé una attività catalitica sulla reazione di idrolisi del fosfodiesteri, tale attività è trascurabile rispetto a quella dei complessi TACN-Zn(II) sulla superficie delle nanoparticelle, come evidenziato dall'effetto minimo che ulteriori aggiunte di Zn(II) hanno superata la concentrazione di saturazione degli head groups.

In Fig. 2.17 ed in Tab. 2.5 sono riassunti i risultati della titolazione dei tre campioni di nanoparticelle d'oro con Zn(NO₃)₂.

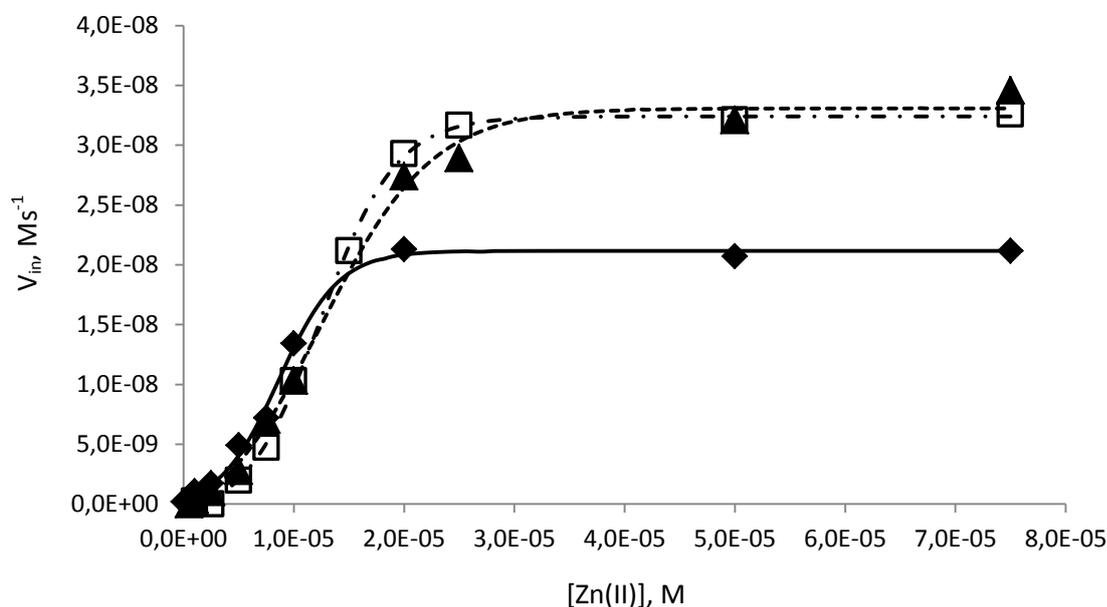


Fig. 2.17: Velocità iniziali nella reazione di transfosforilazione di HPNP al variare della concentrazione di Zn(II) per Au NPs C6TACN (◆), C9TACN(□), C12TACN (▲). [TACN]_{NMR} = 20 μM, [HEPES]=10 mM pH 7.0,[HPNP]=1mM λ= 400 nm, 40°C.

Campione	Conc. stimata su [TACN] _{NMR} =20μM, μM	Equivalenti rispetto a [TACN] _{NMR}
Au NPs C6TACN	18.4 ± 2	0.92
Au NPs C9TACN	20.5 ± 2	1.03
Au NPs C12TAN	23.5 ± 2	1.18

Tab. 2.5: Concentrazioni di Zn(II) saturanti [TACN]_{NMR}=20 μM come ottenute dalla titolazione mostrata in Fig. 2.18.

Si può osservare come gli andamenti siano sigmoidali in tutti e tre i casi presentati, mostrando una attività catalitica trascurabile in assenza di Zn(II). All'aumentare della concentrazione di Zn(II) aumentano anche i valori di v_{in} , fino a raggiungere un massimo che rimane costante per successive aggiunte di catione metallico. Tale dato, supportato dalla forma sigmoidale caratteristica del profilo ottenuto, conferma come nei tre casi considerati l'azione catalitica non sia dovuta al singolo ione metallico, ma alla cooperatività di due centri metallici adiacenti. I dati confermano le concentrazioni delle soluzioni madri ottenute per ¹H-NMR nel margine di errore della misura.

2.5.3 Conferma di [TACN] mediante titolazione diretta con Cu(II)

Essendo noto in letteratura^[1] come il complesso TACN-Cu(II) assorba debolmente nell'UV (a 264 nm), si può ulteriormente confermare la concentrazione di TACN in soluzione aggiungendo aliquote di Cu(NO₃)₂ alle tre soluzioni di Au NPs, le cui concentrazioni siano state determinate con ¹H-NMR e confermate per titolazione con Zn(II) per catalisi. Si può osservare (Fig. 2.18) come nei tre diversi campioni l'assorbimento del complesso aumenti fino a portarsi a un plateau attorno a 50-60 μM, rispettando quindi la concentrazione trovata mediante analisi ¹H-NMR con standard interno e confermata con la titolazione con Zn(II) per catalisi.

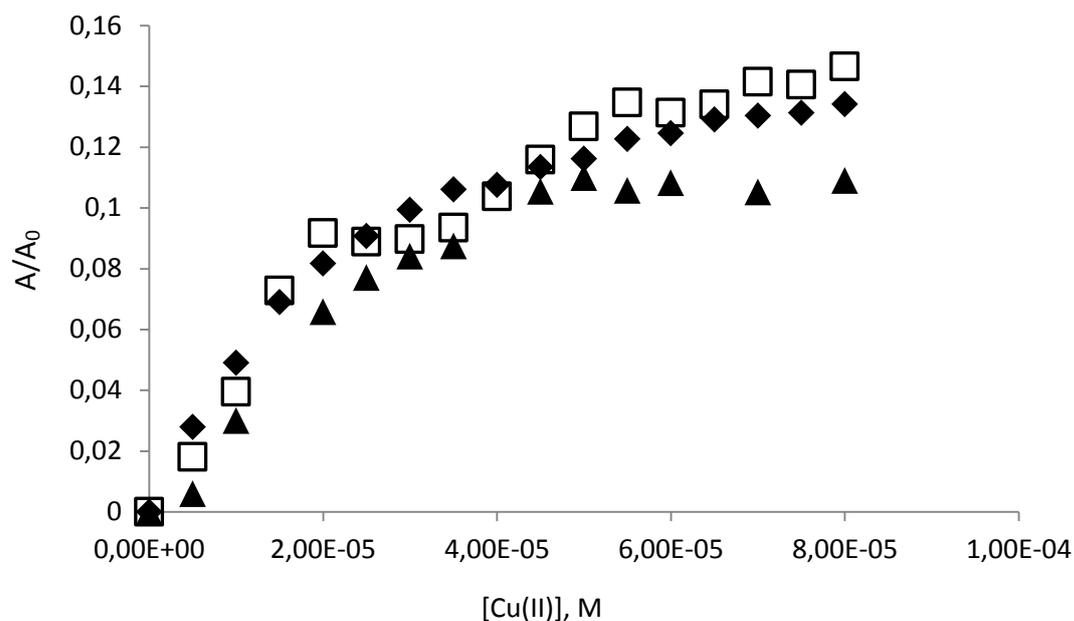


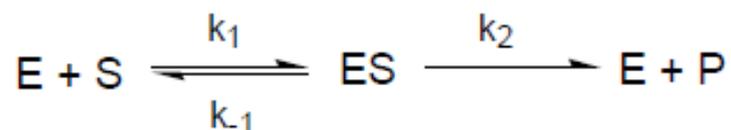
Fig. 2.18: Assorbimento del complesso TACN-Cu(II) al variare della concentrazione di Cu(II) per Au NPs C6TACN (◆), C9TACN(▲), C12TACN (□). [TACN]_{NMR}=50 μM, [MES]=10 mM pH 6.5, λ= 264 nm, 25°C.

Questo metodo, nonostante manchi della precisione dei metodi precedenti a causa dell'assorbimento molto debole del complesso stesso, permette di inquadrare l'intervallo di concentrazione in maniera diretta permettendo di ovviare alla catalisi.

2.6 Valutazione dell'attività catalitica di Au NPs C6TACN, C9TACN, C12TACN

Al fine di comprendere il comportamento cinetico dei tre campioni sintetizzati si effettuano esperimenti cinetici atti a valutare le velocità iniziali della velocità di idrolisi del substrato al varia della concentrazione del substrato stesso.

I catalizzatori biomimetici ideali possiedono caratteristiche cinetiche tipiche degli enzimi e perciò dovrebbero idealmente seguire uno schema catalitico di azione del tipo Michaelis-Menten:



dove k_1 , k_{-1} , k_2 sono le costanti cinetiche rispettivamente per la reazione di associazione tra enzima e substrato a dare il complesso enzima-substrato ES, per la dissociazione del complesso e per la formazione del prodotto a partire dall'intermedio ES.

Quando la cinetica di una reazione enzimatica segue il modello di Michaelis-Menten si ammette il raggiungimento di una condizione di stato stazionario per il complesso ES e che la costante di velocità k_2 caratterizza lo stadio lento della reazione: la velocità di formazione del prodotto viene quindi descritta dall'equazione proposta nel 1913 da Maud Menten e Leonor Michaelis:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

In questa equazione V_0 rappresenta la velocità registrata all'inizio della reazione enzimatica, V_{\max} la velocità massima di catalisi che si ha in condizioni di saturazione dell'enzima, K_M è la costante di Michaelis-Menten e rappresenta l'inverso dell'affinità del substrato per l'enzima, mentre $[S]$ simboleggia la concentrazione del substrato espressa in (mol l^{-1}) . Nell'ipotesi che la reazione d'idrolisi catalizzata dal complesso TACN-Zn(II) segua una cinetica del tipo Michaelis-Menten, tali esperimenti consentono di calcolare i due parametri caratteristici del catalizzatore, k_{cat} e K_M ^[6].

k_{cat} rappresenta il numero di turn-over dell'enzima, ovvero il numero di molecole trasformate nell'unità di tempo da una molecola di enzima; si ottiene dividendo V_{\max} per la concentrazione di enzima, dato che $V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]_0$, con il valore di $[E]_0$ che nel caso dei sistema nanozimatici presentati è $[\text{TACN-Zn(II)}]$.

K_M , invece, corrisponde numericamente alla concentrazione di substrato per cui la velocità di idrolisi è semimassimale. E' una costante di dissociazione (dato che $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$), misura quindi l'inverso dell'affinità del substrato nei confronti dell'enzima: tanto più elevato è il valore di questa costante, tanto minore è tale affinità.

Gli esperimenti cinetici vengono condotti a in tampone [HEPES]=10 mM, pH 7.5, [TACN-Zn(II)]= 20 μ M in un range di concentrazione di HPNP tra 0 e 3 mM. La determinazione della precisa concentrazione in termini di [TACN] effettuata in fase di caratterizzazione è indispensabile per questo tipo di valutazione in quanto per avere un dato fedele alla reale capacità catalitica del sistema è necessaria una totale saturazione dei macrocicli espressi sulla superficie della nanoparticella con il catione metallico.

Successivamente si riportano gli andamenti risultanti dai tre esperimenti cinetici (Fig. 2.19) e i valori dei parametri cinetici ottenuti (Tab. 2.6) sfruttando interpolazione dei punti mediante l'equazione di Michaelis-Menten.

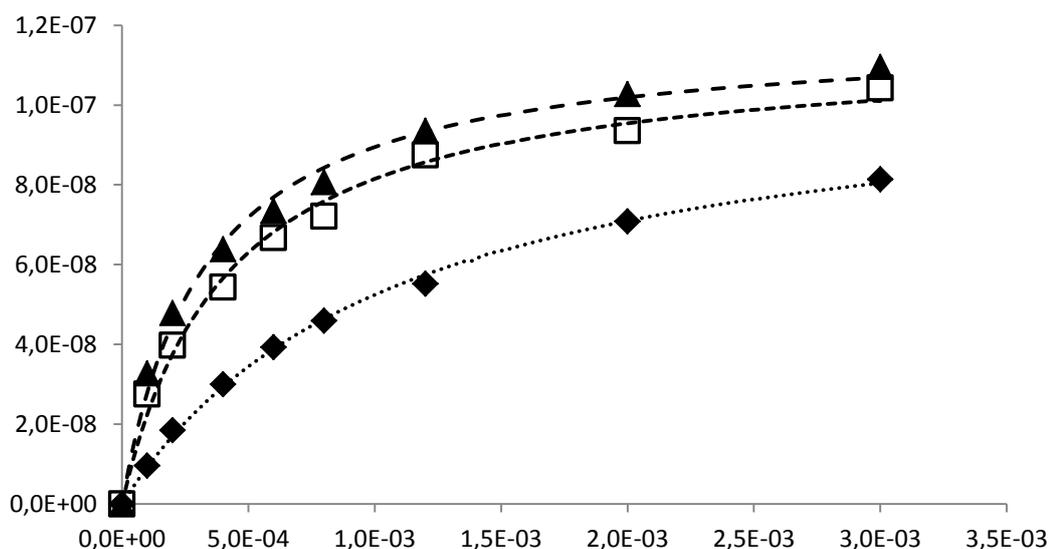


Fig. 2.19: Velocità iniziali per la reazione di transfosforilazione di HPNP al variare della concentrazione del substrato HPNP per Au NPs C6TACN (◆), C9TACN(□) e C12TACN (▲). [TACN-Zn(II)]= 20 μ M, HEPES 10 mM pH 7.5, λ =400 nm, 40°C.

Campione	k_{cat}, s^{-1}	K_M, M	$k_{cat}/K_M (l\ mol^{-1}s^{-1})$
Au NPs C6TACN	$5.5 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	5.4 ± 0.5
Au NPs C9TACN	$5.8 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	$4.1 \pm 0.4 \times 10^{-4}$	13.9 ± 1.2
Au NPs C12TACN	$5.9 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	$3.2 \pm 0.3 \times 10^{-4}$	18.4 ± 1.1

Tab. 2.6: Parametri cinetici ricavati dagli esperimenti cinetici di Michaelis-Menten presentati in Fig. 2.20.

Emerge immediatamente, osservando i parametri cinetici, come Au NPs C9TACN e C12TACN abbiano un comportamento cinetico molto simile, a testimonianza del fatto che variazioni strutturali atte ad aumentare lo spessore del monostrato e distanziare le unità catalitiche costituenti il sito bimetallico non influenzano in maniera rilevante la catalisi né in termini di attività catalitica intrinseca, né per quanto riguarda capacità di interagire con il substrato.

Au NPs C6TACN al contrario rappresenta un'anomalia rispetto agli altri due sistemi catalitici. La catalisi in termini di k_{cat} è molto simile ai sistemi catalitici analoghi a lunga catena, suggerendo come il meccanismo alla base dell'attività catalitica sia lo stesso; la differenza più rilevante viene osservata in termini di K_M , con un valore considerevolmente più alto. Il valore di K_M rappresenta un'importante indicazione dell'interazione tra il sistema catalitico e il substrato della catalisi: un aumento di tale valore è infatti associato ad una interazione più debole del substrato con il nanosistema. Il significato di tale differenza può essere associato alle caratteristiche strutturali dei sistemi preparati, sia in termini di posizionamento delle unità catalitiche che in termini di spessore e densità del monostrato organico.

Il legame del substrato a nanoparticelle passivate con leganti di maggior lunghezza non è influenzato dalla lunghezza del legante stesso dopo un certo numero di atomi di carbonio, come si evince dal fatto che non vi è sostanziale differenza tra le K_M di Au NPs C9TACN e C12TACN, ulteriormente avvalorato dalla K_M per il sistema presentato in introduzione e precedentemente studiato^[1], paragonabile in termini di lunghezza al tiolo C12TACN, ma strutturalmente diverso dalla serie di tioli sintetizzata per lo studio

riportato nello svolgimento di questa tesi. Si può ipotizzare che per lunghezze maggiori la motilità delle catene permetta al sito di legame bimetallico di orientarsi attorno al substrato in maniera ottimale, fattore che invece non sembra essere presente per una catena alchilica corta come nel caso del tiolo C6TACN. È tuttavia impossibile distinguere quale sia il contributo a questo fenomeno dato dai singoli elementi di impaccamento del monostrato maggiore e vicinanza tra il complesso TACN-Zn(II) e la superficie metallica, fattori che contribuiscono a chiudere le distanze tra le unità cataliticamente attive.

Un altro aspetto che potrebbe essere determinante nella interazione tra HPNP e nanoparticella risiede nella possibilità di stabilizzazione del complesso [ES] descritto nell'equazione di Michaelis-Menten per interazione idrofobica tra monostrato e substrato, con conseguente minore affinità con l'assottigliarsi della porzione idrofobica del monostrato (rappresentata dalle catene alchiliche) nella serie di nanoparticelle sintetizzate.

Da questo punto di vista, sebbene questo studio sia determinante nel definire squisitamente la capacità catalitica di sistemi nanostrutturati analoghi per struttura a un sistema pre-esistente, è difficile definire in maniera univoca la natura dell'interazione tra nanozima e substrato basandosi unicamente su risultati catalitici, essendo questi influenzati da un gran numero di fattori.

2.7 Titolazione di Au NPs C6TACN, C9TACN, C12TACN con oligoanioni fluorescenti

Le cinetiche di Michaelis-Menten hanno evidenziato una differenza in termini di legame del substrato alla nanoparticella, senza però suggerire in maniera univoca la natura di tale differenza di comportamento.

L'analisi della morfologia del monostrato ha da sempre rappresentato una sfida nello studio e nella caratterizzazione di nanosistemi, affrontata da diversi gruppi di ricerca tramite metodi diversi^[7].

Un metodo molto efficace per lo studio di monostrati organici carichi positivamente proposto di recente da Prins et al.^[8] consiste nell'utilizzo di probe fluorescenti oligoanionici per titolare la superficie della nanoparticella. La titolazione con il probe fluorescente permette di accertare la concentrazione di saturazione del monostrato, ossia la massima concentrazione per la quale si osserva legame tra la nanoparticella e il probe fluorescente: quando l'oligoanione è legato a Au NPs vi è un quenching della fluorescenza dovuto a fenomeni di NSET (NanoSurface Energy Transfer), osservando invece fluorescenza per concentrazioni di probe superiori alla concentrazione di saturazione del monostrato (Fig. 2.20).

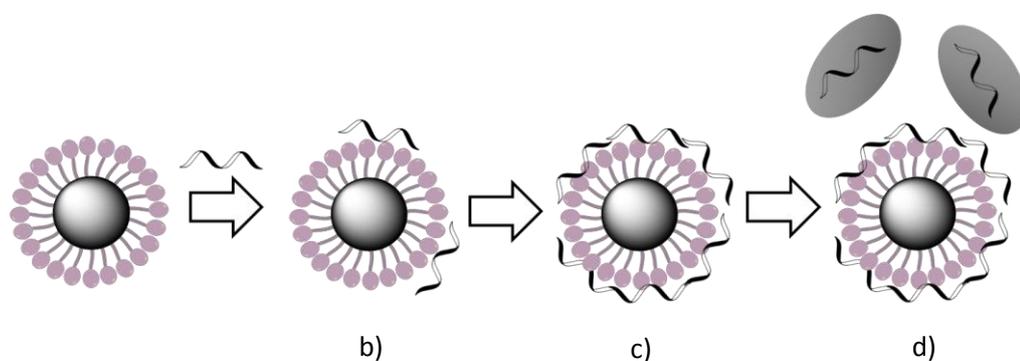


Fig. 2.20: Esempio di titolazione di Au NPs cariche positivamente (a) con probe fluorescente. Aumentando la concentrazione di probe questi si lega alla nanoparticella (b) fino ad arrivare a saturazione dei siti carichi, situazione in cui la fluorescenza è ancora sottoposta a quenching (c). Per successivo aumento della concentrazione di oligoanione questi non è più in grado di legare la nanoparticella (d) e rimane libero in soluzione; non essendo più sottoposto a quenching la fluorescenza si accende.

Si decide di adottare la stessa strategia investigativa nello studio di Au NPs C6TACN, C9TACN e C12TACN in modo da integrare le conclusioni ottenute per via catalitica. In questo senso, comprendere come le capacità di legame di un oligoanione alla nanoparticella varino a seconda della lunghezza della catena alchilica e della densità del monostrato organico può aiutare a comprendere come le distanze tra i complessi TACN-Zn(II), variabili a seconda del loading del tiolo sulla superficie e della lunghezza della catena stessa, vadano ad influire sull'interazione nanosistema-probe.

In un primo studio si è utilizzato un analogo fluorescente dell'ATP (2-amminopurina-riboside-5'-trifosfato, fATP, in Fig. 2.21) per sondare il monostrato sulla base di interazioni di carica. È noto come nell'interazione tra monostrato e fATP la componente di interazione idrofobica sia trascurabile e il legame sia di natura elettrostatica^[8].

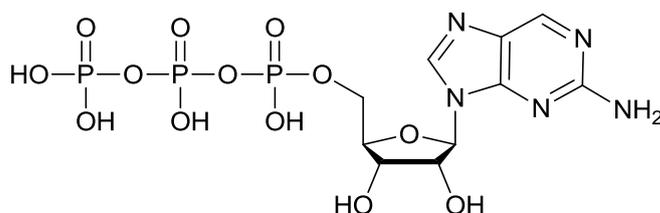


Fig. 2.21: 2-amminopurina-riboside-5'-trifosfato (fATP), $\lambda_{ex}=305$ nm, $\lambda_{em}=370$ nm.

La titolazione con fATP permette di accertare la concentrazione di saturazione del monostrato: quando fATP è legato a Au NPs vi è un quenching della fluorescenza, osservando una accensione della fluorescenza del probe conseguente alla saturazione del monostrato organico.

I tre campioni vengono titolati nelle medesime condizioni: [TACN-Zn(II)]=10 μ M, [HEPES]=10 mM, pH 7.0, 25°C, valutando l'emissione a $\lambda=370$ nm in seguito a eccitazione a $\lambda=305$ nm.

I risultati, correlati di valori di concentrazione di saturazione ottenuti (Tab. 2.7), sono riportati in Fig. 2.22:

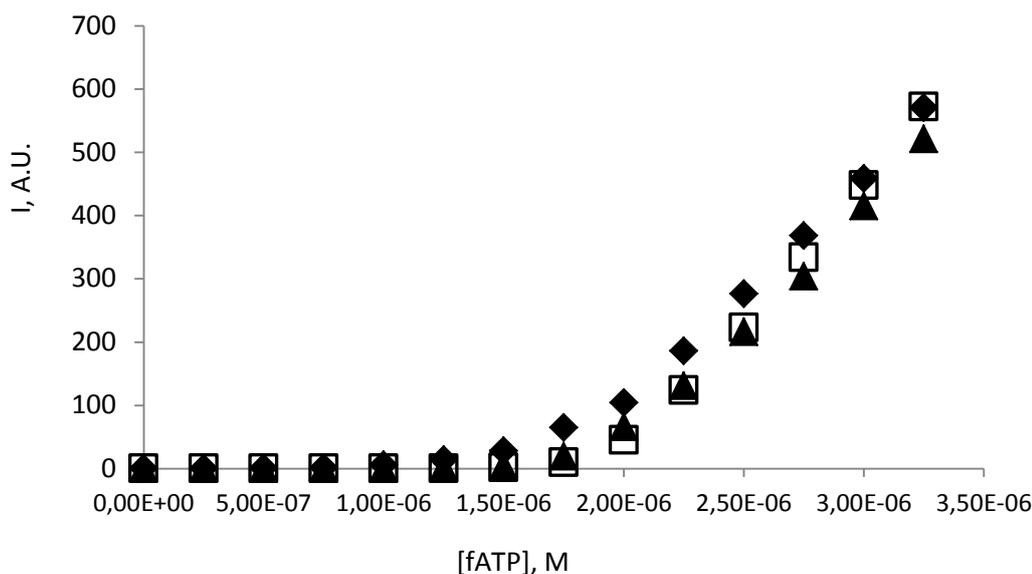


Fig. 2.22: Intensità di fluorescenza osservata al variare della concentrazione di fATP per Au NPs C6TACN (◆), Au NPs C9TACN (□), Au NPs C12TACN (▲); [TACN-Zn(II)]= 10 μ M, [HEPES]= 10 mM, pH 7.0, 25°C, λ_{ex} =305 nm, λ_{em} =370 nm.

Campione	Concentrazione di saturazione, μ M
Au NPs C6TACN	1.8 \pm 0.2
Au NPs C9TACN	2.0 \pm 0.2
Au NPs C12TACN	1.9 \pm 0.2

Tab. 2.7: Concentrazioni di saturazione dei monostrati calcolati per l'esperimento in Fig. 2.22.

Poiché la titolazione con fATP non dimostra sostanziali differenze in termini di concentrazione di saturazione tra i diversi campioni, attestandosi per i tre diversi monostrati organici nanosupportati nello stesso range di concentrazione di 2.0 μ M, si può concludere affermando che l'orientazione delle subunità del monostrato e l'impaccamento del monostrato non abbiano una sostanziale influenza sul legame mediato dall'interazione elettrostatica tra nanoparticella e fATP, legame che interessa solamente la parte più superficiale del monostrato. Tale osservazione è imputabile

all'alta affinità che fATP ha per il monostrato che impedisce di osservare differenze di binding dovute ad effetti di natura più debole.

Al fine di indagare l'affinità del monostrato organico mediata da contributo idrofobico, si è scelto di sostenere una seconda serie di studi con una diversa serie di probe fosfati strutturalmente simili ad adenosin-(n)-fosfato ma dotati di un diverso fluoroforo, il gruppo N-metilantirainoico (MANT), situato in posizione 3' sull'anello di deossiribosio (in Fig. 2.23 MANT-AMP a titolo esemplificativo).

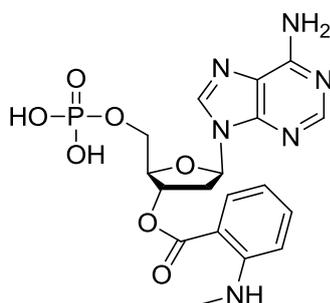


Fig. 2.23: Struttura del probe MANT-AMP, $\lambda_{ex}=350$ nm, $\lambda_{em}=446$ nm.

La differenza strutturale tra i probe basati sul gruppo fluorescente MANT rispetto a fATP determina l'interazione con il monostrato indipendentemente dalla carica, inserendosi direttamente nel monostrato per interazione idrofobica con lo stesso. Tale interazione è stata provata in un lavoro precedente^[9] in quanto il gruppo fluorescente MANT presenta un caratteristico shift di 10-20 nm delle lunghezze d'onda d'emissione dipendente dalla polarità dell'intorno in cui la molecola si trova; questo si traduce in un'emissione a 430 nm quando la molecola è effettivamente inserita nel monostrato organico, con spostamento a 446 nm quando è solvatata in H₂O.

In un primo esperimento viene accertata la concentrazione di saturazione dei monostrati relativi ai tre nanosistemi sintetizzati per MANT-AMP mantenendosi alle stesse condizioni sperimentali dell'esperimento precedente, in cui la presenza della carica data dalla formazione del complesso TACN-Zn(II) determina un'interazione del probe di natura mista idrofobica ed elettrostatica, come riportato in Fig. 2.24.

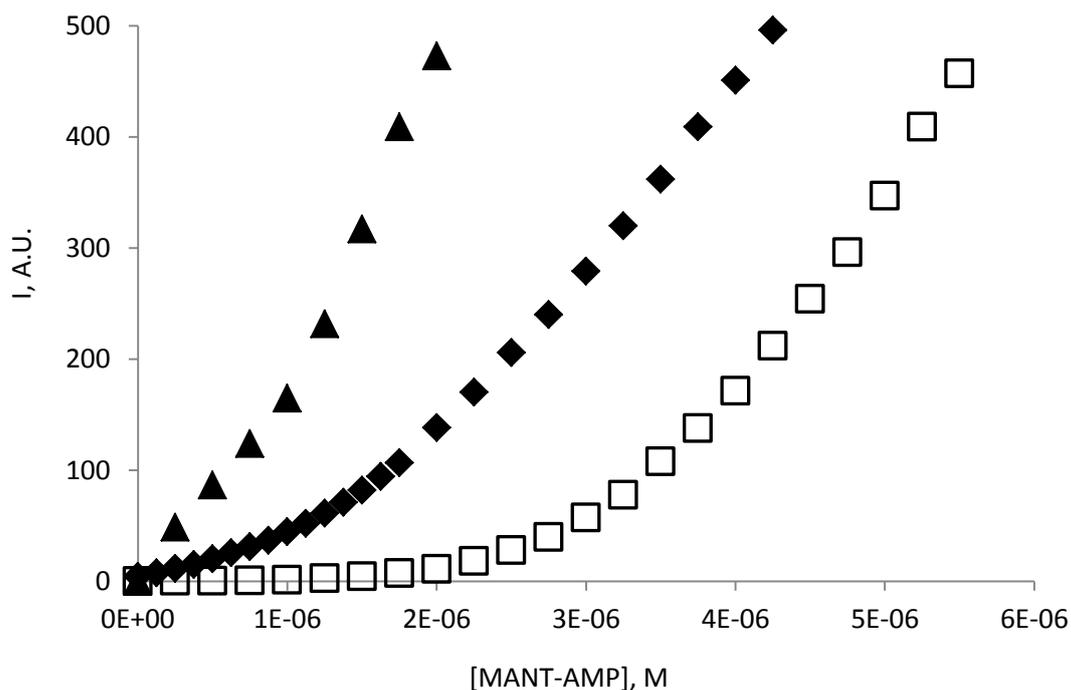


Fig. 2.24: Intensità di fluorescenza osservata al variare della concentrazione di MANT-AMP per Au NPs C6TACN (◆), Au NPs C9TACN (□), Au NPs C12TACN (▲); [TACN-Zn(II)]= 10 μM, [HEPES]= 10 mM, pH 7.0, 25°C, λ_{ex} =305 nm, λ_{em} =370 nm.

Campione	Conc. Sat., μM
Au NPs C6TACN	1.3±0.1
Au NPs C9TACN	3.2±0.3
Au NPs C12TACN	-

Tab. 2.8: Concentrazioni di saturazione calcolate per l'esperienza in Fig. 2.25.

Dalle concentrazioni di saturazione dei tre sistemi emerge come Au NPs C9TACN siano il grado di legare una quantità approssimativamente 3 volte maggiore di probe rispetto a Au NPs C6TACN, suggerendo come non solo lo strato più esterno del monostrato partecipi al legame di questo tipo di probe, ma che sia coinvolta anche la parte più interna del monostrato, in cui interazioni idrofobiche diventano determinanti (vide infra).

Un caso particolare è rappresentato da Au NPs C12TACN, dove l'assenza di quenching della fluorescenza ad ogni concentrazione di probe fluorescente presente in soluzione suggerisce una situazione in cui non vi sia binding del probe alla nanoparticella o, in

alternativa, nonostante l'interazione nanoparticella-probe, non vi sia una soppressione apprezzabile della luminescenza del probe.

Al fine di dimostrare la natura dell'interazione tra Au NPs C12TACN e MANT probe si è deciso di adottare un approccio indiretto, sub-saturando all'80% la superficie del monostrato con fATP e, mediante aggiunte di MANT-ATP, studiare il rilascio in soluzione del primo probe in seguito ad interazione tra MANT-ATP alla nanoparticella.

I risultati dell'esperimento di displacement sono riassunti in Fig. 2.25.

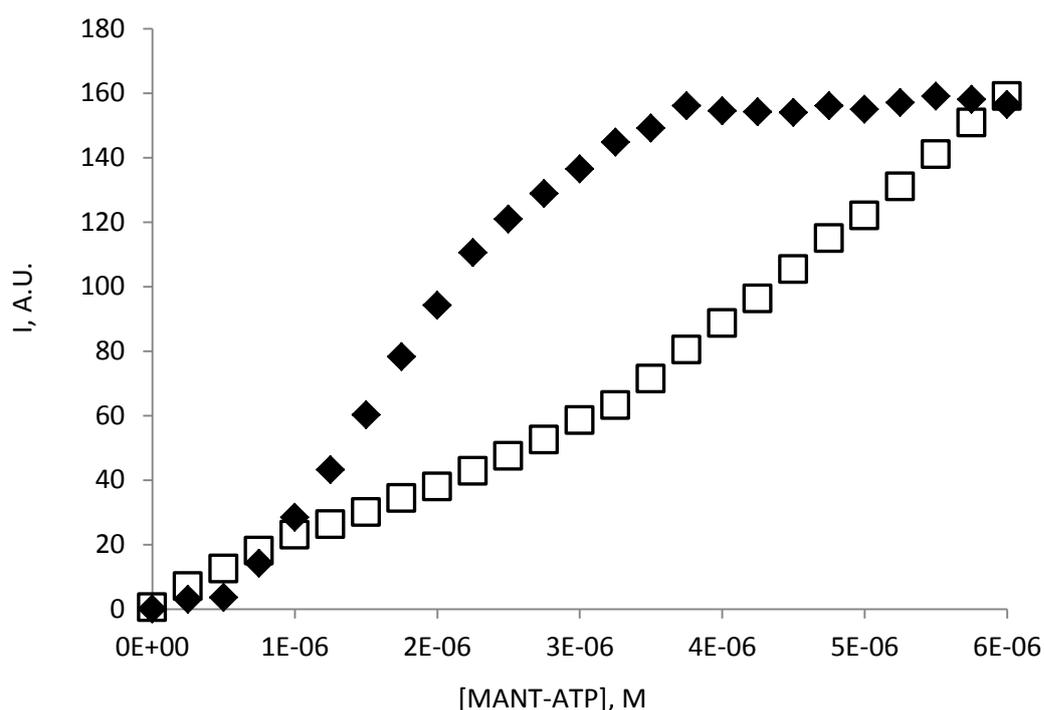


Fig.2.25: Displacement di fATP da Au NPs C12TACN in funzione della concentrazione di MANT-ATP, [TACN-Zn(II)]= 10 μ M, [HEPES]= 10 mM, pH 7.0, seguendo l'emissione di fATP (\blacklozenge), λ_{ex} =305 nm, λ_{em} =370 nm) e l'emissione di massimo di MANT-ATP (\square , λ_{ex} =305 nm, λ_{em} =max).

Come è evidenziato dall'andamento sigmoidale dei dati relativi all'emissione di fATP, le prime aggiunte di MANT-ATP saturano completamente i siti del monostrato non occupati da fATP, conseguenti alla concentrazione sub-saturante di probe fATP utilizzata. A concentrazioni micromolari immediatamente successive si osserva un rilascio netto di fATP in soluzione, dovuto a spiazzamento di fATP da parte di MANT-ATP. Il displacement di fATP dal monostrato è quantitativo al di sopra di 3.75 μ M di MANT-ATP in soluzione. Questo risultato illustra come effettivamente MANT-ATP interagisca con la nanoparticella provocando displacement quantitativo già nel range del basso

micromolare, ma la soppressione della fluorescenza non ha luogo in maniera apprezzabile. Ad ulteriore conferma di questa evidenza sperimentale, l'emissione di massimo di MANT-ATP subisce uno shift nell'intervallo di concentrazione considerato (Fig. 2.26).

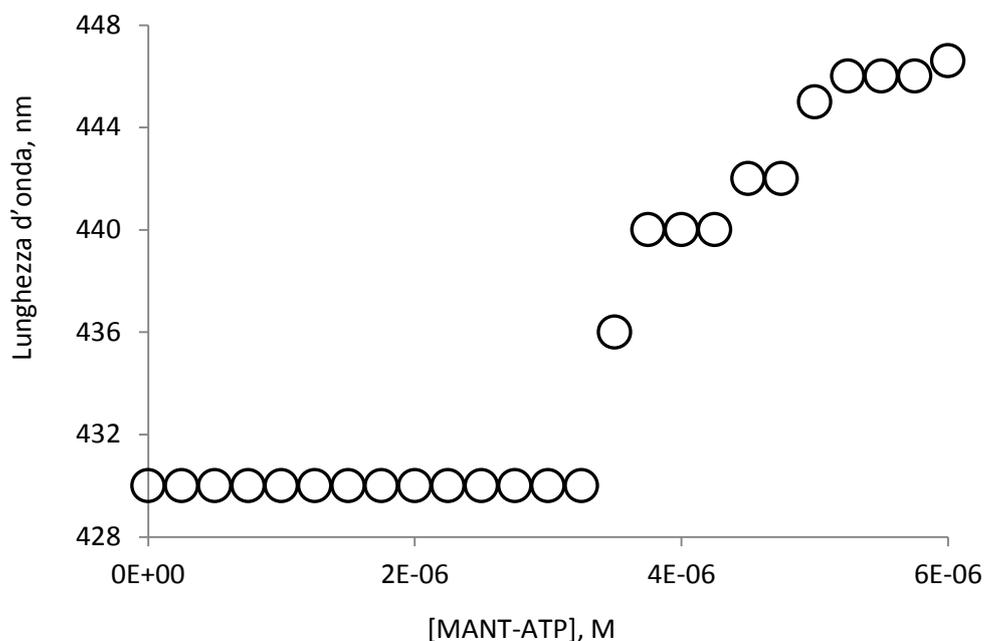


Fig. 2.26: Spostamento della lunghezza d'onda di massima emissione relativa al probe MANT-ATP in seguito ad aggiunte di MANT-ATP a Au NPs C12TACN.

Come già ricordato, lo spostamento della lunghezza d'onda di massimo di 16 nm è un fenomeno caratteristico per i probe basati sul fluoroforo MANT, determinato dall'intorno della molecola. Tale shift testimonia come effettivamente MANT-ATP sia in grado di interagire con il monostrato fino a una concentrazione di circa 3.0 μM , restando invece in soluzione per aggiunte successive (Fig. 2.26). Non essendo la valutazione indiretta della concentrazione di saturazione sufficientemente accurata si è preferito trascurare Au NPs C12TACN da ulteriori studi di binding di probe fluorescenti della serie MANT.

Al fine di accertare il solo contributo idrofobico sul binding di MANT-AMP a Au NPs C6TACN e Au NPs C9TACN si è scelto di forzare ulteriormente le condizioni sperimentali al fine di escludere quanto possibile il contributo elettrostatico, lavorando in assenza di

Zn(II) e a pH 8.0 per mantenere le ammine del TACN deprotonate. Con tale accorgimento si mira a neutralizzare la carica del monostrato.

I campioni considerati vengono titolati con MANT-AMP (Fig. 2.27) ed i risultati della titolazione sono riportati in Tab. 2.9.

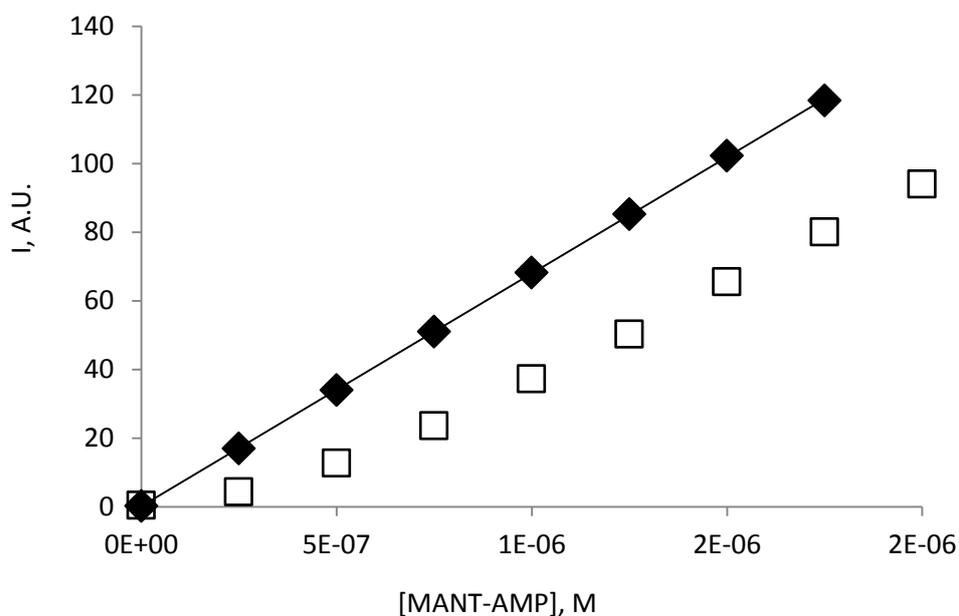


Fig. 2.27: Intensità di fluorescenza osservata al variare della concentrazione di MANT-AMP per Au NPs C6TACN (◆) e Au NPs C9TACN (□); [TACN]= 10 μM, [HEPES]=10 mM, pH= 8.0 , 25 °C, λ_{ex} =305 nm, λ_{em} =446 nm.

Campione	Conc. Sat. (μM)
Au NPs C6TACN	0
Au NPs C9TACN	0.5

Tab. 2.9: Valori di concentrazione di saturazione dei sistemi considerati ottenuti dall'esperimento in Fig. 2.28.

Mentre Au NPs C9TACN mantiene caratteristiche di binding apprezzabili nei confronti di MANT-AMP, attribuibile alla componente idrofobica del monostrato, la situazione è diversa per Au NPs C6TACN. Nel secondo caso l'emissione è infatti direttamente proporzionale alla quantità di probe fluorescente in soluzione per ogni valore di

concentrazione di MANT-AMP, mostrando assenza di binding. Purtroppo in entrambi i casi non è stato possibile osservare uno shift delle lunghezze d'onda d'emissione del fluoroforo da 430 a 446 nm, in quanto il quenching poco marcato per Au NPs C9TACN determina un contributo all'emissione maggiore per il probe in soluzione, risultando in entrambi i casi in una marcata emissione a 446 nm.

2.8 CONCLUSIONI

I risultati degli esperimenti presentati nella sezione precedente hanno permesso di razionalizzare il ruolo dell'architettura del monostrato nella catalisi e nel binding di molecole organiche al monostrato stesso. Nello specifico si è osservato come la variazione di pochi atomi di carbonio nella catena alchilica della molecola influenzi tangibilmente le caratteristiche del nanosistema, agendo in due modi. In primo luogo vi è un contributo alle caratteristiche del sistema dovuto alla distanza del centro catalitico dalla superficie d'oro, che, come evidenziato anche in lavori di letteratura riguardanti sistemi passivanti da monostrati di diversa natura^[10], non influenza solamente lo spessore del monostrato, ma anche la distanza reciproca tra gli headgroup e la motilità del tiolo stesso. In secondo luogo la natura del tiolo determina l'architettura del monostrato, come dimostrato dall'esempio di Au NPs C6TACN, in cui la natura del building block determina la possibilità di ottenere un monostrato più denso in cui il singolo tiolo occupa un footprint inferiore rispetto ai tioli di lunghezza maggiore.

Il concerto di questi fattori determina effetti sulla capacità di interazione con altre molecole che caratterizza la nanoparticella stessa. Si è dimostrato come l'interazione elettrostatica con il monostrato non venga influenzata dallo spessore o densità di monostrato, traducendosi in una stechiometria tra TACN e probe fATP uguale nei tre casi presentati. La differenza in termini di interazione nanoparticella-molecola diventa più rilevante quando si considera la componente idrofobica del binding; in questo senso la spessore della porzione alchilica del monostrato determina un contributo al legame di probe basati sul fluoroforo MANT, senza però poter concludere in maniera univoca se questo effetto sia dovuto alla lunghezza del tiolo o alla densità del monostrato.

Razionalizzare in maniera univoca i dati ottenuti dalla catalisi risente dello stesso problema: mentre i dati ottenuti per Au NPs C9TACN e C12TACN riflettono una situazione catalitica molto simile (che è paragonabile con quella precedentemente ottenuta per il sistema analogo utilizzato nello sviluppo del saggio per proteasi, in cui il tiolo utilizzato era più lungo^[1]), Au NPs C6TACN presenta un valore di K_M insolitamente alto, mantenendo costante il valore di k_{cat} . È evidente come questo risultato rifletta un impedimento da parte del monostrato caratterizzato da uno spessore minore nel legare il substrato, anche se in questo caso non si può concludere in che misura ciò dipenda dall'impaccamento del monostrato (come provato da termogravimetria) o, invece, sia una conseguenza dello spessore della parte idrofobica del monostrato.

2.9 SVILUPPI FUTURI

Prendendo in considerazione i risultati ottenuti da questo progetto è possibile supporre sistemi catalitici innovativi che tengano conto dell'influenza del monostrato al di fuori dell'effetto mediato dagli headgroups, studiando la fattibilità di controllare la stabilizzazione del substrato catalitico modulando l'architettura fine del monostrato.

È noto in letteratura come sia possibile preparare monostrati eterogenei utilizzando tioli di diversa natura in proporzioni arbitrarie al fine di garantire specifiche caratteristiche alla nanoparticella. Tale principio può essere applicato anche nell'evoluzione del sistema catalitico presentato nello sviluppo di questa tesi: invece di utilizzare un monostrato omogeneo composto unicamente da ripetute istanze della stessa molecola cataliticamente attiva, è possibile formare un monostrato che preveda una discreta proporzione di un tiolo attivo a catena alchilica corta e un tiolo inattivo di lunghezza maggiore caratterizzato da una porzione idrofobica. Tale accorgimento, come ricordato nella parte introduttiva, è già stato presentato in un altro contesto da Pfaltz et al.^[11] e permetterebbe di creare siti catalitici topologicamente diversi da quelli esposti in superficie presentati in questa tesi (come presentato in Fig. 2.28, a sinistra), inserendo i complessi di TACN-Zn(II) in tasche idrofobiche all'interno della superficie del monostrato.

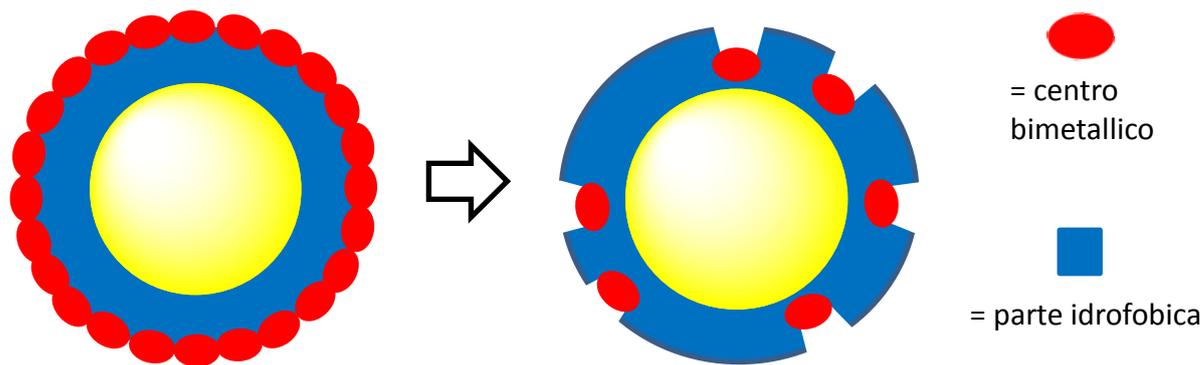


Fig. 2.28: Confronto tra il modello di monostrato utilizzato in questo studio (a sinistra) e quello ipotizzato per uno sviluppo futuro (a destra) .

Nonostante la quantità netta di tiolo catalitico all'interno del monostrato (e di siti bimetallici, ipotizzando come già osservato per sistemi affini, una distribuzione random dei tioli all'interno del monostrato^[8a]) verrebbe ad essere inferiore, la possibilità di stabilizzazione del substrato potrebbe migliorare il profilo catalitico del sistema.

2.10 PARTE SPERIMENTALE

2.10.1. Materiali

Reagenti e solventi

I reagenti disponibili in commercio (Sigma-Aldrich, Fluka) e solventi commercialmente disponibili (Fluka) sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione dove non diversamente specificato.

Per la registrazione degli spettri NMR sono stati impiegati solventi deuterati reperibili in commercio.

I tamponi utilizzati negli esperimenti cinetici, spettrofotometrici e di fluorescenza sono prodotti commerciali e non sono stati sottoposti ad ulteriore purificazione: HEPES (Acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-2-etansolfonico), $pK_a=7.2$; MES (Acido 2-(N-morfolino)etansolfonico), $pK_a= 6.1$.

L'acqua utilizzata per la preparazione dei tamponi, soluzioni acquose, cromatografia ad esclusione dimensionale è prodotta da un impianto MilliQ (Millipore) modello A10.

Materiale per cromatografia

Nelle purificazioni mediante cromatografia su colonna è stato utilizzato gel di silice Macherey-Nagel 60 con granulometria 230-400 mesh. Le cromatografie su strato sottile (TLC) sono state realizzate con lastre Macherey-Nagel 40x80 nm poligram SIL G/UV₂₅₄. Cromatografia per esclusione dimensionale è stata effettuata utilizzando resine Sephadex G-25 (eluente: H₂O mQ) e Sephadex LH-20 (eluente: metanolo).

2.10.2 Strumentazione

Spettri NMR

La registrazione degli spettri NMR è stata effettuata utilizzando lo spettrometro Bruker Avance 300 MHz (¹H: 300.13 MHz) e Bruker 500 MHz. Gli spettri ¹H NMR, ¹³C 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: CDCl₃: 7.26 ppm, D₂O: 4.68 ppm, MeOD 3.34 ppm).

Le costanti di accoppiamento (J) quando citate sono espresse in Hertz.

La molteplicità dei segnali è stata riportata con le seguenti abbreviazioni:

s: singoletto, br: banda allargata, d: doppietto, t: tripletto, q: quartetto, m: multipletto, dd: doppietto di doppietti

Spettri NMR con gradiente di campo

Si è utilizzato lo strumento NMR Bruker Avance 300 (¹H: 300.13 MHz) per la registrazione degli spettri con gradiente di campo, imponendo un gradiente di campo mediante il pulse program: 1edbgp2s1d.^[1]

Analisi NMR con metodo dello standard interno

Per la registrazione degli spettri con standard interno si è utilizzato uno strumento NMR Bruker 500 MHz (^1H : 500 MHz) al fine di aver maggior sensibilità nella misura. Come standard interno si è usato nitrometano anidro, utilizzato senza ulteriori purificazioni.

Spettri di massa

Gli spettri ESI-MS sono stati registrati con uno strumento LC/MS Agilent serie 1100 che opera in condizione di infusione in flusso del campione. Il sistema di ionizzazione è di tipo elettrospray (ESI) dotato di analizzatore di massa a trappola ionica. Per la rilevazione degli spettri di massa presentati in questa tesi si è utilizzato come eluente ACN/HCOOH 0.1%.

Spettrofotometria UV/Vis

Le titolazioni a concentrazioni variabili di Zn(II) in presenza di HPNP, gli scan UV-Vis dei campioni di Au NPs e le cinetiche di Michaelis-Menten sono state effettuate con uno spettrofotometro Varian Cary 50, dotato di portacelle termostate a circolazione d'acqua.

Le titolazioni dirette con Cu(II) sono state effettuate con uno spettrofotometro Varian Cary 100 a doppio raggio.

In tutti gli esperimenti sono usate celle di quarzo HELMA a volume ridotto (1 mL) con un cammino ottico di 10 mm.

Spettrofluorimetria

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofotometro Varian Cary Eclipse Fluorescence, dotato di portacelle termostate a circolazione d'acqua.

In tutti gli esperimenti di fluorescenza sono state usate celle da fluorescenza in quarzo HELMA (3 mL).

Le titolazioni di fluorescenza con probe fATP sono state effettuate impostando le slits di eccitazione ed emissione a 5 nm / 5nm. Le titolazioni con probe dotati di fluoroforo

MANT sono state effettuate imponendo le slits di eccitazione ed emissione a 10 nm / 5 nm.

Analisi TEM

Le immagini TEM sono state registrate con un microscopio elettronico a trasmissione Jeol 300 PXTEM in dotazione al Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

Analisi DLS

Le misure DLS sono state effettuate utilizzando uno strumento Malvern Zetasizer NanoSeries, utilizzando cuvette usa e getta in PMMA.

Analisi termogravimetrica

Per condurre le analisi termogravimetriche è stato utilizzato uno strumento TA Instruments TGA Q5000 IR, utilizzando pan in platino HT.

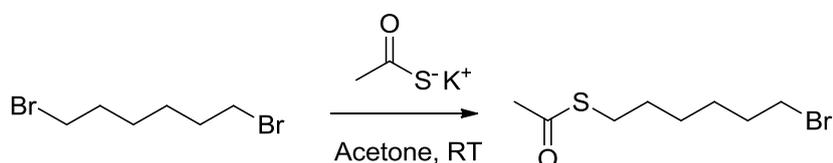
Misura del pH

Il pH delle soluzioni tampone preparate è stato misurato con un pHmetro Metrohm-605 che ha come elettrodo di riferimento Ag/AgCl/KCl.

2.10.3 Procedure di sintesi

Sintesi dei leganti

1. Sintesi di 6-bromoetil-etantioato (**A**)



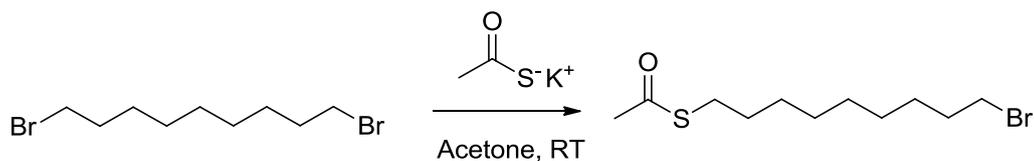
1,6-dibromoesano (4.78 g, 19.6 mmoli, 1 eq.) viene sciolto in 50 mL di acetone. Si aggiunge alla soluzione potassio tioacetato (2.23 g, 19.6 mmoli, 1 eq.). La miscela viene tenuta sott'agitazione e sotto flusso di azoto overnight a RT. Si verifica mediante TLC (silice, eluente: EP/CH₂Cl₂, 60:40 v/v) che la reazione sia giunta a completezza. La

sospensione risultante viene filtrata per eliminare il KBr formatosi. Dopo evaporazione del solvente si ottiene il crudo di reazione, sotto forma di olio giallo. Il crudo viene purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice, eluente: EP/CH₂Cl₂, 60:40 v/v). Le frazioni contenenti il prodotto desiderato vengono raccolte e portate a secco mediante evaporazione a pressione ridotta del solvente. Si ottengono 2.06 g di prodotto **A** (Resa 44%) come olio giallo.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.40 (t, 2H, CH₂Br), 2.87 (t, 2H, CH₂S-), 2.32 (s, 3H, CH₃-), 1.86 (tt, 2H, CH₂ catena alifatica), 1.59 (tt, 2H, CH₂ catena alifatica), 1.43 (br, 4H, CH₂ catena alifatica)

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 196.16, 34.12, 33.01, 31.06, 29.79, 29.36, 28.30, 28.07

2. Sintesi di 9- bromononil-etantioato (**B**)

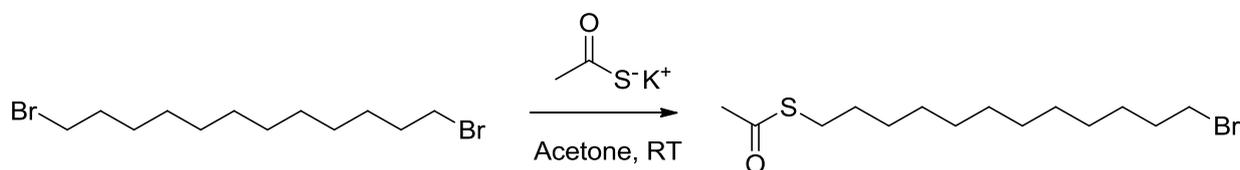


1,9-dibromononano (5.60 g, 19.6 mmoli, 1 eq.) viene sciolto in 50 mL di acetone. Si aggiunge alla soluzione potassio tioacetato (2.23 g, 19.6 mmoli, 1 eq.) La miscela viene tenuta sott'agitazione e sotto flusso di azoto overnight a RT. Viene verificato mediante TLC (silice, eluente: EP/CH₂Cl₂, 60:40 v/v) che la reazione sia giunta a completezza. La sospensione risultante viene filtrata per eliminare KBr formatosi. Dopo evaporazione del solvente si ottiene un olio giallo. Il crudo di reazione viene purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice, eluente: EP/CH₂Cl₂ 60:40 v/v). Le frazioni contenenti il prodotto desiderato vengono riunite e portate a secco mediante evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 2.82 g di prodotto **B** (Resa 50%) come olio giallo.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.40 (t, 2H, CH₂Br), 2.86 (t, 2H, CH₂S), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.85 (tt, 2H, CH₂ catena alifatica), 1.56 (tt, 2H, CH₂ catena alifatica), 1.26 (br, 10H, CH₂ catena alifatica)

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 196.35, 34.38, 33.25, 31.08, 29.93, 29.68, 29.56, 29.41, 29.17, 29.10, 28.56

3. Sintesi di 12-bromododecil-etantioato (C)



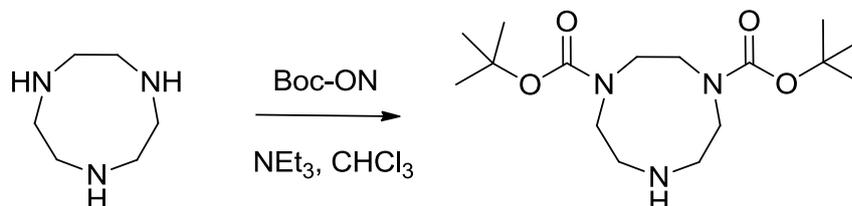
1,12–dibromododecano (6.43 g, 19.6 mmoli, 1 eq.) viene sciolto in 50 mL di acetone. Si aggiunge alla soluzione potassio tioacetato (2.23 g, 19.6 mmoli, 1 eq.). La miscela è tenuta sotto agitazione e sotto flusso di azoto overnight a RT. L'andamento della reazione viene controllato mediante TLC (silice, eluente: EP/CH₂Cl₂, 60:40 v/v). Una volta giunta a completezza, la sospensione viene filtrata e il filtrato portato a secco mediante rotavapor ottenendo il prodotto grezzo. Il grezzo della reazione viene purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice, eluente: EP/ CH₂Cl₂, 60:40 v/v). Le frazioni contenenti il prodotto vengono riunite e il solvente fatto evaporare mediante evaporazione a pressione ridotta.

Si ottengono 2.60 g di prodotto **C** (Resa: 41%) come solido bianco.

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ: 3.38 (t, 2H, CH₂Br), 2.84 (t, 2H, CH₂S), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.84 (tt, 2H, CH₂ catena alifatica), 1.55 (tt, 2H, CH₂ catena alifatica), 1.26 (br, 16H, CH₂ catena alifatica).

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 196.35, 34.30, 33.28, 31.45, 31.11, 31.05, 31.00, 30.25, 29.92, 29.85, 29.54, 29.23, 29.56, 29.19, 28.61

4. Sintesi di 1,4 – Bis(t-butilossicarbonil)-1,4,7-triazaciclononano (**D**)



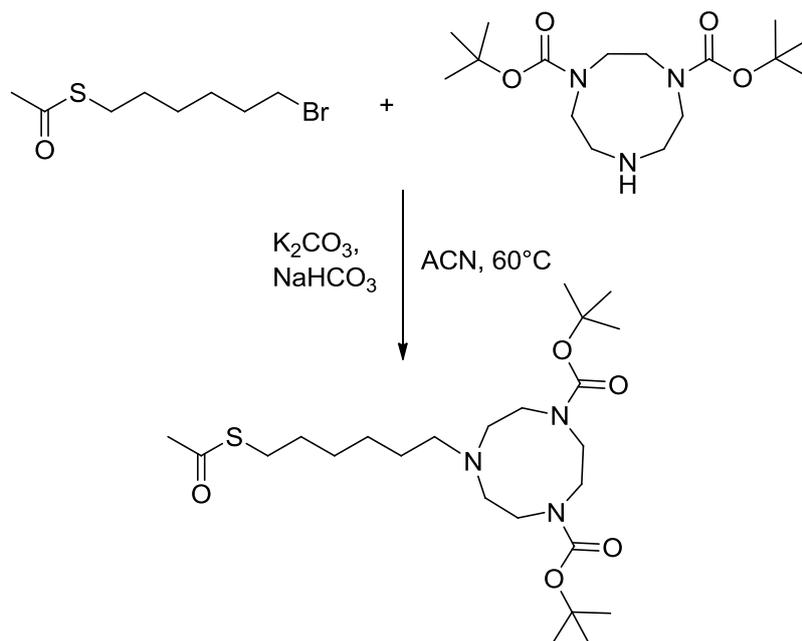
1,4,7-triazaciclononano (1.5 g, 11.6 mmoli, 1 eq.) viene sciolto in 30 mL di CHCl₃ anidro e quindi vengono addizionati 4.8 mL (34.5 mmol, 3 eq.) di Net₃. Boc-ON (5.7 g, 23.2 mmol, 2 eq.) viene disciolto a parte in 20 mL di cloroformio anidro e aggiunto al pallone contenente la soluzione di TACN, sott'agitazione e sotto flusso di azoto, con rate 1 mL/h a RT. Viene controllato mediante TLC (silice, eluente: CHCl₃/MeOH, 30:1 v/v) che la reazione sia giunta a completezza. Si evapora il solvente mediante evaporazione a pressione ridotta, ottenendo un olio giallo paglierino. L'olio ottenuto viene sciolto in EtOAc e vengono eseguiti in successione lavaggi della soluzione organica rispettivamente con una soluzione acquosa di NaHCO₃ al 5% (50 mL x3), soluzione di NaCl satura (50 mLx 2), soluzione di acido citrico al 10% (75 mL x 4). La fase acquosa proveniente dall'ultimo lavaggio viene basificata con NaOH fino ad un pH 10.0. La soluzione diventa torbida, indice di precipitazione del prodotto. Si estrae la soluzione basica per 3 volte con 50 mL di cloroformio. La fase organica infine viene anidrificata con Na₂SO₄ e, previa filtrazione, si ottiene il crudo, che viene purificato per cromatografia flash su silice in eluente CH₂Cl₂:EtOAc (80:20, v/v).

Si ottiene 1,42 g di prodotto puro (Resa 37 %) come olio viscoso di colore giallino.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 3.44(m br, 4H, N*-CH₂-CH₂N*), 3.23 (m br, 4H, N*-CH₂.CH₂N*), 2.91 (br, 4H, CH₂NHCH₂), 1.48 (s, 18H, t-Bu), *=(ammine protette Boc)

ESI-MS (m/z): 330.4 [100%, M⁺] (massa calcolata 329.4)

5. Sintesi di tiolo C6TACN protetto



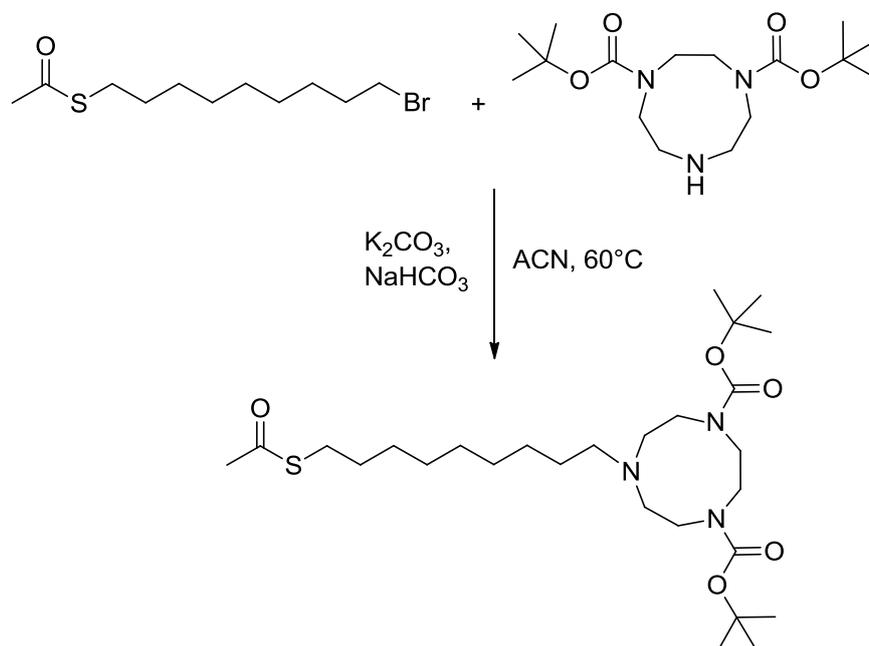
Composto **A** (0.326 g, 1.36 mmoli) e composto **D** (0.362 g, 1.10 mmoli) sono aggiunti ad una sospensione di K_2CO_3 (0.416 g, 3.0 mmol) e $NaHCO_3$ (0.255, 3.0 mmol) in 20 mL di ACN. La miscela è stata lasciata sott'agitazione per 4 ore a $60^\circ C$. La sospensione viene poi filtrata e, previa evaporazione a pressione ridotta del solvente, si ottiene il crudo di reazione. Il crudo di reazione viene purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice, eluente: $CH_2Cl_2/MeOH$, 97:3 v/v) per ottenere 0.194 g di prodotto puro (Resa 36%) come olio trasparente.

1H -NMR (300 MHz, ACN) δ : 3.42 (m br, 4H, *N-CH₂-CH₂-N*), 3.21 (m br, 4 H, 2 x N*-CH₂-CH₂-N'), 2.81 (t, 2H, CH₂Ntriaz), 2.58 (m br, 4H, N'-CH₂CH₂-N*), 2.44 (m br, 2H, CH₂-S), 2.27(s, 3H, CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂- β -Ntriaz), 1.42 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.25 (m br, 6H, CH₂ catena alchilica).

^{13}C -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 196.32, 156.08, 155.97, 155.81, 79.86, 79.78, 57.17, 54.32, 53.99, 50.98, 50.75, 50.52, 50.14, 50.03, 31.06, 31.00, 29.93, 29.47, 29.18, 29.02, 28.94, 28.04, 27.31

ESI-MS (m/z): 488.7 [100%, M^+] (massa calcolata 487.7)

6. Sintesi di tiolo C9TACN protetto



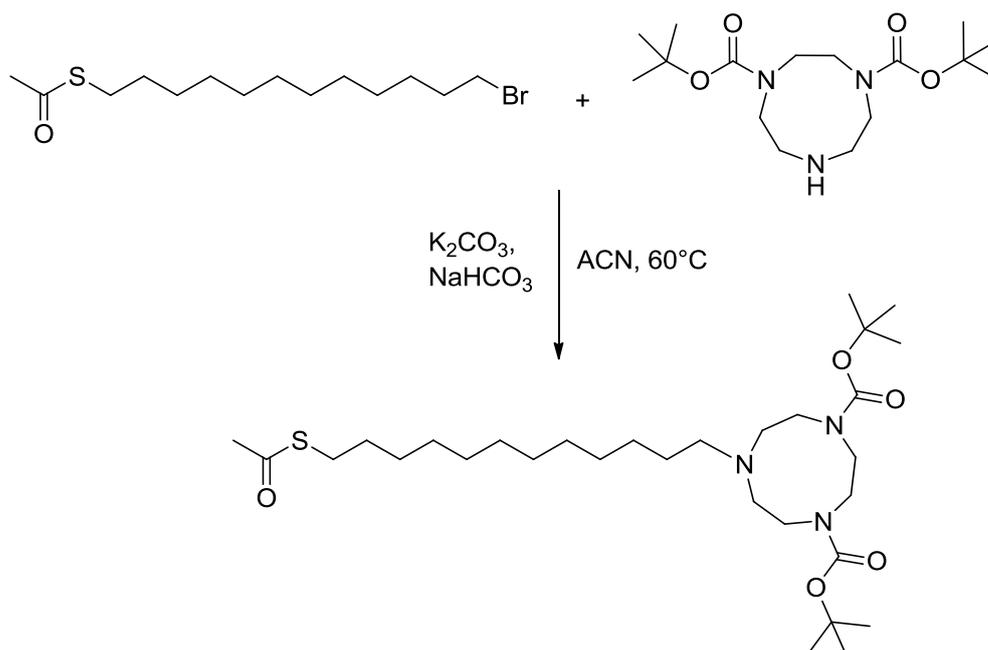
Composto **B** (0.344 g, 1.2 mmol) e composto **D** (0.335 g, 1.0 mmoli) di sono stati aggiunti a una sospensione di K_2CO_3 (0.416 g, 3.0 mmoli) di e di $NaHCO_3$ (0.255 g, 3,03 mmoli) in 20 mL di acetonitrile. La sospensione è stata lasciata sott'agitazione per 4 ore a temperatura $60^\circ C$ ed infine filtrata. Dopo evaporazione del solvente il crudo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice, eluente: $CH_2Cl_2/MeOH$, 97:3 v/v). Sono stati ottenuti 223 mg di prodotto puro (Resa: 41%) come liquido viscoso trasparente.

^1H-NMR (300 MHz, ACN) δ : 3.42 (m br, 4H, *N-CH₂-CH₂-N*), 3.21 (m br, 4 H, 2 x N*-CH₂-CH₂-N'), 2.80 (t, 2H, CH₂Ntriaz), 2.56 (m br, 4H, N'-CH₂CH₂-N*), 2.41 (m br, 2H, CH₂-S), 2.26(s, 3H, CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂- β -Ntriaz), 1.41 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.21 (s br, 12H, CH₂ catena alchilica)

$^{13}C-NMR$ (300 MHz, d-ACN) δ : 196.35, 156.11, 155,97, 155,81, 79.72, 79.68, 7.41, 54.50, 54.09, 50.98, 50.82, 50.63, 50.41, 50.14, 31.06, 31.00, 29.97, 29.87, 29.53, 29.19, 29.01, 28.63, 28.48, 28.33, 27.91, 27.81

ESI-MS (m/z): 530.8 [100%, M^+] (massa calcolata 529.8)

7. Sintesi tiolo C12TACN protetto



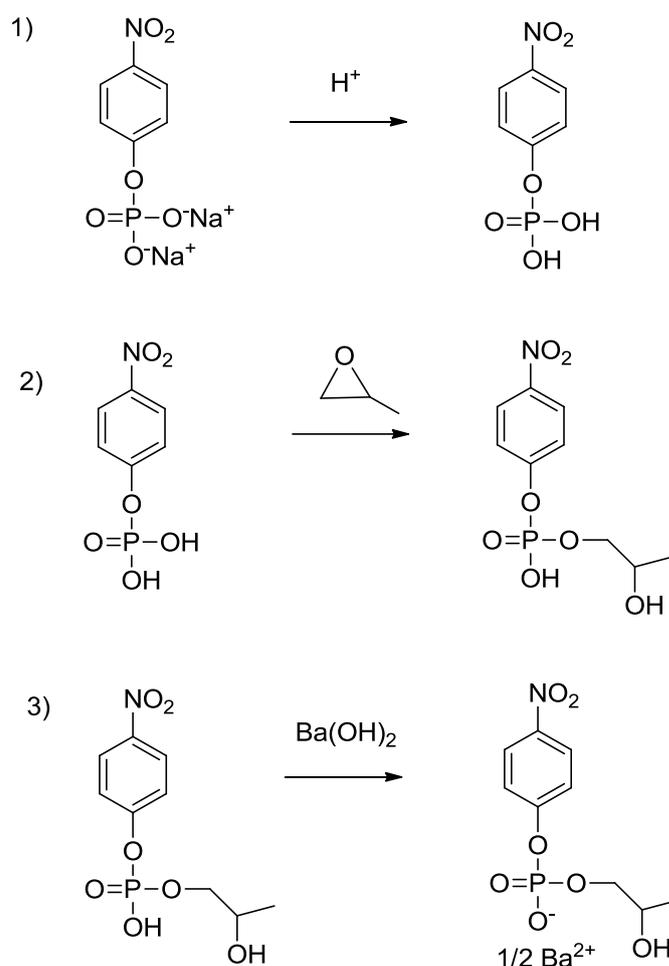
Composto **C** (0.395 g, 1.2 mmol) e composto **D** (0.336 g, 1.0 mmol) sono stati aggiunti ad una sospensione di K_2CO_3 (0.416 mg, 3.0 mmoli) e $NaHCO_3$ (0.255 g, 3.0 mmoli) in acetonitrile (20 mL). La miscela è stata lasciata sott'agitazione per 4 ore a $60^\circ C$. La sospensione è stata poi filtrata ed è stato evaporato il solvente a pressione ridotta. Il crudo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice, $CHCl_2:MeOH$, 94:6 v/v), ottenendo 0.194 g (Resa: 27%) di prodotto puro come olio trasparente.

^1H-NMR (300 MHz, d-ACN) δ : 3.42 (m br, 4H, *N-CH₂-CH₂-N*), 3.22 (m br, 4 H, 2 x N*-CH₂-CH₂-N'), 2.84 (t, 2H, CH₂Ntriaz), 2.59 (m br, 4H, N'-CH₂CH₂-N*), 2.47 (m br, 2H, CH₂-S), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.54 (m, 2H, CH₂- β -Ntriaz), 1.44 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.28 (m br, 18H, CH₂ catena alchilica).

$^{13}C-NMR$ (300 MHz, d-ACN) δ : 196.24, 156.07, 155.92, 155.76, 79.66, 79.42, 57.42, 57.29, 54.51, 54.10, 51.02, 50.81, 50.62, 50.41, 50.12, 31.02, 30.99, 30.03, 29.99, 29.92, 29.86, 29.53, 29.51, 29.20, 28.96, 28.64, 28.51, 28.35, 27.94, 27.85

ESI-MS (m/z): 572.9 [100%, M⁺] (massa calcolata 571.9)

8. Sintesi di p-nitrofenil-2-idrossipropil-fosfato sale di bario (HPNP)



p-nitrofenil-fosfato sodico (3.0 g, 8.0 mmoli) viene solubilizzato in circa 10 mL di H₂O mQ e fatto passare attraverso una colonna impaccata con resina Amberlyst-15 wet (50 g) per scambiare il controcatone Na⁺ con H⁺. L'eluato viene raccolto in un pallone e portato a pH 8.0 con una soluzione di NH₃ concentrata. Alla miscela così ottenuta viene aggiunto un largo eccesso di ossido di propilene (36 mL, 500 mmoli) e la reazione viene agitata per 3 giorni a refluxo, termostata a 30°C. La soluzione viene concentrata al rotavapor (T < 45°) per eliminare l'ossido di propilene non reagito e il solvente, fino ad ottenere un residuo gelatinoso giallo. Quest'ultimo viene sciolto in 15 mL di H₂O mQ e fatto eluire una seconda volta attraverso resina Amberlyst-15 wet, preventivamente rigenerata con HCl 6 M in acqua mQ. L'eluato acido viene portato a pH 6.8 con una soluzione satura di Ba(OH)₂ e concentrato mediante evaporazione a pressione ridotta (T < 45°) fino ad ottenere un volume di circa 10 mL. Aggiungendo 2 volumi di etanolo si assiste alla precipitazione di un solido giallino. La miscela viene quindi filtrata su carta per isolare il

p-nitrofenilfosfato non reagito, ed il filtrato (incolore o leggermente giallo) viene aggiunto a 300 mL di una miscela acetone/EtOH in rapporto 9:1 (v/v), mantenuta sotto vigorosa agitazione. Si osserva la formazione di una sospensione bianca, la quale viene lasciata decantare in frigo per alcuni giorni. Si filtra su imbuto *gooch*, ottenendo 1.2 g di fine polvere bianca per una resa del 44%. Il prodotto così ottenuto viene sciolto in 2 mL di acqua mQ e cristallizzato nuovamente da miscela di acetone/EtOH). Si ottengono infine 0.35 g di solido bianco per una resa totale del 13%.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ : 8.22 (d, 2H, -CHCNO₂), 7.29(d, 2H, CHCO), 3.89 (m br, 2H, CH₂-OP), 3.78 (m br, 2H, CH-OH + CH), 1.11 (d, 3H, CH₃)

³¹P-NMR (300MHz, D₂O) δ : -7.52, (t, 1P), -8.22 (d, 1P)

All'analisi ¹H-NMR, approfondita con ³¹P-NMR emerge la presenza due diverse specie, seppure quella presente in quantità inferiore rappresenti meno del 5% del totale. Da ³¹P-NMR si può osservare come, mentre la specie maggioritaria presenti il caratteristico tripletto (accoppiamento coi protoni metilenici), il secondo picco sia un doppietto, permettendo di concludere come la specie in difetto sia l'isomero di HPNP caratterizzato dal metile in posizione α all'ossigeno del gruppo fosfato.

Sintesi delle nanoparticelle d'oro

Tutta la vetreria utilizzata nella sintesi delle nanoparticelle d'oro viene lavata accuratamente con Acqua Regia (3:1 HCl/HNO₃), risciacquata abbondantemente con acqua distillata, acetone e asciugata.

150 mg di acido tetracloroaurico triidrato (HAuCl₄·3H₂O, 0.28 mmol), opportunamente pesato in glove-box, viene sciolto in 2 mL di acqua mQ ed estratto ripetutamente con porzioni di 30 mL di una soluzione degasata di 8.1 g TOABr sciolto in 375 mL di toluene HPLC grade. Si osserva netta decolorazione della soluzione acquosa (gialla) e rapida colorazione rossa della soluzione organica, dovuta al passaggio dell'oro in toluene mediato dal trasferitore di fase.

Le frazioni di soluzione organica vengono riunite senza ulteriore trattamento in un pallone da 500 mL e posta sotto vigorosa agitazione. Si aggiungono rapidamente alla soluzione organica 6.3 mL di diottilammina (20 mmol): dopo pochi minuti si assiste a una leggera decolorazione della soluzione, che risulta essere completa dopo 30 min.

La quantità di diottilammina utilizzata, nel duplice ruolo di agente riducente ed agente di capping, è la principale responsabile delle dimensioni delle nanoparticelle, come si può osservare da Fig. 2.29.

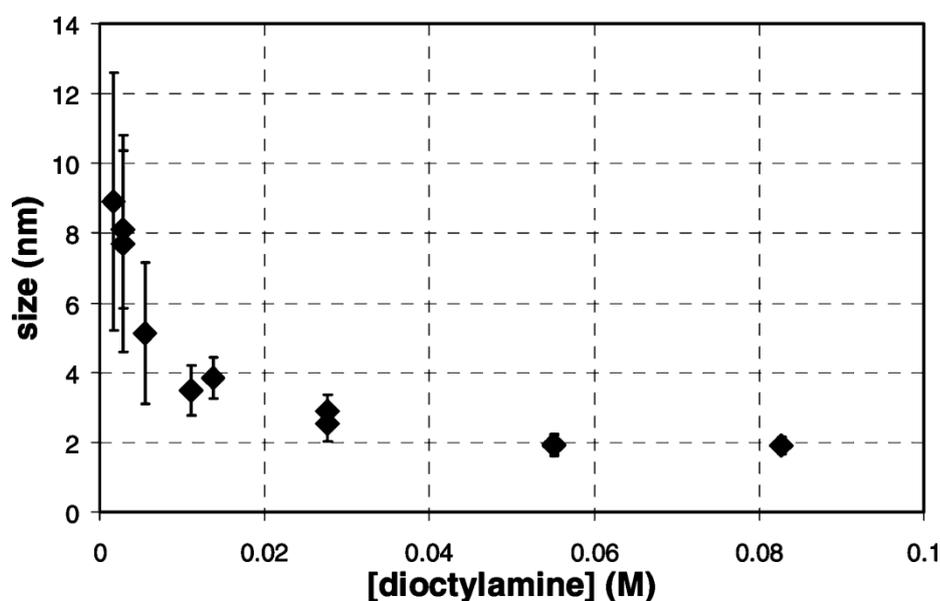


Fig. 2.29: Dimensioni ottenute tramite sintesi proposta da Scrimin et al. rispetto alla quantità di diottilammina utilizzata.

Sotto intensa agitazione alla soluzione organica vengono addizionati 149.0 mg di NaBH₃ sciolti in 1 mL di acqua mQ. La soluzione organica subisce un cambiamento di colore, passando da trasparente a nera in pochi secondi, dovuto alla immediata nucleazione dell'oro metallico, il cui accrescimento è rapidamente bloccato dall'eccesso di diottilammina aggiunto.

Prima della passivazione con i tioli l'eccesso di NaBH₃ rimasto nella soluzione acquosa viene eliminato dalla soluzione organica mediante imbuto separatore.

La soluzione, passivata in maniera metastabile per interazione con le ammine di DOA, rimane stabile per un breve tempo e deve essere passivata stabilmente prima delle 24 ore.

Deprotezione dei tioli e passivazione dei nanoclusters

Prima di procedere con la funzionalizzazione dei nuclei d'oro è necessario disporre di tioli in forma deprotetta, rimuovendo in un unico processo di deprotezione sia l'acetile sull'atomo di zolfo che i gruppi N-Boc. Questo viene realizzato semplicemente prelevando la quantità opportuna di ciascun tiolo e aggiungendola a una soluzione di HCl 6 M (2 mL) in metanolo (2 mL). La miscela viene mantenuta sott'agitazione a 80°C per 3 ore. Infine, il solvente viene fatto evaporare per evaporazione a pressione ridotta ottenendo i prodotti in resa quantitativa (confermato per TLC, ¹H-NMR), senza bisogno di ulteriori purificazioni.

L'analisi ¹H-NMR dei prodotti ottenuti è riportata come segue:

C6TACN : ¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) δ: 3.47 (s, 4H, *N-CH₂CH₂-N*), 3.38 (m, 4H, 2 x N*-CH₂-CH₂-N'), 3.28 (m, 4H, N'-CH₂CH₂-N*), 3.02 (m, 2H, CH₂S), 2.59 (t, 2 H, CH₂Ntriaz), 1.65 (m, 4H, CH₂-β-S + CH₂-β-Ntriaz), 1.42 (m br, 4 H, CH₂ catena alchilica)

C9TACN : ¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) δ: 3.46 (s, 4H, *N-CH₂CH₂-N*), 3.40 (m, 4H, 2 x N*-CH₂-CH₂-N'), 3.35 (m, 4H, N'-CH₂CH₂-N*), 3.03 (m, 2H, CH₂Ntriaz), 2.56 (t, 2H, CH₂S), 1.64 (m, 4H, CH₂-β-S + CH₂-β-Ntriaz), 1.33 (m br, 10 H, CH₂ catena alifatica)

C12TACN : ¹H-NMR (MeOD, 300 MHz) δ: 3.51 (s, 4H, *N-CH₂CH₂-N*), 3.26 (m, 4H, N*-CH₂-CH₂-N'+MeOH residuo), 3.05 (m, 4H, N'-CH₂CH₂-N*), 2.81 (m, 2H, CH₂Ntriaz), 2.44 (t, 2 H, CH₂S), 1.54 (m, 4H, CH₂.β-S + CH₂.β-Ntriaz), 1.22 (s br, 16 H, CH₂ catena alifatica)

I tre batch di nanoparticelle funzionalizzate rispettivamente con il tiolo C6TACN, tiolo C9TACN e tiolo C12TACN vengono ottenuti partendo da un unico batch di colloid d'oro e suddividendolo in 3 parti uguali. Questo garantirà l'uguaglianza di distribuzione dimensionale dei nuclei d'oro nei tre batch di nanoparticelle. Le quantità di tiolo da aggiungere vengono calcolate in base alla formula seguente, ottenuta sperimentalmente (Au₂₁₄RSH₉₂) e riportata in letteratura:

$$\text{mmoli tiolo} = [(\text{mmoli oro} * 92/214) * 2]$$

Questo calcolo è basato sulla formula minima teorica di una nanoparticella d'oro di diametro 2.0 nm ricoperta da un monostrato di tioli, ritenuta essere una buona approssimazione dei nostri sistemi. Il tiolo viene aggiunto in un eccesso di 2 volte per evitare una incompleta funzionalizzazione delle nanoparticelle. Il processo di passivazione consiste nell'aggiunta della quantità calcolata di tiolo deproteetto (disciolto in 2 mL di H₂O mQ nei casi dei tioli C6TACN e C9TACN, 2 mL di MeOH per tiolo C12TACN) alla soluzione di toluene contenente nanoparticelle d'oro funzionalizzate con la diottilammina.

- C6TACN protetto (0.12 mmol): 58.4 mg
- C9TACN protetto (0.12 mmol): 63.5 mg
- C12TACN protetto (0.12 mmol): 69 mg

La soluzione viene tenuta sott'agitazione per tutta la notte a RT.

Si osserva la formazione di un precipitato nero, accompagnata da una progressiva decolorazione della fase organica. Successivamente vengono aggiunti 10 mL di acqua (sotto vigorosa agitazione). La miscela viene mantenuta sott'agitazione per 1 hr. Durante questo intervallo di tempo le nanoparticelle ricoperte da un monostrato di tioli migrano

nella fase acquosa. A questo punto le due fasi vengono separate e si procede alla purificazione mediante lavaggi sequenziali della fase acquosa:

- 2 x 30 mL toluene
- 5 x 30 mL etile acetato
- 3 x 30 mL etere etilico

Il prodotto viene infine purificato mediante colonna cromatografica ad esclusione dimensionale Sephadex G-25, eluente H₂O mQ e colonna cromatografica ad esclusione dimensionale Sephadex LH-20, eluente MeOH. Si evapora il solvente all'evaporatore rotante, facendo attenzione a non portare completamente a secchezza le nanoparticelle, in quanto l'eliminazione completa dell'acqua di solvatazione potrebbe rendere più difficoltosa una loro ridissoluzione in acqua. Tutti i campioni di nanoparticelle si sono dimostrati ben solubili in acqua, nonostante Au NPs C12TACN abbiano richiesto l'impiego di MeOH come cosolvente, poi evaporato selettivamente all'evaporatore rotante.

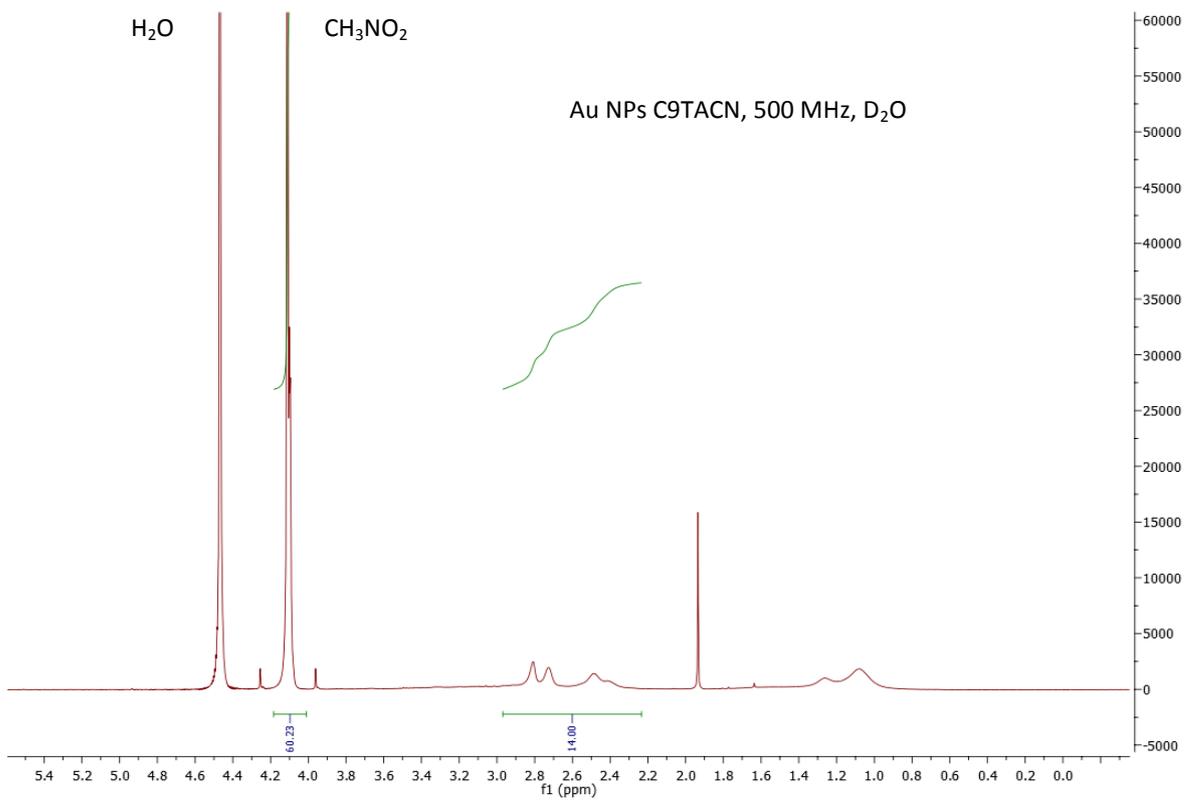
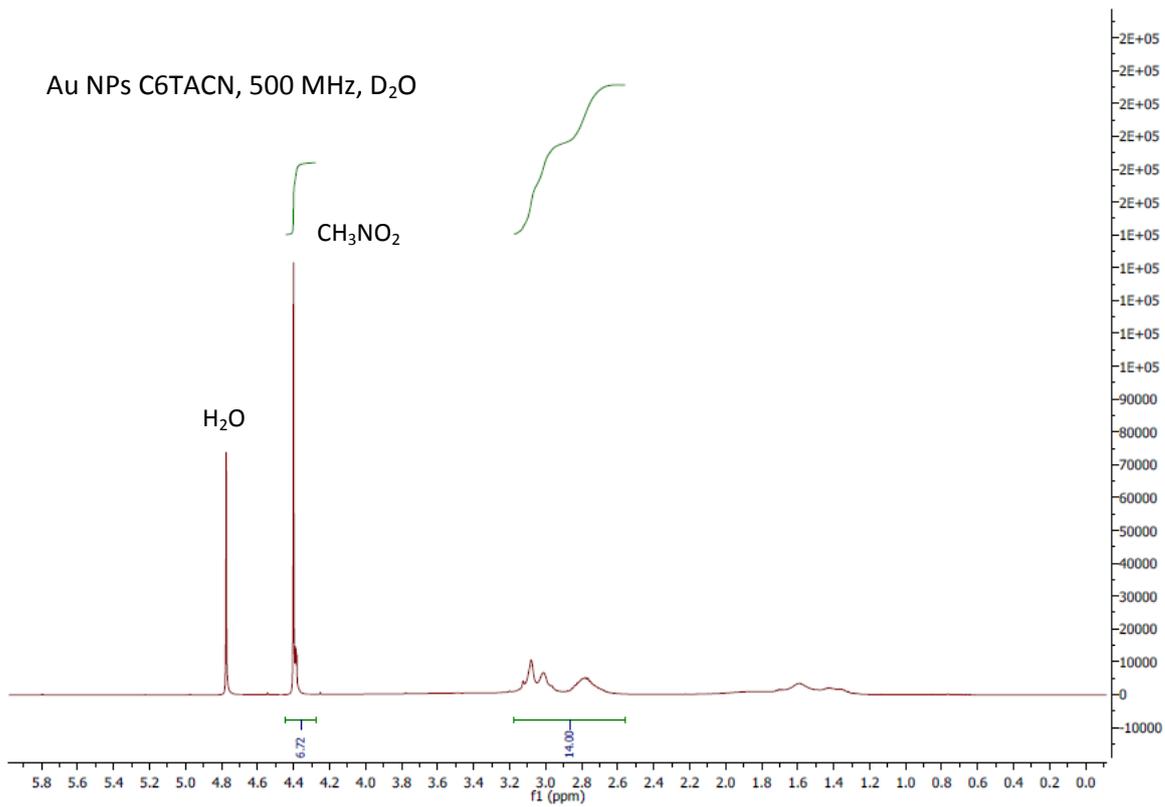
2.10.4 Metodi

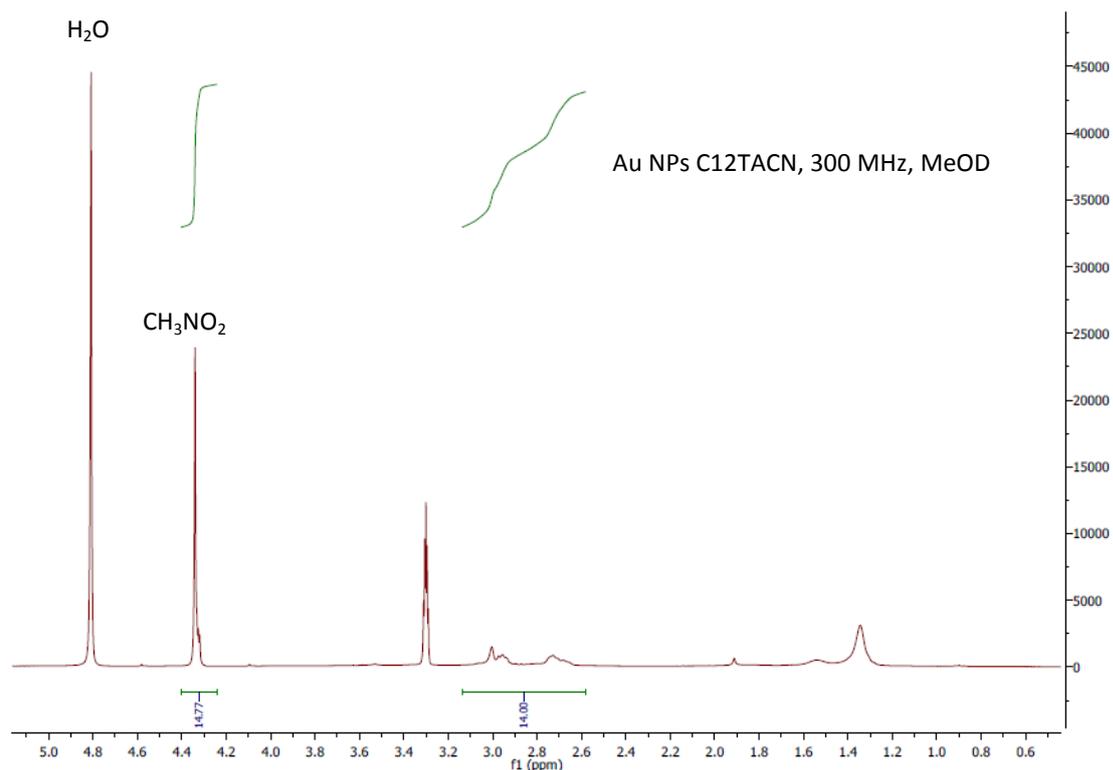
1. Determinazione della concentrazione di Au NPs tramite ¹H-NMR

La concentrazione di un campione di nanoparticelle viene espressa per convenzione come [TACN].

Sono state valutate le concentrazioni delle soluzioni madri mediante analisi ¹H-NMR in presenza di standard interno nitrometano. I valori sono risultati in accordo con quelli ottenuti mediante titolazione con Zn(II) e le titolazioni dirette con Cu(II) per tutti e tre i campioni.

La determinazione delle concentrazioni con NMR sfrutta la possibilità di integrare il segnale generato da una quantità nota di nitrometano ($\delta=4.5$ ppm, 3H) contro il segnale del TACN+CH₂ in α all'ammina del macrociclo ($\delta=3.1-2.5$ ppm, 14H) di una diluizione nota delle soluzioni stock di Au NPs in solvente deuterato opportuno (D₂O per Au NPs C6TACN e Au NPs C9TACN, MeOD per Au NPs C12TACN).





I valori delle concentrazioni calcolati per analisi $^1\text{H-NMR}$ con standard interno sono stati i seguenti:

Campione	$[\text{TACN}]_{\text{stock}}$
AuNPs C6TACN	$7.1 \times 10^{-2} \text{ M}$
AuNPs C9TACN	$1.6 \times 10^{-2} \text{ M}$
AuNPs C12TACN	$3.9 \times 10^{-2} \text{ M}$

Tab. 2.10: Concentrazioni ottenute da analisi $^1\text{H-NMR}$ per le stock solution preparate.

Come substrato per gli studi cinetici è stato utilizzato HPNPP sintetizzato nel nostro laboratorio. Si ottiene il prodotto sotto forma di sale di bario, con un peso molecolare di 344.84 g/mol. Le soluzioni madre sono state preparate con acqua mQ per pesata.

2. Condizioni per gli esperimenti cinetici realizzati con HPNP

In tutti gli esperimenti basati sull'idrolisi di HPNP, il rilascio di p-nitrofenato in soluzione viene seguito spettrofotometricamente, misurando l'assorbanza a 400 nm. L'aumento dell'assorbanza nel tempo è dovuto al rilascio e conseguente accumulo del prodotto di reazione p-nitrofenato. Le cinetiche vengono seguite per circa 3 ore a una temperatura di 40°C. I dati vengono raccolti ad intervalli regolari di tempo della durata di 30 secondi ciascuno. Le soluzioni analizzate sono state realizzate aggiungendo nelle cuvette dei volumi opportuni di soluzione di substrato, di catalizzatore e soluzione tampone.

Si utilizzano soluzioni tamponate da HEPES a pH 7.0 per le cinetiche a concentrazione variabile di Zn(II). Per le cinetiche a concentrazione variabile di substrato invece è stato utilizzato come tampone HEPES a pH 7.5. Per il calcolo delle velocità iniziali delle cinetiche si sono utilizzati come riferimento i valori di ϵ del p-nitrofenato a pH 7.0 ($\epsilon=8503 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e a pH 7.5 ($\epsilon=13135 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

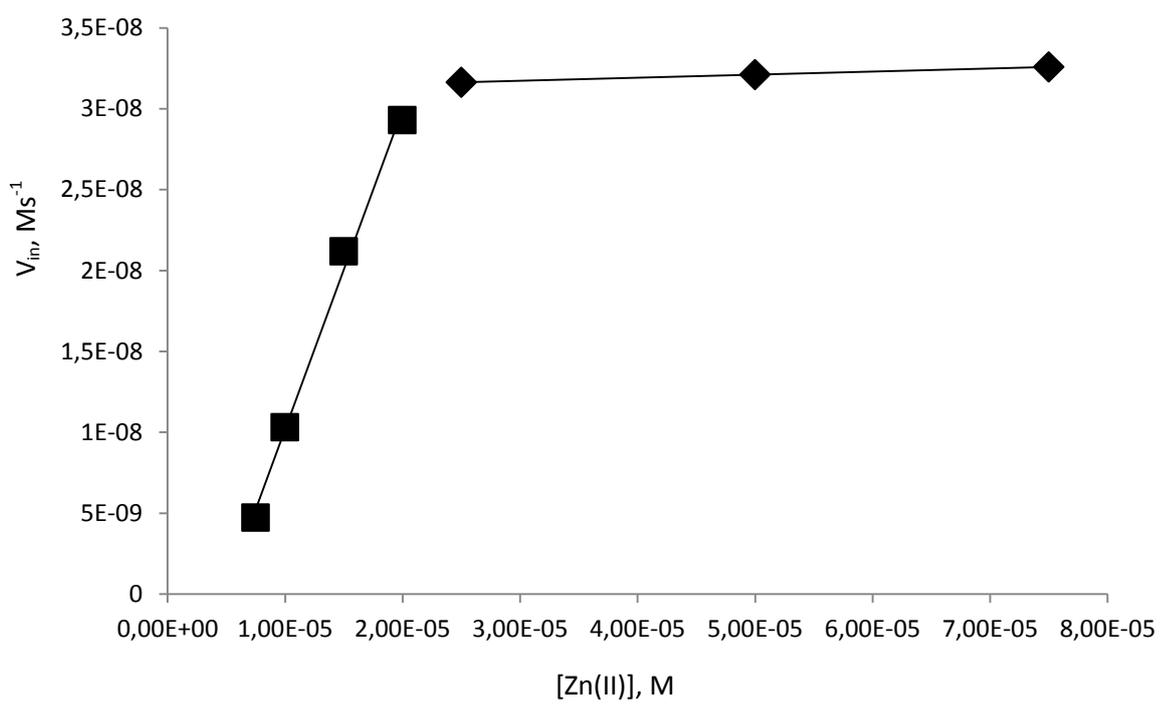
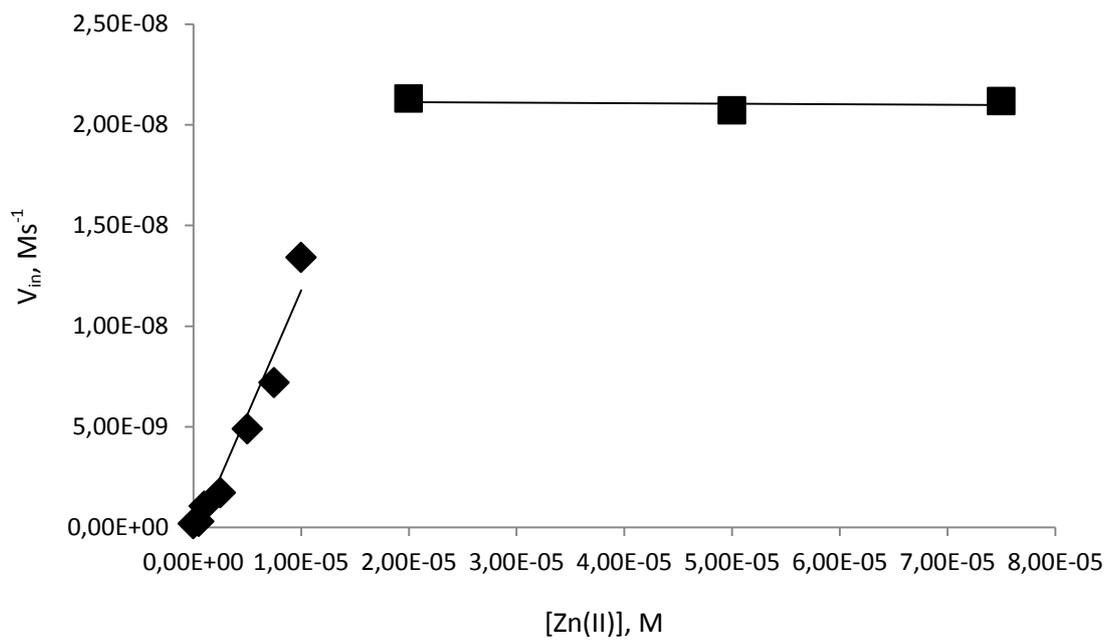
3. Cinetiche al variare della concentrazione di Zn(II)

Per ciascuno dei tre campioni di nanoparticelle si preparano una serie di cuvette, aumentando progressivamente la concentrazione di Zn(II) in cuvetta mantenendo invece stabile la quantità di Au NPs secondo le concentrazioni calcolate per $^1\text{H-NMR}$ con standard interno.

Nelle cuvette, riempite con opportune quantità di acqua mQ, vengono aggiunte nell'ordine, HEPES pH 7.0 ad ottenimento di una soluzione finale 10 mM in tampone, $[\text{TACN}]_{\text{NMR}}=20 \mu\text{M}$ in Au NPs e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ a concentrazione variabile.

Il substrato viene aggiunto solo contestualmente alla misura, a raggiungimento di una concentrazione in cuvetta di 1 mM, previa agitazione manuale della cuvetta.

Una volta raccolti ed elaborati i dati, si costruisce un grafico per ciascun campione di Au NPs che riporta in ordinata le velocità iniziali di idrolisi ed in ascisse le concentrazioni di Zn(II) realizzate in ogni cuvetta. Per definire la concentrazione di saturazione di TACN si considera l'intersezione delle rette tracciate tra i punti che giacciono sullo slope e i punti che giacciono sul plateau successivo alla saturazione.



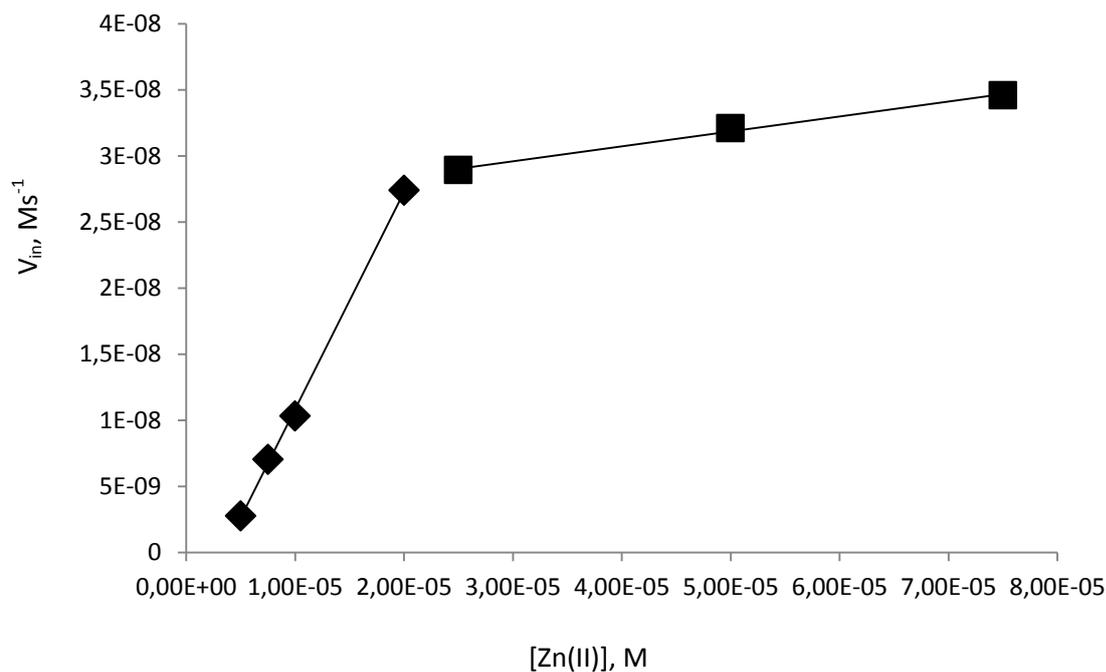


Fig. 2.30: Titolazione con Zn(II) di [TACN]=50 μ M di AU NPs C6TACN, C9TACN, C12TACN

4. Titolazioni dirette con Cu(II)

In due cuvette in quarzo da 1 mL si realizza in ognuna, in un volume totale di 800 μ L, [TACN]= 50 μ M, [MES]= 10 mM. A una di queste cuvette viene aggiunta una soluzione titolante di Cu(NO₃)₂, alla seconda vengono aggiunte le medesime aliquote di acqua mQ. Si registra l'assorbimento del complesso TACN-Cu(II) a 264 nm: per eliminare l'intenso contributo all'assorbimento dell'alta concentrazione di nanoparticelle presente in soluzione a [TACN]=50 μ M si misura l'assorbimento in confronto all'assorbimento del bianco in spettrofotometro Cary 100 a doppio raggio.

Viene costruito un grafico che riporta in ascissa l'assorbanza automaticamente corretta per il fattore diluitivo e in ordinata le [Cu(II)].

Come si può osservare dagli andamenti presentati nella Sez. 2.5.3, il valore ottenuto non permette una valutazione fine della concentrazione, quanto più una conferma del valore individuato tramite ¹H-NMR con standard interno e titolazione con Zn(II) in presenza di HPNP.

5. Cinetiche al variare delle concentrazioni di HPNP (Michaelis-Menten)

Per ciascuno dei tre campioni di nanoparticelle si preparano una serie di cuvette, aumentando progressivamente la concentrazione di HPNP in cuvetta mantenendo invece stabile la quantità di Au NPs secondo le concentrazioni calcolate per $^1\text{H-NMR}$ con standard interno.

Nelle cuvette, riempite con opportune quantità di acqua mQ, vengono aggiunte nell'ordine, HEPES pH 7.5 ad ottenimento di una soluzione a titolo finale di 10 mM in tampone, Au NPs a $[\text{TACN}]_{\text{NMR}}=20 \mu\text{M}$, $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2]=20 \mu\text{M}$.

Il substrato viene aggiunto solo immediatamente prima della misura in concentrazioni variabili da 0 mM a 3 mM, previa agitazione manuale della cuvetta. Una volta raccolti ed elaborati i dati, si costruisce un grafico per ciascun campione di Au NPs che riporta in ordinata le velocità iniziali di idrolisi ed in ascisse le concentrazioni di HPNPP realizzate in ogni cuvetta. Le curve ottenute vengono fittate con OriginPro 8 interpolando mediante l'equazione di Michaelis-Menten, ricavando i parametri catalitici k_{cat} e K_M .

6. Titolazioni di fluorescenza

Tutti i probe utilizzati nelle titolazioni di fluorescenza sono stati acquistati presso BioLog Life Science Institute in forma di soluzione 10 mM.

Nelle titolazioni di fluorescenza, effettuate utilizzando uno strumento Varian Cary Eclipse, vengono aggiunti in cuvetta aliquote di una soluzione di probe fluorescente da una soluzione 100 μM preparata per diluizione del prodotto commerciale non ulteriormente purificato. In una cuvetta da fluorescenza (3 mL) viene introdotta una opportuna quantità di H_2O mQ, HEPES pH 7.0 ad ottenere una concentrazione finale in soluzione di 10 mM, poi Au NPs e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ad ottenere una concentrazione finale di 10 μM in complessi TACN-Zn(II), mantenendosi a una temperatura sperimentale di 25°C. A questa soluzione vengono addizionate aliquote di probe fluorescente (tipicamente 250 nM per aggiunta). Gli spettri di emissione vengono registrati e, ad ogni aggiunta, l'intensità della massima emissione è plottata contro la concentrazione raggiunta in cuvetta. Le concentrazioni di saturazione sono calcolate come intercetta della retta

costruita sui punti in cui è evidente l'assenza di interazione con la nanoparticella ($R^2 > 0.99$) con l'asse delle ascisse (Fig. 2.31).

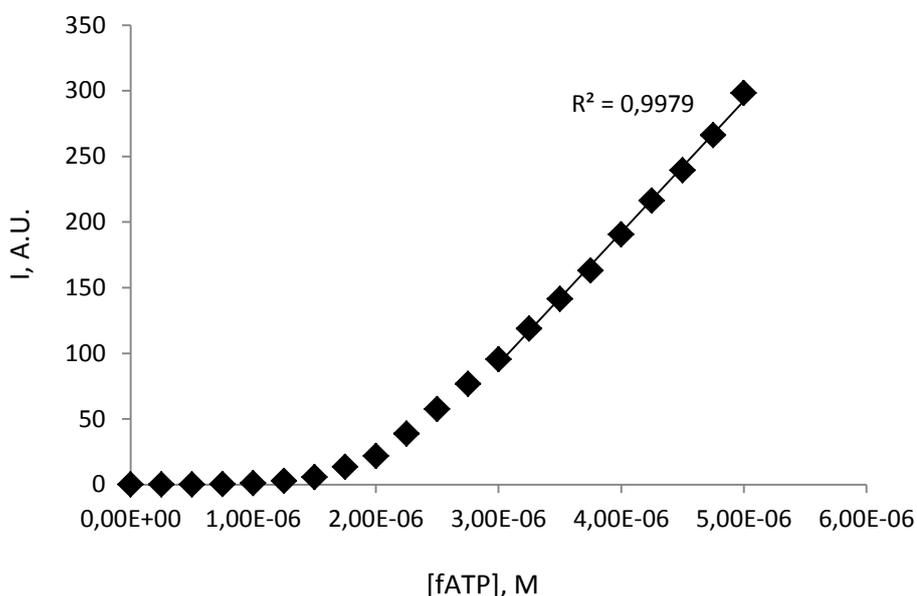


Fig. 2.31: Esempio di trattamento dei dati in una titolazione di Au NPs con fATP tramite plot dei massimi di emissione.

7. Displacement di fATP con MANT-ATP

I displacement di probe fluorescente da Au NPs C12TACN sono stati effettuati utilizzando uno strumento Varian Cary Eclipse, aggiungendo a una soluzione [TACN-Zn(II)]=10 μ M di nanoparticelle Au NPs C12TACN, 10 mM HEPES pH=7.0 una quantità di probe fATP tale da raggiungere una concentrazione finale in probe fluorescente di 1.44 μ M (80% della concentrazione di saturazione del monostrato) a T=25°C. MANT-ATP viene aggiunto da una soluzione 100 μ M preparata per diluizione del prodotto commerciale senza ulteriore purificazione, in aliquote tali da raggiungere una concentrazione finale di 250 nM per aggiunta. L'intensità di fluorescenza viene seguita ad ogni aggiunta verificata alle lunghezze d'onda di emissione dei rispettivi probe e l'intensità di massimo viene plottata contro la concentrazione di probe aggiunto.

8. Determinazione delle dimensioni di Au NPs

DLS

La determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle funzionalizzate dai tre leganti sono state effettuate in acqua mQ in concentrazione nel range del 100 nM in [TACN]. Ai fini di una corretta determinazione dimensionale si richiede che il campione abbia assorbimento trascurabile, in quanto, essendo DLS un metodo che sfrutta lo scattering della luce, è importante che ogni fenomeno di assorbimento venga ridotto al minimo.

Ogni analisi è stata condotta a 25°C dopo un periodo di equilibratura col solvente di 10 minuti.

L'analisi dei dati è stata effettuata considerando il valore modale tra i contributi alla distribuzione delle diverse sottopopolazioni di nanoparticelle, non essendo la distribuzione fittabile con una gaussiana simmetrica.

TEM

I valori delle dimensioni dei core d'oro vengono calcolati su un campione di 200 nanoparticelle da foto TEM, utilizzando il software di elaborazione immagini ImageJ.

I valori presentati sono espressi come medie dei valori ottenuti, l'errore presentato come deviazione standard della misura.

TGA

Per effettuare l'analisi termogravimetrica i campioni vengono caricati su pan in platino HT (in grado di sopportare temperature fino a 1000°C), preventivamente tarati, da soluzione in metanolo e vengono sottoposti ad un programma multistep che prevede:

- run preliminare di eliminazione del solvente (isoterma a 100°C per 10 min.)
- rampa 10°C/min in aria fino a 1000°C

I risultati ottenuti vengono elaborati calcolando, a partire dal peso iniziale del campione, le mmoli di Au metallico secondo la percentuale di parte inorganica e le mmoli di legante organico secondo la percentuale di parte organica.

2.11 RIFERIMENTI

- [1]. Zaupa, G.; Mora, C.; Bonomi, R.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (17), 4879-4889;
- [2]. a) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P., *Langmuir* **2008**, *24* (8), 4120-4124; b) Jana, N. R.; Peng, X; *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125* (47), 14280-14281;
- [3]. Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J; *Langmuir* **2006**, *22* (13), 5882-5887;
- [4]. Wuelfing, W. P.; Templeton, A. C.; Hicks, J. F.; Murray, R. W., *Anal. Chem.* **1999**, *71* (18), 4069-4074;
- [5]. Moores, A.; Goettmann, F.; *New J. Chem.*, **2006**, *30*, 1121-1132;
- [6]. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Biochemistry*, 5th edition, New York, W.H. Freeman, 2002;
- [7]. Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103;
- [8]. a) Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Prins, L. J., *Chem. Commun.* **2011**, *47* (1), 445-447; b) Pieters, G.; Cazzolaro, A.; Bonomi, R.; Prins, L. J., *Chem. Commun.* **2012**, *48* (13), 1916-1918;
- [9]. Pieters, G.; Pezzato, C.; Prins, L. J., *Langmuir* **2012**, *29* (24), 7180-7185;
- [10]. Bartz, M.; Kuther, R.; Seshadri, R.; Tremel, W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2466;
- [11]. Belser, T.; Stohr, M.; Pfaltz, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8720.

3. STABILITA' DI NANOSISTEMI PER CATALISI E RICONOSCIMENTO MOLECOLARE

3.1 Introduzione

Come è stato messo in evidenza nel capitolo precedente, la variazione della struttura delle molecole componenti il monostrato organico sulla superficie di nanoparticelle d'oro influenza l'architettura del monostrato e ne determina le proprietà di interazione con molecole in soluzione. Occorre ricordare come lo studio risponda a precise esigenze applicative, proponendosi all'affinamento del saggio per proteasi presentato in introduzione, ma introduce sia un metodo di studio del monostrato, sia risultati potenzialmente applicabili a sistemi diversi da quelli basati su complessi TACN-Zn(II).

Nonostante nessuno dei sistemi sintetizzati si sia dimostrato più attivo nella catalisi o nell'interazione con oligoanioni rispetto al sistema utilizzato in precedenza, anzi peggiorando l'interazione con HPNP nel caso di Au NPs C6TACN, i tre sistemi preparati forniscono una piattaforma ideale per sviluppare elaborare uno studio della stabilità nel tempo delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate in relazione a caratteristiche dell'architettura del monostrato, in quanto è possibile studiare l'evoluzione temporale di parametri eterogenei. È doveroso ricordare come, nonostante l'enorme potenziale applicativo di sistemi basati su nanoparticelle d'oro, questioni fondamentali come la *shelf life* dei sistemi sintetizzati sia un parametro poco studiato.

Lo studio presentato in questa sezione utilizza i monostrati catalitici preparati come modello per determinare modificazioni del sistema in funzione di diversi parametri in un arco temporale di 4 mesi, utilizzando i metodi presentati in Sez. 2 (modificazioni strutturali della nanoparticella, parametri catalitici e interazione con oligoanioni) per comprendere e potenzialmente prevedere come diverse architetture di monostrato (*loose*, come in Au NPs C9TACN e C12TACN o *packed*, come in C6TACN) e spessore della parte idrofobica del monostrato influenzino la stabilità del sistema studiato.

3.2 Stabilità della soluzione di nanoparticelle d'oro

Soluzioni di nanoparticelle d'oro, seppure ritenute sistemi relativamente stabili, sono soggette ad aggregazione innescata da condizioni sperimentali come temperatura, pH e forza ionica^[1], ma anche da semplice invecchiamento^[2]. Tale aggregazione si traduce in un *Ostwald Ripening* dei nanocristalli d'oro, portando alla formazione di un numero inferiore di nanoparticelle in soluzione caratterizzate da dimensioni maggiori^[3].

Questo fenomeno è più marcato per nanoparticelle passivate mediante l'utilizzo di surfattanti o stabilizzanti che sfruttano interazioni deboli (ad esempio, stabilizzazione mediante citrati), ma si è dimostrato presente anche per nanoparticelle passivate da tiolati^[4], in cui il legame stabilizzante è ad alta energia.

Nonostante i monostrati presentati nel capitolo precedente garantiscono protezione al sistema dall'aggregazione al momento della sintesi, non è mai stato studiato con continuità quale sia il limite temporale di tale stabilità.

Utilizzando i metodi proposti nella sezione precedente, la stabilità di soluzioni di Au NPs C6TACN, C9TACN e C12TACN in H₂O mQ è stata studiata in un arco temporale di 4 mesi dalla sintesi, utilizzando come standard di caratterizzazione per osservare la presenza di aggregazione microscopia elettronica a trasmissione, DLS e presenza di assorbimento della banda plasmonica di superficie.

3.2.1 Variazioni dimensionali e morfologiche del cluster d'oro

In maniera analoga a quanto presentato nel capitolo precedente, i campioni sono analizzati tramite microscopia a trasmissione elettronica per osservare cambiamenti nel diametro dei core d'oro dopo 4 mesi. In seguito sono riportate le immagini ottenute e le relative distribuzioni dimensionali confrontate con gli stessi parametri registrati al momento della sintesi.

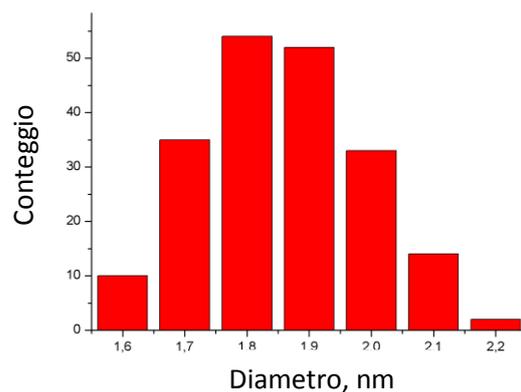
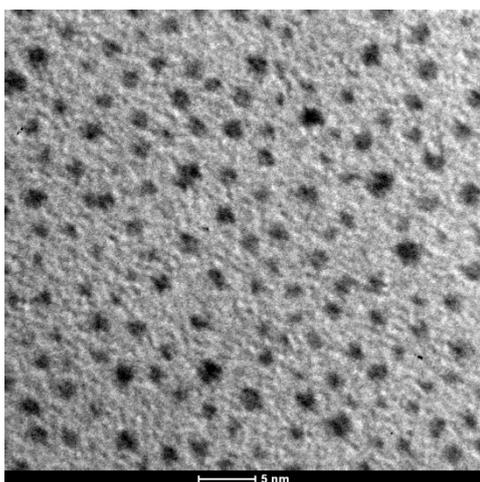


Fig. 3.1: Immagine TEM di Au NPs C6TACN (a sinistra) e relativa distribuzione dimensionale (a destra).

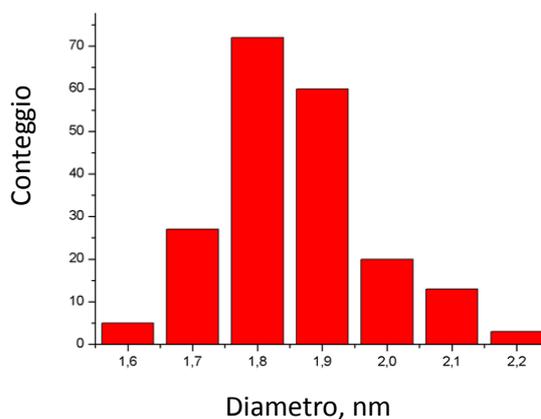
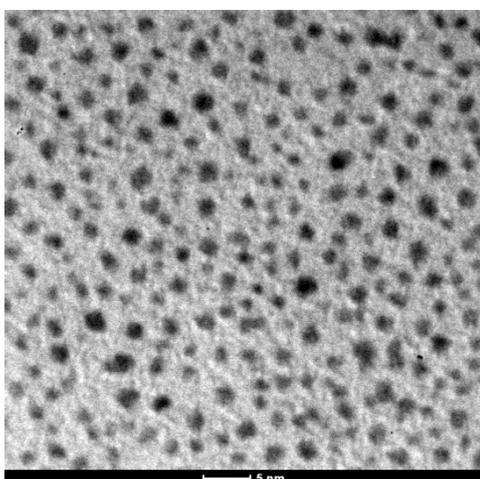


Fig. 3.2: Immagine TEM di Au NPs C9TACN (a sinistra) e relativa distribuzione dimensionale (a destra).

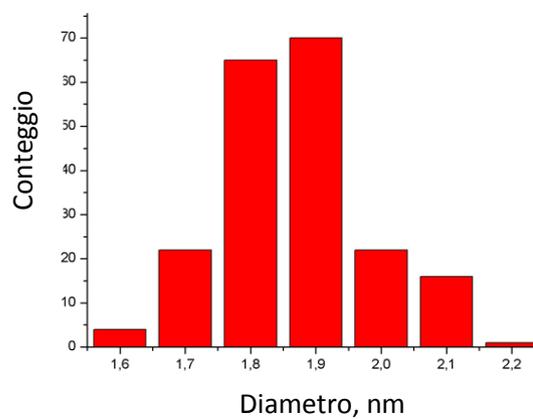
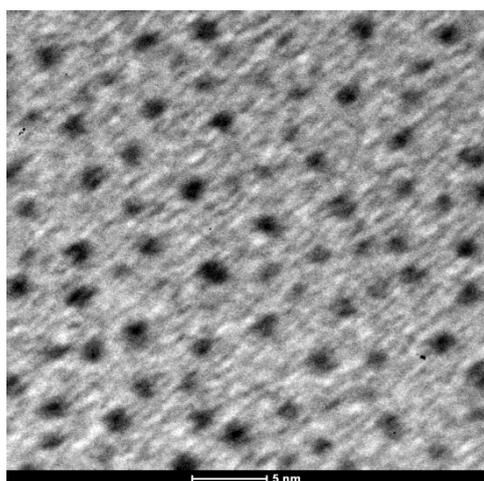


Fig 3.3: Immagine TEM di Au NPs C12TACN (a sinistra) e relativa distribuzione dimensionale (a destra).

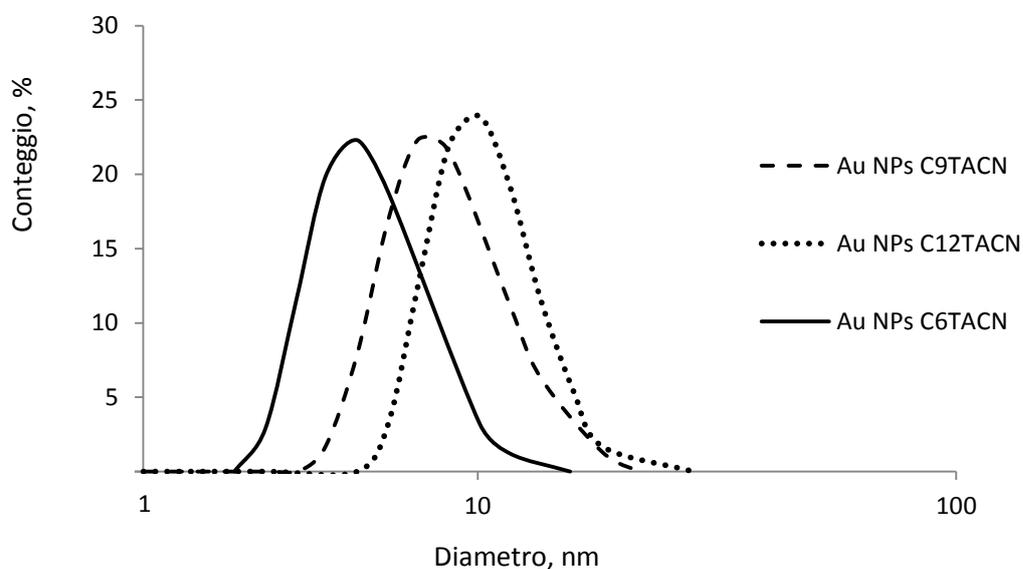
Campione	Diametro, nm (2 giorni)	Diametro, nm (4 mesi)
Au NPs C6TACN	1.8±0.2	1.9±0.1
Au NPs C9TACN	1.7±0.2	1.9±0.1
Au NPs C12TACN	1.8±0.2	1.9±0.1

Tab. 3.1: Diametro dei nuclei d'oro a due giorni dalla sintesi e dopo 4 mesi dalla sintesi.

Come presentato nelle immagini proposte (Fig. 3.1-3.3) e riassunto in Tab. 3.1, le dimensioni dei core d'oro non hanno subito rilevanti modifiche in ragione dell'errore della misura. In tutte le immagini non si osserva presenza significativa di nanoparticelle più grandi di 5.0 nm, escludendo quindi un fenomeno di accrescimento dei nanocristalli d'oro.

3.2.2 Variazioni dimensionali della nanoparticella

L'analisi DLS permette di superare i limiti del TEM, vincolato all'accertamento delle dimensioni del core metallico, ed ottenere il diametro idrodinamico della nanoparticella. I risultati dell'analisi DLS dei tre campioni ottenuti a due giorni dalla sintesi e quelli registrati a 4 mesi dalla sintesi è riportata in Fig. 3.4.



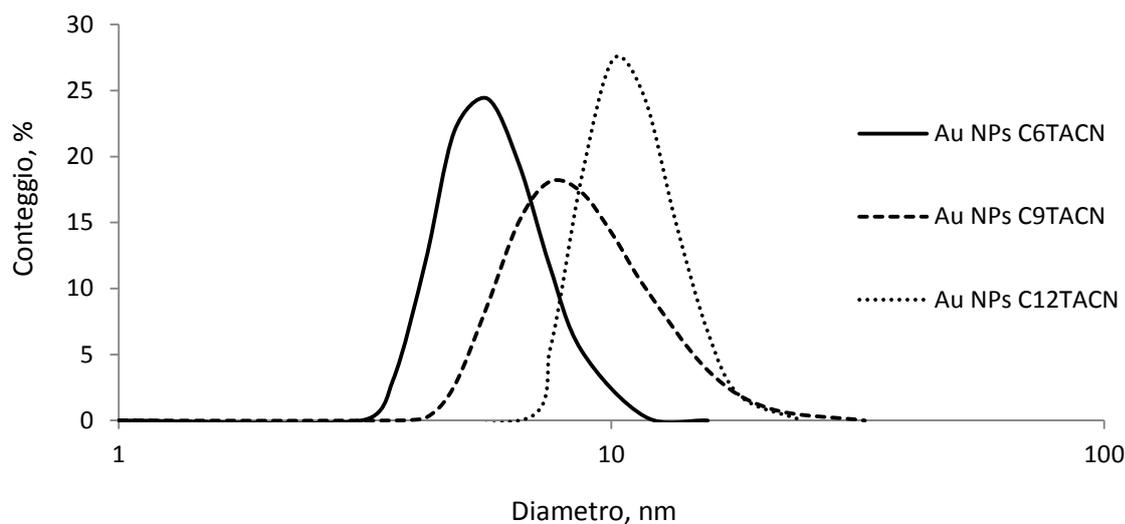


Fig. 3.4: Distribuzione dimensionale dei volumi idrodinamici di Au NPs C6TACN, Au NPs C9TACN e Au NPs C12TACN (H₂O mQ, 25°C) (supr.) dopo due giorni dalla sintesi; (infr.) dopo 4 mesi dalla sintesi.

Campione	Diametro, nm (2 giorni)	Diametro, nm (4 mesi)
Au NPs C6TACN	5.6	5.6
Au NPs C9TACN	8.1	8.7
Au NPs C12TACN	10.9	10.1

Tab. 3.2: Diametro idrodinamico della popolazione di nanoparticelle più rappresentata nel campione analizzato con DLS.

In supporto al dato ottenuto dalla microscopia relativo al contributo dimensionale dato dai core metallici, anche il dato ottenuto da DLS non si discosta da quello ottenuto contestualmente alla sintesi (*Cfr. Sezione 2.3*), avvalorando l'ipotesi che durante la conservazione del campione non siano avvenuti fenomeni di aggregazione tra nanoparticelle.

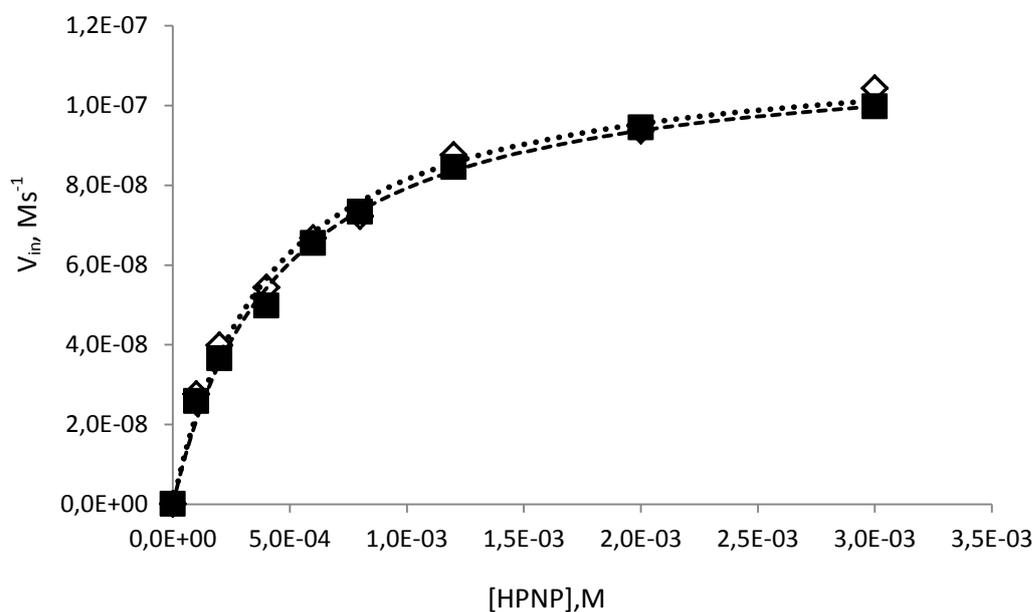
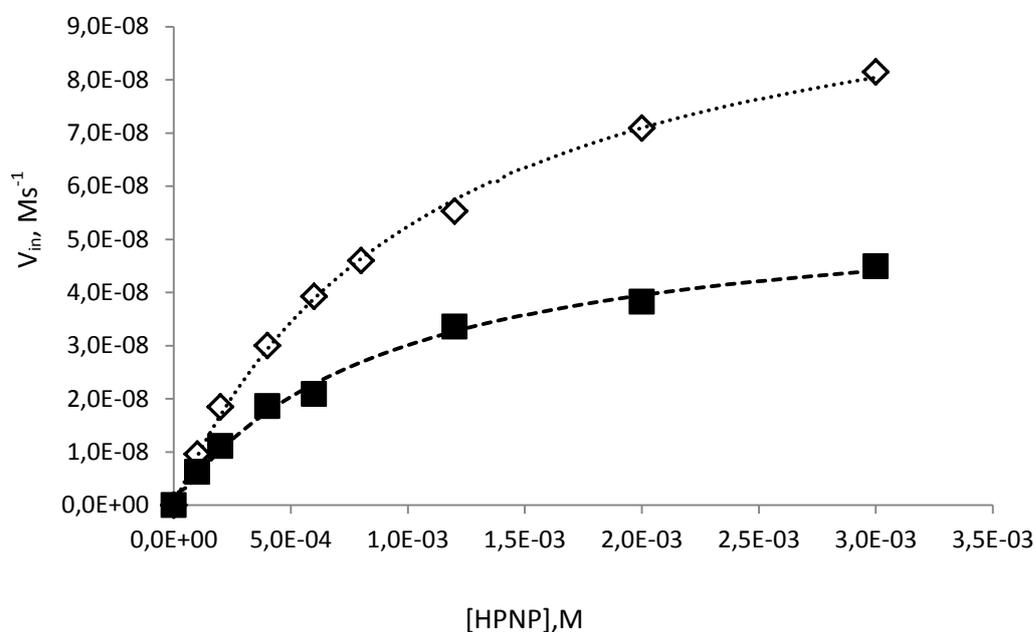
3.3 Stabilità temporale dei parametri cinetici

Assodato mediante le caratterizzazioni presentate in precedenza come non si siano verificati fenomeni di aggregazione dei tre nanosistemi nel periodo di tempo

considerato, si procede a prendere in considerazione l'attività catalitica sulla reazione di transfosforilazione di HPNP mediata dai tre diversi monostrati.

Gli esperimenti di catalisi a concentrazione variabile di substrato per i tre campioni sono stati condotti a $[TACN-Zn(II)] = 20 \mu M$, $[HEPES] = 10 \text{ mM}$ pH 7.5 a $40^\circ C$, valutando il rilascio di p-nitrofenato a $\lambda = 400 \text{ nm}$. I punti sperimentali ottenuti sono stati interpolati mediante l'equazione di Michealis-Menten, permettendo di ottenere i valori dei parametri catalitici.

In Fig. 3.6 sono presentate le curve ottenute per le cinetiche a concentrazione variabile di substrato contestualmente alla sintesi delle nanoparticelle (giorno 2) e dopo 4 mesi.



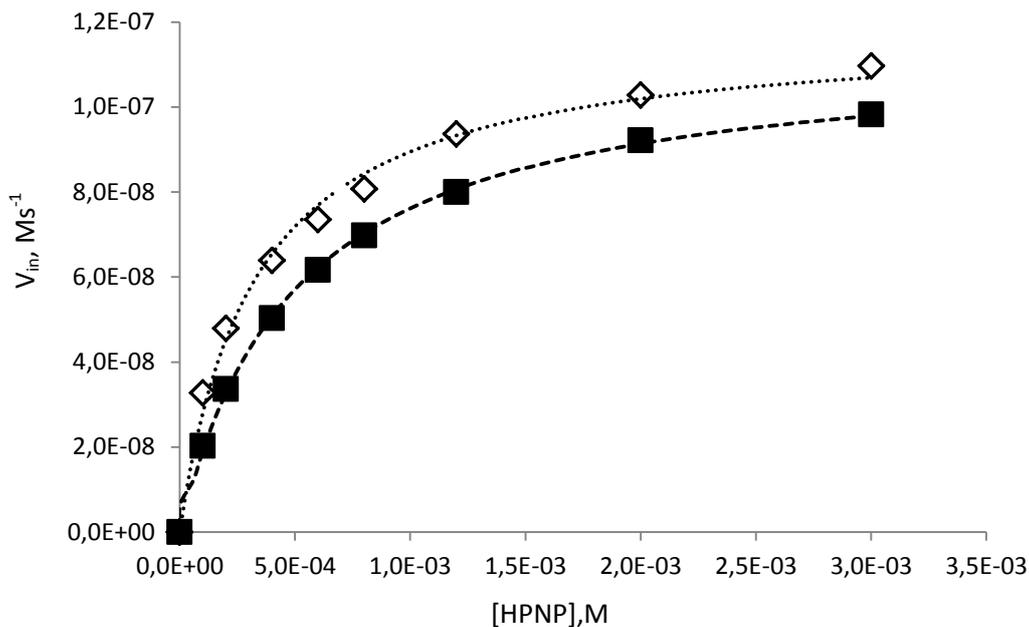
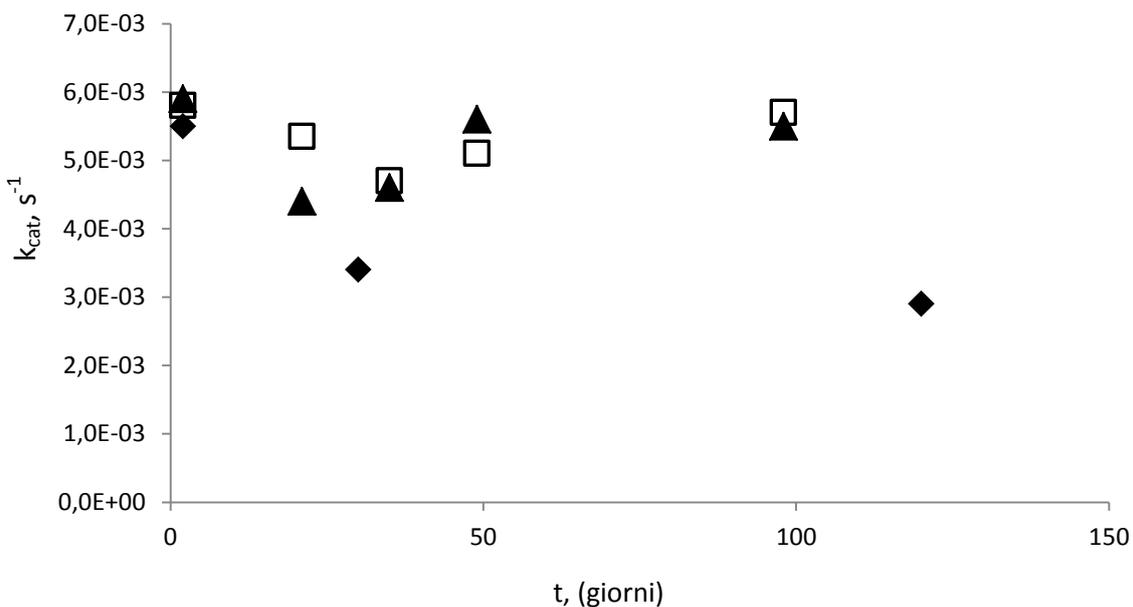


Fig. 3.5: Velocità iniziale della reazione di transforilazione di HPNP in funzione della concentrazione di HPNP in soluzione in presenza di a) Au NPs C6TACN, b) Au NPs C9TACN, c) Au NPs C12TACN, contestualmente alla sintesi (◇) e dopo 4 mesi (■).

Si osserva come le curve, sebbene consistenti con l'equazione di Michaelis-Menten anche dopo 4 mesi, presentano nel caso di Au NPs C6TACN evidenti discrepanze che si traducono in differenze importanti nei valori dei parametri catalitici.

In Fig. 3.6 sono riassunti i valori di k_{cat} e K_M ottenuti dall'interpolazione dei dati per i tre sistemi sintetizzati nell'intervallo di tempo considerato.



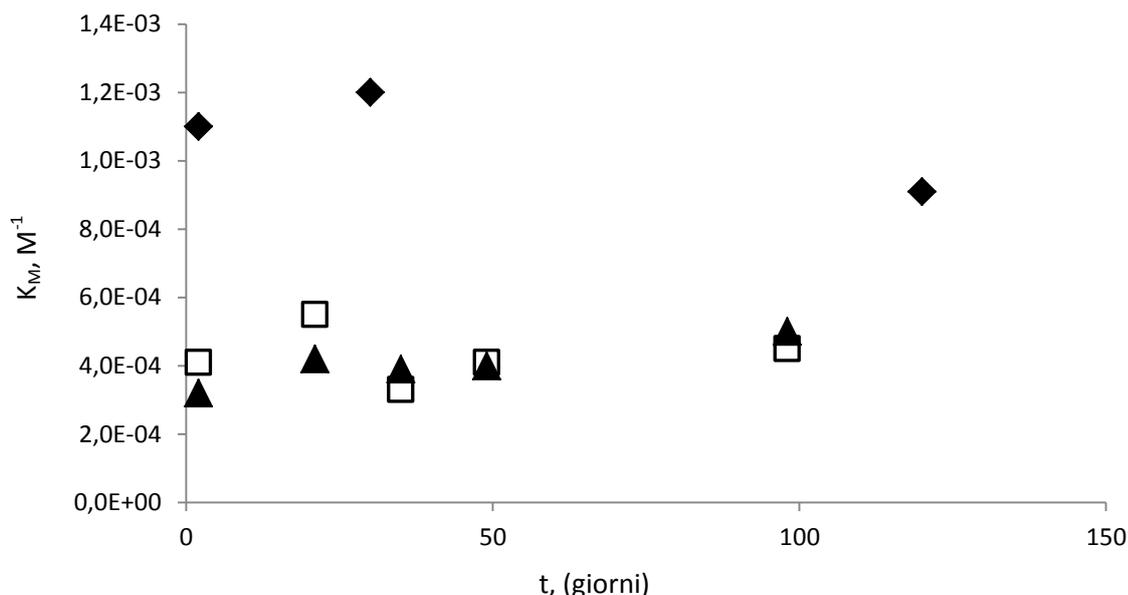


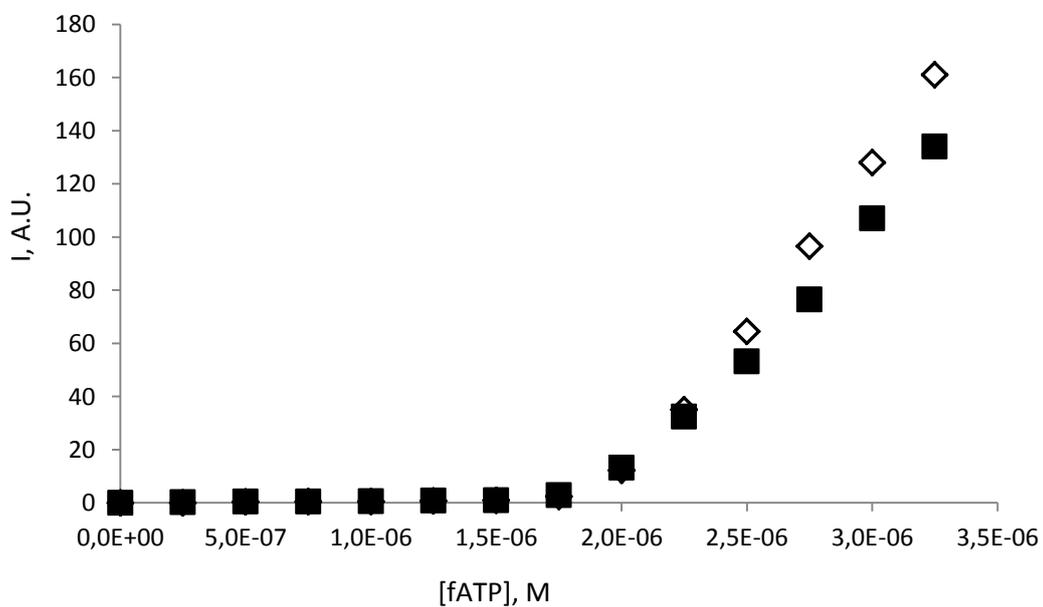
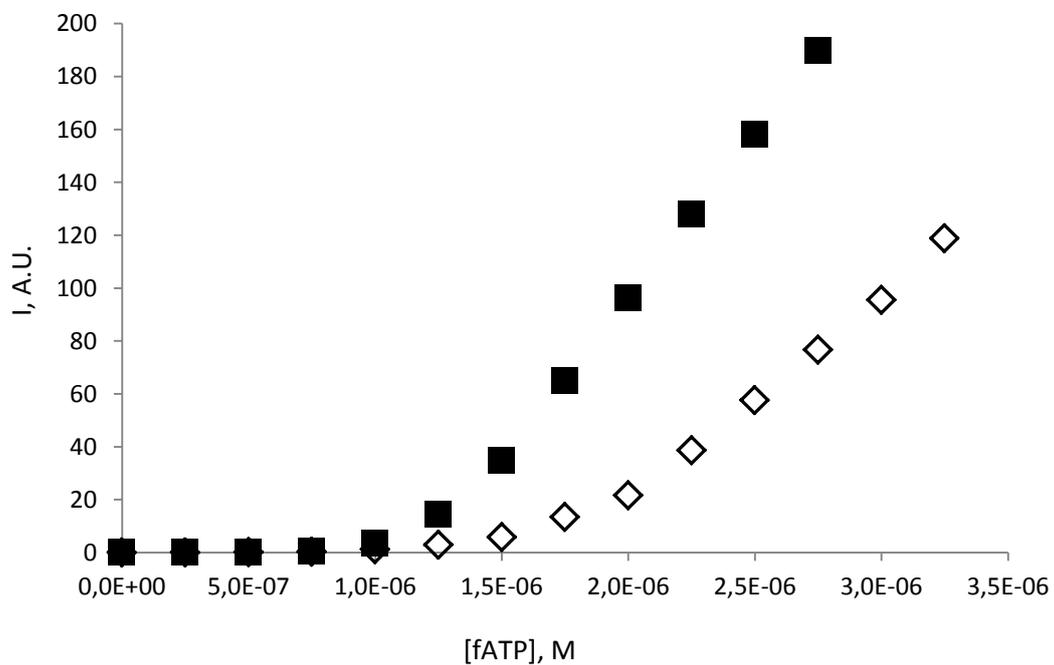
Fig. 3.6: (supr.) Andamento dei valori di k_{cat} di Au NPs C6TACN (◆), Au NPs C9TACN(□) e Au NPs C12TACN (▲) nel tempo; (infr.) Andamento dei valori di K_M di Au NPs C6TACN (◆), Au NPs C9TACN (□) e Au NPs C12TACN (▲) nel tempo [TACN-Zn(II)]=20 μ M, [HEPES]=10 mM pH 7.5, 40°C, λ =400 nm.

Come si può notare dall'andamento dei parametri catalitici, è possibile distinguere due tipi di comportamenti. I sistemi caratterizzati dal monostrato formato da tioli C9TACN e C12TACN mantengono sostanzialmente inalterate le proprie proprietà catalitiche, sia in termini di k_{cat} che di K_M . Au NPs C6TACN nel tempo, al contrario, subisce una diminuzione del valore di k_{cat} , mantenendo pressoché stabile il valore di K_M .

3.4 Stabilità della concentrazione di saturazione di oligoanione fluorescente sul monostrato

La capacità di legare oligoanioni mediata da un monostrato carico positivamente non è solo una caratteristica interessante nello sviluppo di saggi, come già ricordato nell'introduzione, ma è stato esplorato anche come strumento diagnostico per sondare il monostrato. Con questo duplice scopo si inserisce l'analisi del monostrato con un probe fluorescente che interagisca attraverso interazione elettrostatica al fine di sondare l'immediata superficie del monostrato. Per condurre questo studio si è analizzata la variazione della concentrazione di saturazione del monostrato con fATP

(Cfr. Sez. 2.5) nell'arco temporale di 4 mesi. Gli andamenti ottenuti immediatamente dopo la sintesi e dopo 4 mesi sono esposti in Fig. 3.7:



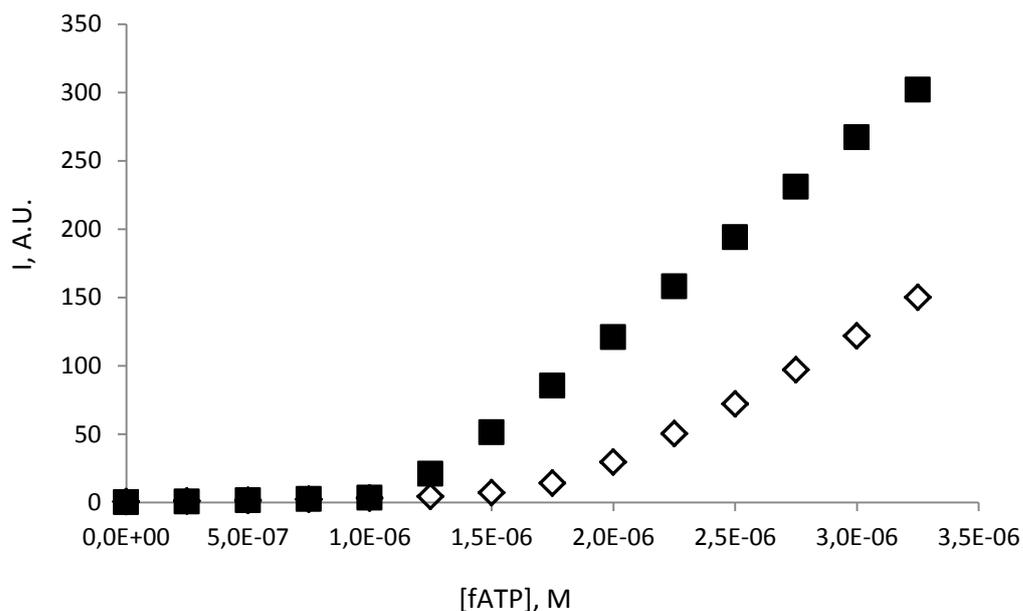


Fig. 3.7: Intensità di fluorescenza registrata in funzione della concentrazione di fATP in soluzione in presenza di a) Au NPs C6TACN, b) Au NPs C9TACN, c) Au NPs C12TACN, contestualmente alla sintesi (◇) e dopo 4 mesi (■).

Le concentrazioni di saturazione ottenute nelle titolazioni nel periodo considerato per i tre campioni è presentata per esteso in Fig. 3.8.

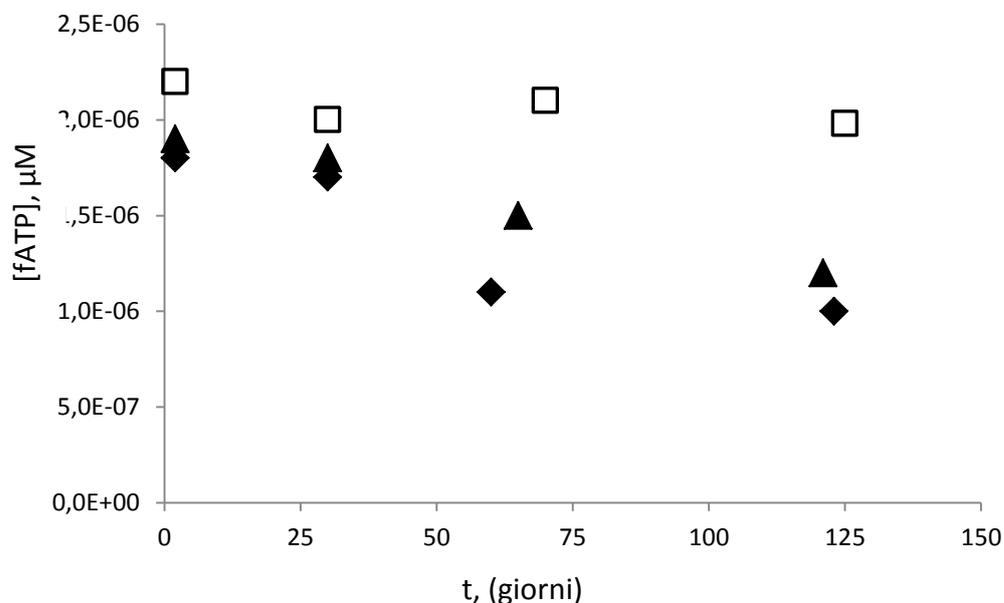


Fig. 3.8: Concentrazione di saturazione dei monostrati organici su nanoparticelle d'oro nel tempo; Au NPs C6TACN (◆), Au NPs C9TACN (□), Au NPs C12TACN (▲); [TACN-Zn(II)]=10 μM, [HEPES]=10 mM pH 7.0, 25°C, λ_{ex} =305 nm, λ_{em} =370 nm.

Come si può osservare dagli andamenti presentati, il valore di concentrazione di saturazione per Au NPs C9TACN si mantiene costante a 2.0 μM , potendo quindi concludere come il sistema non sia perciò soggetto a degradazione. Questo non succede per Au NPs C6TACN e per Au NPs C12TACN: entrambi i campioni vanno incontro a una perdita della quantità di probe fluorescente legato sulla superficie a saturazione nella finestra di tempo considerata, consistente nel caso di Au NPs C6TACN con il dato di K_M ottenuto dalla catalisi di HPNP.

3.5 Conclusioni

Per la prima volta è stato presentato uno studio sistematico sulla stabilità di soluzioni di nanoparticelle d'oro passivate da tioli che espongono TACN, osservando come i tre sistemi analoghi interagiscano con il substrato di catalisi e con oligoanioni.

Da questo lavoro emerge come i tre campioni sintetizzati dimostrino una inaspettata stabilità nonostante l'invecchiamento delle soluzioni, come si può osservare dall'assenza di aggregati di nanoparticelle.

Ancora più sorprendente è come nel tempo le caratteristiche catalitiche e di binding dei tre sistemi vengano conservate, seppur con delle differenze che apparentemente sono imputabili alla struttura dei *building blocks* del monostrato e all'architettura supramolecolare dello stesso. Nel dettaglio si può osservare come Au NPs C9TACN mantengano inalterate sia i parametri catalitici che la concentrazione di saturazione del monostrato, non dimostrando quindi alcuna conseguenza dovuta all'*aging* della soluzione.

Au NPs C6TACN, che nel capitolo precedente si era distinto dagli altri campioni per la differenza di interazione con le molecole probe, dimostra un leggero calo di k_{cat} , dato rafforzato dalla diminuita capacità di legare fATP. Studi precedenti hanno dimostrato come il valore di k_{cat} di sistemi catalitici multivalenti sia fortemente determinato dal livello in cui il nanosistema può essere saturato dal substrato; ne è indicazione la diminuita capacità di loading di fATP sulla superficie del nanosistema.

Au NPs C12TACN non subisce modifiche consistenti nell'attività catalitica, come testimoniato dalla stabilità dei valori di k_{cat} e K_M nel tempo; tuttavia il sistema subisce

una leggera diminuzione della concentrazione di saturazione del monostrato con fATP. La ragione per cui il valore di k_{cat} di Au NPs C12TACN non è influenzato (come osservato per Au NPs C6TACN) potrebbe essere correlato al fatto che fATP interagisce con più di un head group rispetto al substrato catalitico. È perciò possibile che k_{cat} diminuisca in un periodo di tempo più lungo.

Da un punto di vista applicativo in termini di *shelf life* delle soluzioni, Au NPs C9TACN si dimostra la scelta migliore, essendo l'unico campione che mantiene totalmente inalterate le proprie qualità nella finestra di tempo considerata.

3.6 Parte sperimentale

3.6.1 Reagenti, strumentazione e metodi

Per reagenti, strumentazioni e metodi utilizzati relativamente a questo capitolo si faccia riferimento alla parte sperimentale della Sez. 2.

I campioni utilizzati sono stati utilizzati a partire dalle medesime soluzioni stock in H₂O mQ utilizzate per la formulazione della Sez. 2, senza ulteriore caratterizzazione di natura qualitativa o quantitativa. L'aggiunta di soluzioni di Zn(NO₃)₂, tampone HEPES, HPNP o fATP è effettuata solo contestualmente all'utilizzo.

Le soluzioni sono state conservate nella finestra di tempo considerata al buio in vials di vetro a una temperatura compresa tra 0 e 4°C fino all'utilizzo.

3.7 Riferimenti

- [1]. Dahl, J. A.; Maddux, B. L. S.; Hutchison, J. E., *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2228-2269;
- [2]. Gubicza, J.; Lábár, L.J.; Quynh, L.M.; Nam, N.H.; Luong, N.H. *J. Mat. Chem. Phys.* **2013**, *138*, 449-453;
- [3]. Jang, E.; Lim, E. K.; Choi, J.; Park, J.; Huh, Y. J.; Suh, J. S.; Huh, Y. M.; Haam, *Crys. Growth Des.* **2011**, *12* (1), 37-39;
- [4]. Li, F.; Zhang, H.; Dever, B.; Li, X. F.; Le, X. C., *Bioconj. Chem.* **2013**, *24* (11), 1790-1797.

4. INFLUENZA DEL DIAMETRO DELLA NANOPARTICELLA SULL'ATTIVITA' CATALITICA

Nel capitolo precedente si è dimostrato come una variazione di pochi atomi di carbonio della catena alchilica delle molecole componenti il monostrato organico su una nanoparticella d'oro sia in grado di influenzare l'attività catalitica e la stabilità del sistema. In quest'ottica ci si è interrogati sull'effetto delle dimensioni del supporto catalitico inorganico sui parametri studiati, in quanto variare il diametro del core d'oro induce variazioni importanti sulla morfologia della superficie metallica che si potrebbero riflettere nell'evento catalitico. È ben noto come per cluster d'oro superiori ai 300 atomi d'oro le nanoparticelle presentino caratteristiche di superficie assimilabili al materiale di bulk^[1], con una distinta cristallinità che riduce i difetti della superficie ed una curvatura meno accentuata rispetto a cluster di atomi d'oro di dimensioni inferiori. Tutti questi fattori potrebbero tradursi in una diversa disposizione e orientazione delle singole molecole componenti il monostrato, andando ad influenzare l'attività catalitica del sistema. Mentre la scelta di un supporto di maggiori dimensioni non è l'alternativa più desiderabile per la realizzazione di sistemi catalitici efficienti in termini di rapporto tra superficie d'oro e volume del supporto fornito al tiolo cataliticamente attivo, la realizzazione di un simile sistema potrebbe rivelarsi utile per lo sviluppo di sistemi di sensing in grado di produrre due diversi eventi a seguito dell'interazione con molecole bersaglio, permettendo oltre alla liberazione di p-nitrofenato conseguente alla catalisi di HPNP anche lo spostamento della banda plasmonica di superficie del sistema innescato da fenomeni di aggregazione.

4.1 Sintesi di Au NPs C9TACN 13 nm

Le nanoparticelle utilizzate per questo studio sono state sintetizzate mediante una procedura riadattata^[2] del metodo di Turkevich^[3], sfruttando la riduzione di HAuCl_4 in acqua mQ mediata da sodio citrato tribasico a 100°C, nel duplice ruolo di agente riducente e passivante, risultando in nanoparticelle di 13 nm di diametro. Questo tipo di

approccio sintetico permette di ottenere nanoparticelle relativamente monodisperse direttamente già stabilizzate in modo metastabile e in ambiente acquoso.

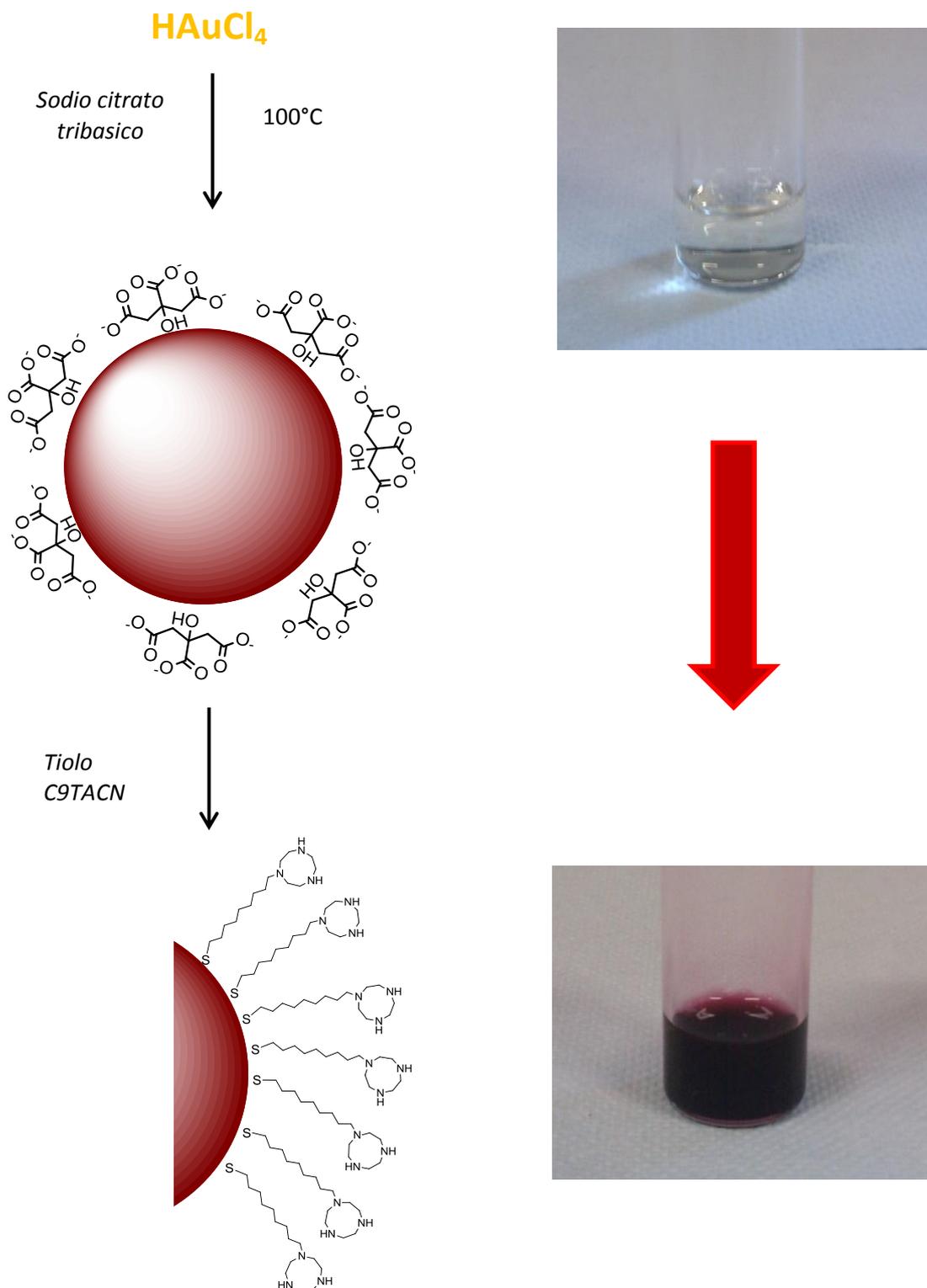


Fig. 4.1: Schema di sintesi di Au NPs C9TACN 13 nm con metodo di Turkevich.

L'aggiunta del tiolo C9TACN alla soluzione provoca, in conseguenza allo spiazzamento del citrato dalla superficie della nanoparticella, la passivazione definitiva del nano-oggetto tramite interazione stabile oro-tiolato.

La purificazione del nanosistema, visibilmente instabile a pH neutro per la presenza di citrato in soluzione, viene condotta mediante l'aggiunta di un eccesso di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ rispetto alla quantità iniziale di citrato utilizzato, permettendo la ridispersione delle nanoparticelle conseguente alla formazione del complesso citrato- $\text{Ca}(\text{II})$, che viene successivamente eliminato mediante cicli consecutivi di centrifugazione e cromatografia ad esclusione dimensionale. Siccome il sistema è noto in letteratura per essere difficile da purificare^[4], dopo aver accertato la stabilità della soluzione si procede alla caratterizzazione per accertare la presenza eventuale di citrato in soluzione e l'assenza di effetti mediati del $\text{Ca}(\text{II})$ nel processo catalitico.

4.2 Caratterizzazione di Au NPs C9TACN 13 nm

Il sistema sintetizzato viene caratterizzato mediante diverse tecniche al fine di identificarne univocamente le dimensioni, grado di monodispersione, purezza e concentrazione di headgroups, tenendo conto dei limiti che il sistema pone: le dimensioni del nano-oggetto rendono infatti improponibile un'analisi $^1\text{H-NMR}$ qualitativa (in termini di purezza del campione) e quantitativa (in termini di determinazione della concentrazione di headgroup in soluzione).

4.2.1 Dimensioni e morfologia dei cluster d'oro

Come già ricordato nel capitolo precedente, l'analisi TEM permette di valutare con precisione la dimensione dei nuclei d'oro delle nanoparticelle, monodispersività del campione ed eventuale presenza di aggregati.

Un'immagine esemplificativa della morfologia dei core d'oro, con relativa distribuzione dimensionale, è presentata in Fig. 4.2:

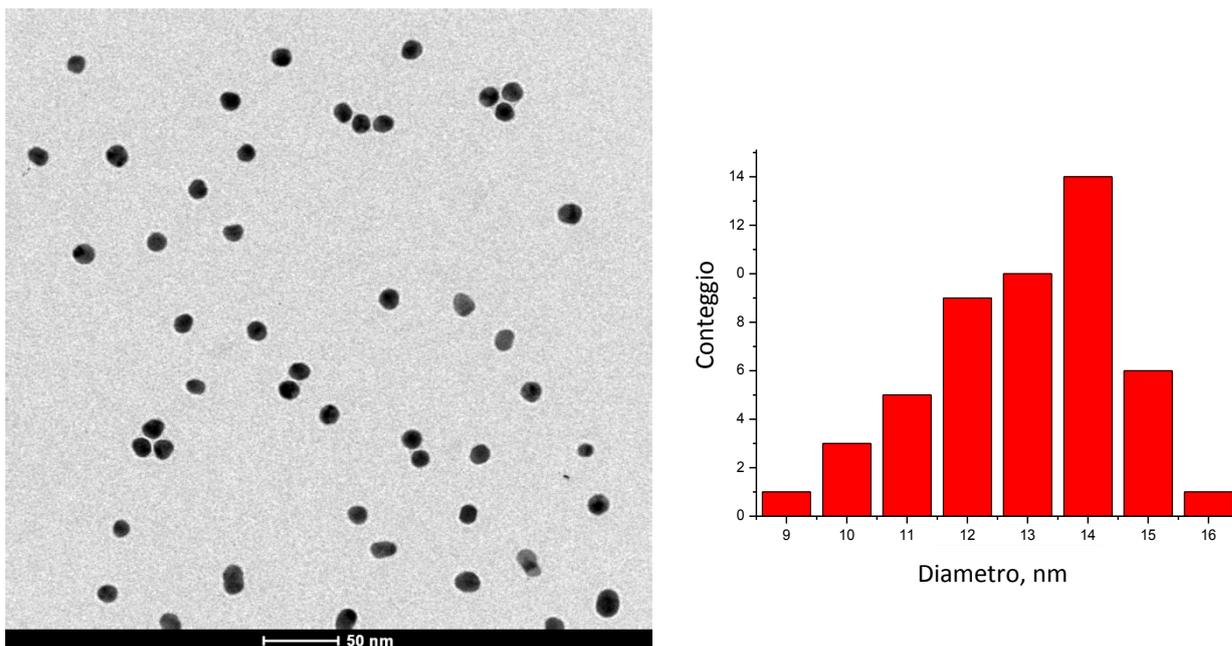


Fig. 4.2: (a sinistra) immagine TEM di Au NPs C9TACN 13 nm con (a destra) relativa distribuzione dimensionale.

Le dimensioni dei nuclei d'oro si attestano ad un valore medio di 13 ± 1.6 nm, compatibilmente con il grado di dispersività garantito dal metodo di sintesi, senza presentare morfologie discostanti dalla forma sferica. L'uniformità delle dimensioni e l'assenza di nanoparticelle con diametro inferiore ai 9 nm garantisce che i dati catalitici ottenuti dal sistema non vengano viziati dalla presenza di una particolare popolazione di nanoparticelle.

4.2.2 Dimensioni e stato di aggregazione delle nanoparticelle d'oro

L'analisi DLS è stata utilizzata per determinare la presenza di aggregati di nanoparticelle di grandi dimensioni in soluzione. Contrariamente alla determinazione delle dimensioni di nanoparticelle con diametro inferiore ai 2 nm, dove la formazione di nanoparticelle intorno a 3-5 nm è immediatamente riconoscibile tramite spettrometria UV-Vis a causa della comparsa della banda plasmonica superficiale a 520 nm, per nanoparticelle di queste dimensioni la banda plasmonica è già presente^[5], con un assorbimento massimo

che può variare anche notevolmente a seconda della natura del tiolo passivante e delle dimensioni dell'aggregato stesso^[6].

L'analisi DLS è stata condotta in diverse condizioni al fine di accertare la stabilità del sistema. In prima istanza si è scelto di stabilire come riferimento per la stabilità del sistema l'analisi del campione a pH nettamente acido (pH 3.0), in cui le ammine dell'anello macrociclico risultino protonate. Tale accorgimento garantisce una netta carica positiva al monostrato in grado di impedire l'aggregazione di nanoparticelle e incrementare la stabilità del sistema nel solvente.

L'analisi DLS effettuata a pH 3.0 è riportata in Fig. 4.3.

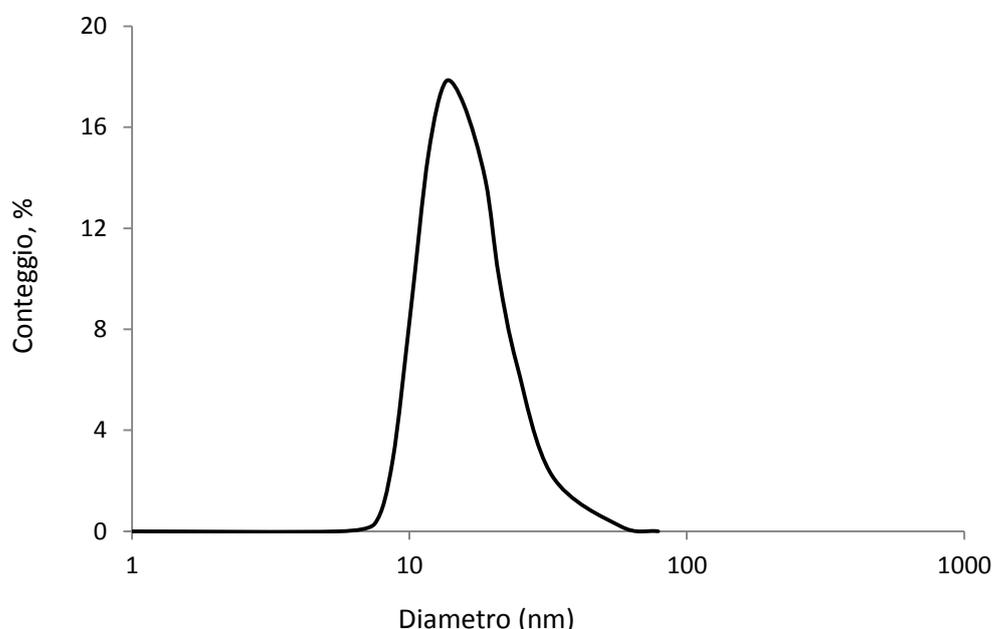


Fig. 4.3: Analisi DLS di Au NPs C9TACN 13 nm, pH 3.0, 25°C.

Il sistema si dimostra ben monodisperso, con la popolazione più rappresentata di diametro idrodinamico di 13.5 nm, con una limitata presenza di aggregati rilevanti, permettendo di verificare come la carica superficiale del sistema renda la dispersione più stabile. Il valore è in buon accordo con quanto osservato tramite microscopia nei limiti strumentali.

Lo stesso esperimento viene effettuato a pH 7.0 al fine di osservare la stabilità del sistema a pH neutro (ossia in condizioni tali da permetterne un utilizzo nella catalisi di HPNP), come riportato in Fig. 4.4:

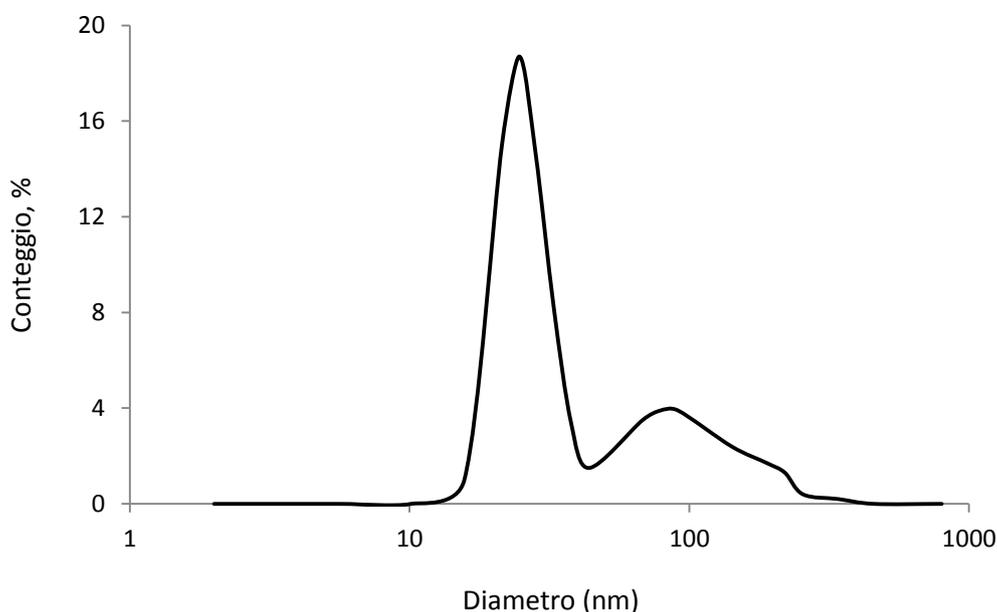


Fig. 4.4: Analisi DLS di Au NPs C9TACN 13 nm, HEPES 10 mM pH 7.0, 25°C.

L'analisi rivela come lo stesso sistema, se posto in ambiente neutro, dimostri una diversa distribuzione dei volumi idrodinamici diversa rispetto all'esperimento precedente, con segnali che spaziano fino ai 200 nm e il diametro idrodinamico più rappresentato a 24.7 nm. Tale dato indica chiaramente come il sistema sia soggetto ad aggregazione a pH 7.0, probabilmente innescata dalla mancanza di una carica superficiale intrinseca al sistema. Ulteriori valutazioni sulla stabilità del sistema nel tempo, compresi studi in presenza di Zn(II), sono state effettuati mediante studio dell'assorbimento delle nanoparticelle attraverso spettrofotometria.

4.2.3 Assorbimento di Au NPs C9TACN 13 nm e stabilità a condizioni operative catalitiche

La determinazione dell'assorbimento della soluzione di nanoparticelle è stata utilizzata in sinergia con l'analisi DLS per avere indicazioni sulla stabilità delle nanoparticelle e per identificare aggregati di grosse dimensioni, specie nelle condizioni di pH e temperatura necessarie per la catalisi. L'accertamento della stabilità del sistema in tali condizioni è

indispensabile per la determinazione della concentrazione di headgroups in soluzione e per ottenere i parametri catalitici in un esperimento a concentrazione di substrato variabile.

In un primo esperimento Au NPs C9TACN sono state studiate per via spettrofotometrica a pH 3.0 e a pH 7.0, focalizzandosi nel secondo caso in presenza e assenza di Zn(II). I risultati sono presentati in Fig. 4.5.

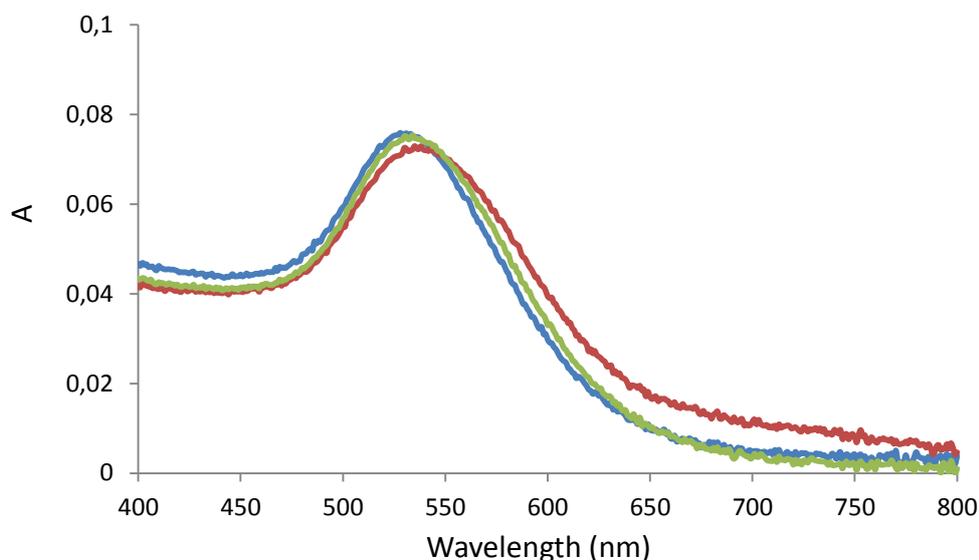


Fig. 4.5: Assorbimento di Au NPs (5 μ L stock solution, [TACN]= 35 μ M) nella regione del visibile: linea blu pH 3.0, linea rossa HEPES 10 mM pH 7.0, linea verde HEPES 10 mM pH 7.0 in presenza di 20 μ M di Zn(II), 25°C.

Come si può osservare dall'andamento dell'assorbimento dei tre diversi campioni l'assorbimento delle nanoparticelle subisce uno shift della banda plasmonica di superficie che segnala aggregazione del sistema a pH neutro. Tale dato avvalorava ciò che si era osservato nell'esperimento di Dynamic Light Scattering, inducendo a riflettere sulla effettiva stabilità del sistema a pH neutro. È rilevante notare come l'aggiunta di 20 μ M di Zn(II) al sistema permetta di ritornare ad un assorbimento di massimo per la banda plasmonica di superficie a 530 nm, evidenziando come l'aggregazione del sistema a pH neutro sia quasi del tutto reversibile con la formazione del complesso TACN-Zn(II) sulla superficie delle nanoparticelle, in grado di promuovere la solubilità della nanoparticella e minimizzarne l'interazione con altre nanoparticelle.

Ad ulteriore conferma di questa osservazione è stata testata la stabilità del sistema in condizioni utili per testarne l'attività catalitica (pH 7.0, 40°C) in presenza ed in assenza di Zn(II) per valutare l'aggregazione del nanosistema ad alte temperature.

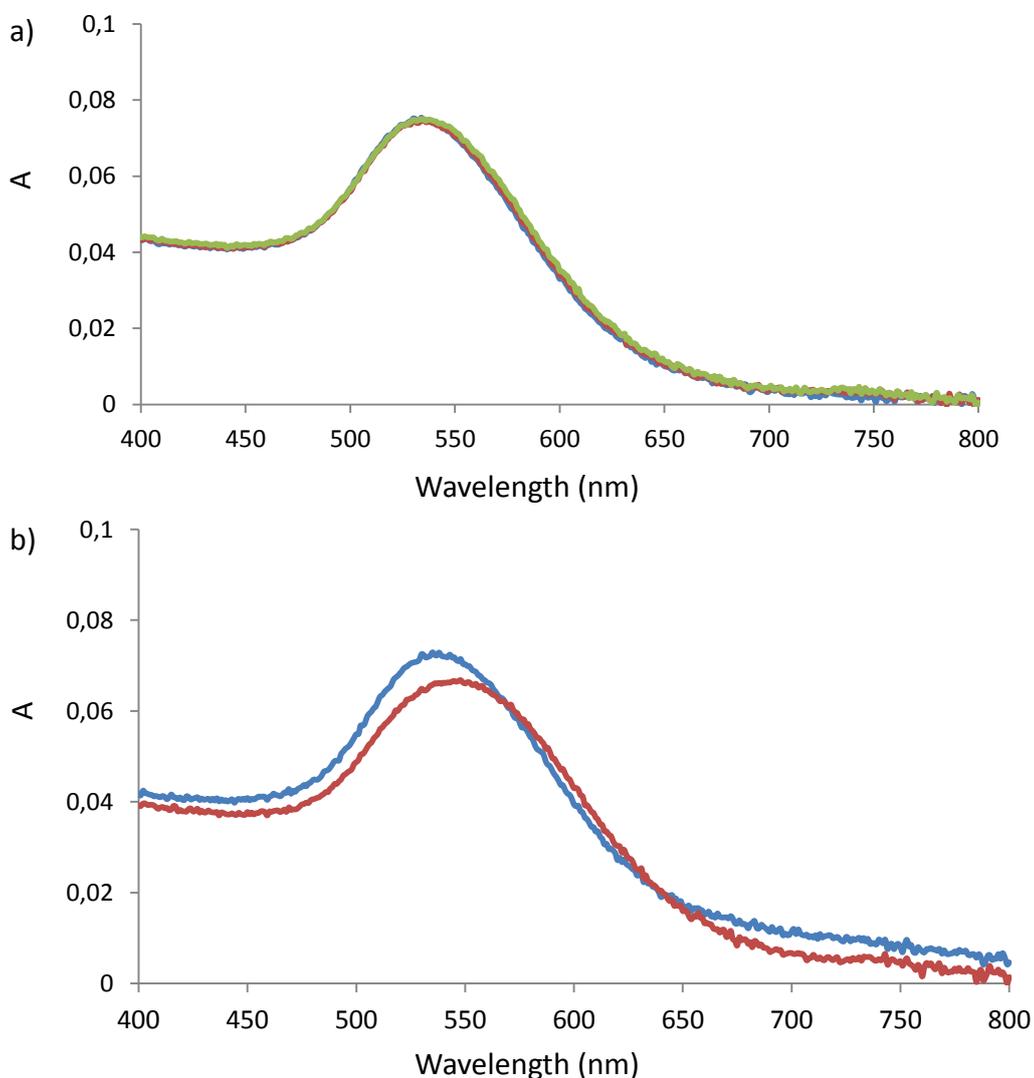


Fig. 4.6: a) Assorbimento di Au NPs C9TACN 13 nm (5 μ L stock solution, [TACN]= 35 μ M) nella regione del visibile: linea blu 0 s, linea rossa 600 s, linea verde 3600 s, HEPES 10 mM pH 7.0 in presenza di 20 μ M di Zn(II), 40°C. b) Assorbimento di Au NPs C9TACN 13 nm nella regione del visibile: linea blu a 0 min, linea rossa 3600 s, HEPES 10 mM pH 7.0, 40°C.

Come si può osservare nell'arco di 3600 s il sistema opportunamente addizionato di Zn(II) non è soggetto ad aggregazione apprezzabile anche a 40°C, mentre l'assenza di catione metallico comporta problemi nella stabilità del sistema, determinando sia diminuzione nell'assorbimento della banda plasmonica (ascrivibile a eventi di precipitazione del metallo in seguito ad aggregazione estesa) che lo spostamento di 10

nm della stessa a lunghezze d'onda maggiori (implicante formazione di aggregati di dimensioni maggiori).

4.2.4 Determinazione qualitativa del campione

L'impossibilità di accertare la natura qualitativa del campione con $^1\text{H-NMR}$ rende la caratterizzazione qualitativa del sistema più impegnativa, limitando di molto l'accertamento della presenza di eventuali impurezze presente nel campione in seguito al work-up di Au NPs C9TACN 13 nm. Per determinare la natura del monostrato si è dovuto ricorrere a spettroscopia FT-IR su pastiglia di KBr.

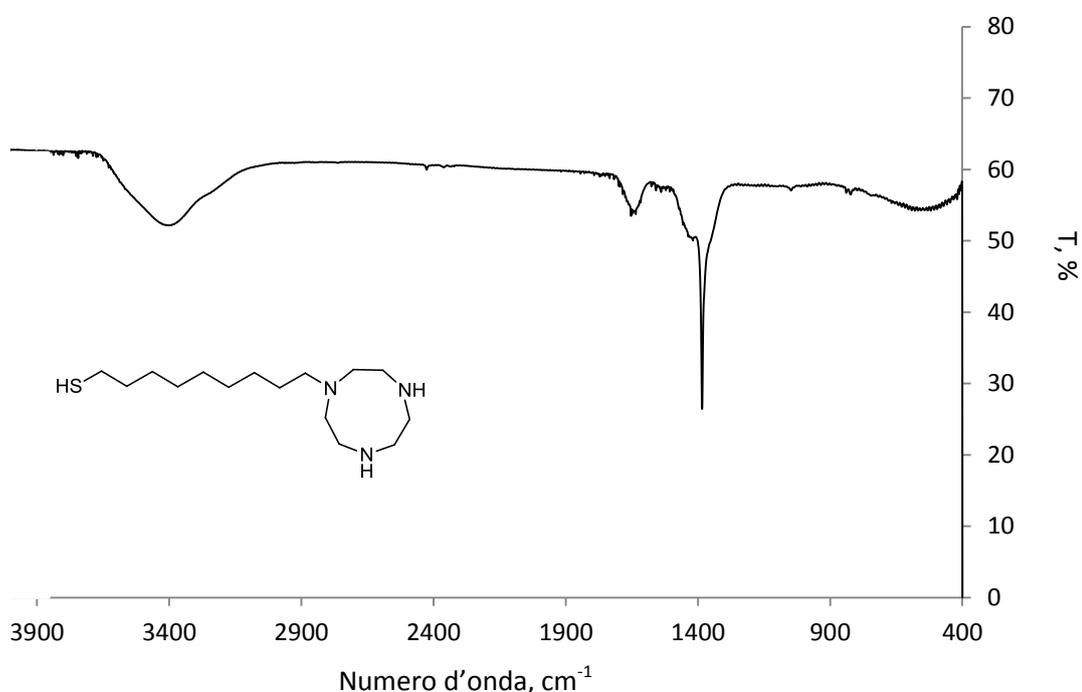


Fig. 4.7: Spettro FT-IR di Au NPs C9TACN 13 nm, pastiglia di KBr.

Lo spettro FT-IR di Au NPs C9TACN 13 nm permette di escludere la presenza di citrato in soluzione in quantità rilevabili, seppur non in maniera incontrovertibile. Nonostante l'attribuzione dei picchi (*Cfr. Parte Sperimentale*) possa essere ritenuta affidabile, l'interpretazione del picco a 1650 cm^{-1} è controversa, aprendo alla possibilità di una presenza residua di citrato sulle nanoparticelle dopo purificazione. La presenza dell'anione potrebbe compromettere i dati ottenuti da catalisi (nello specifico, il valore

di K_M del sistema), in quanto è noto^[7] come l'inibizione del sistema catalitico per la transfosforilazione di HPNP possa essere mediata da carbossilati.

La purezza del campione è ulteriormente accertata mediante analisi termogravimetrica, presentata in Fig. 4.8.

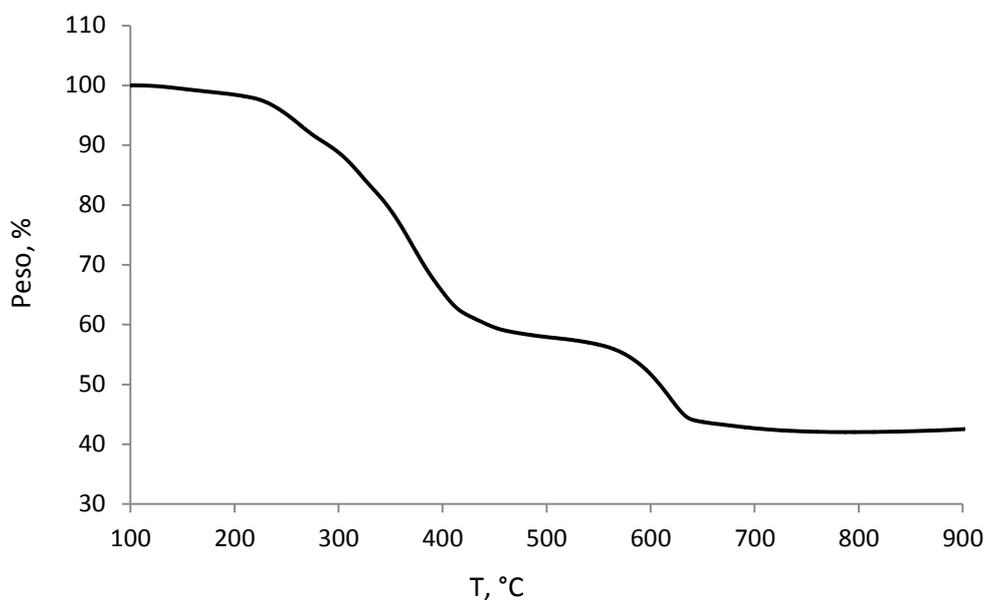


Fig. 4.8: Analisi termogravimetrica di Au NPs C9TACN 13 nm (rampa a 1000°C, 10°C/min, aria).

Come si può osservare, la percentuale di parte organica nel sistema è molto alta, attestandosi al 57%. Una percentuale così alta di parte organica nel campione non è compatibile con i valori presentati in letteratura per nanoparticelle di dimensioni paragonabili passivate da monostrati composti da alcantioli, ma potrebbe essere spiegabile come contributo di tracce di solvente coadsorbito o impurezze di sodio citrato non individuabili con altre tecniche^[1].

4.2.5 Determinazione della concentrazione di TACN in soluzione

Non potendo ricorrere ad una analisi $^1\text{H-NMR}$ contro uno standard interno, la determinazione della concentrazione di TACN in soluzione diventa più difficoltosa, costringendo a restringere i metodi utilizzati a titolazione di Au NPs C9TACN 13 nm con Zn(II) in presenza di HPNP per osservare il comportamento catalitico del sistema a

diverse concentrazioni di metallo. Il valore ottenuto viene confermato mediante valutazione l'assorbimento del complesso TACN-Cu(II).

In Fig. 4.9 è riportata la titolazione di Au NPs C9TACN 13 nm con Zn(II) in presenza di substrato catalitico confrontato con l'attività catalitica mediata nelle stesse condizioni dalla sola presenza del catione metallico.

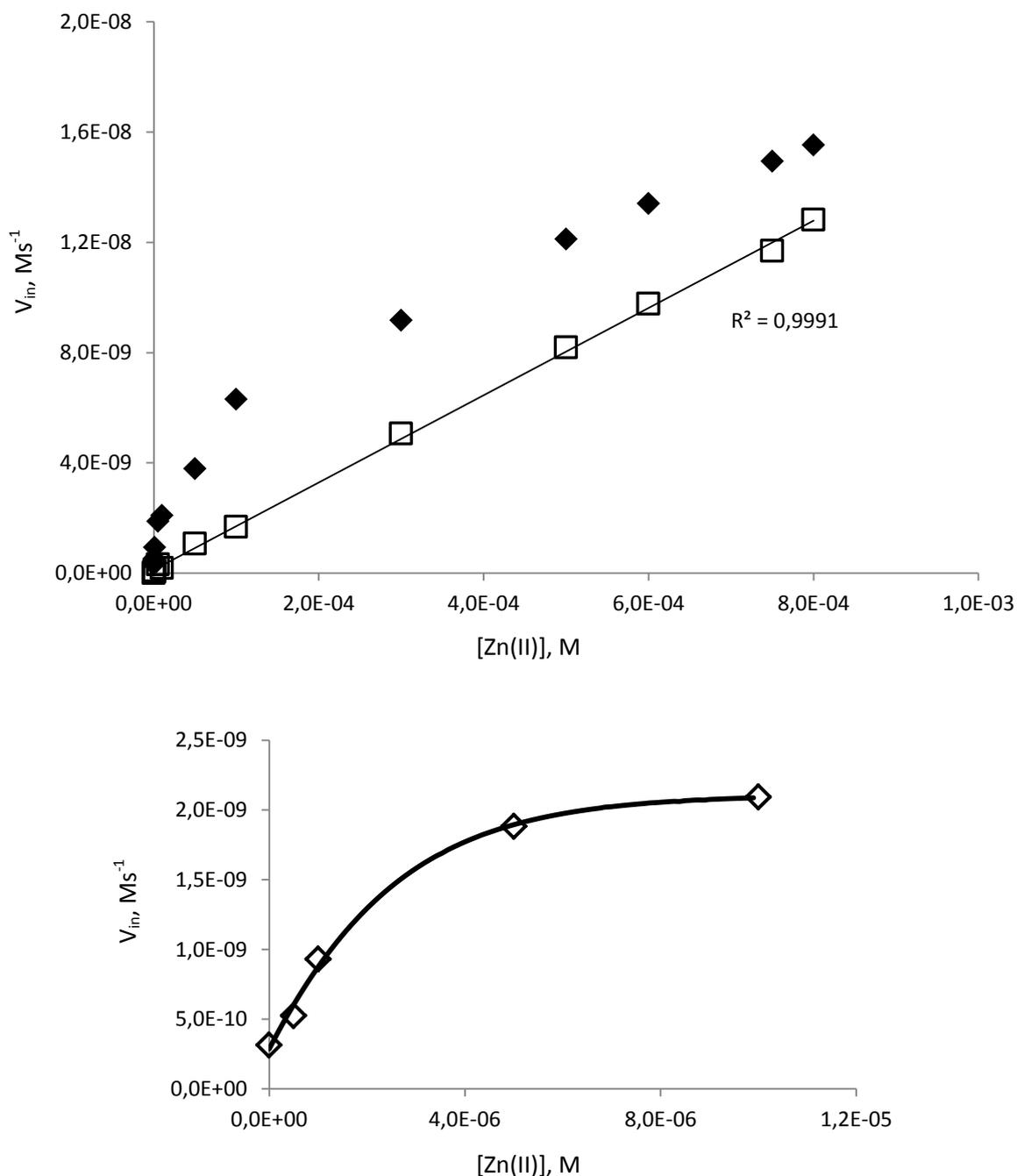


Fig. 4.9: a) Velocità iniziali nella reazione di transfosforilazione di HPNP per Au NPs C9TACN 13 nm al variare della concentrazione di Zn(II) (◆), HEPES 10 mM pH 7.0, $\lambda=400$ nm, $40^{\circ}C$ e velocità iniziali nella stessa reazione per concentrazioni crescenti di Zn(II) non supportato su Au NPs

(□), HEPES 10 mM pH 7.0, $\lambda=400$ nm, 40°C. b) Particolare dell'andamento nei primi punti della titolazione di Au NPs C9TACN 13 nm con Zn(II).

È possibile distinguere come le nanoparticelle d'oro determinino un aumento di attività catalitica rispetto alla reazione di background (seppur ricordando come in questo caso la titolazione sia effettuata su una quantità arbitraria di soluzione di nanoparticelle), presentando il caratteristico profilo evidenziato e discusso nel capitolo precedente. Tale osservazione rende possibile la determinazione dell'onset del plateau relativo al massimo effetto catalitico, raggiunto a saturazione dei macrocicli con il catione metallico e, di conseguenza, la determinazione in ultima istanza della concentrazione di headgroups nella stock solution.

La conferma del dato è stata effettuata mediante titolazione del sistema con aggiunte di Cu(II), osservando l'assorbimento a $\lambda=264$ nm del complesso TACN-Cu(II). Per la misura ci si basa sulla concentrazione nominale della stock solution ottenuta dall'esperimento precedente (Fig. 4.10).

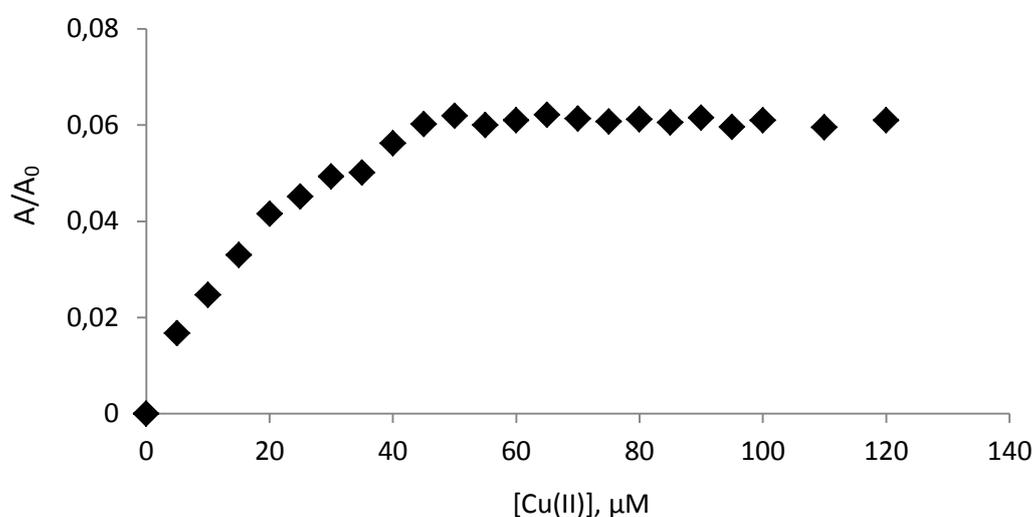


Fig. 4.10: Assorbimento del complesso TACN-Cu(II) per concentrazioni crescenti di Cu(II) per Au NPs C9TACN 13 nm. $[\text{TACN}]_{\text{tit}}=50 \mu\text{M}$, MES 10 mM pH 6.5, $\lambda=264$ nm, 25°C.

La titolazione permette di identificare l'onset della fase di plateau corrispondente alla saturazione degli headgroups con Cu(II) intorno ai 50 μM , compatibilmente con le limitazioni intrinseche del metodo. La buona corrispondenza tra la titolazione con Zn(II) per catalisi e la titolazione con Cu(II) suggerisce come la determinazione della

concentrazione di head groups in soluzione sia, seppure nei limiti dei metodi utilizzati, precisa.

4.3 Cinetica a concentrazione di substrato variabile

Il comportamento catalitico del sistema sintetizzato è stato studiato tramite cinetica in presenza di concentrazioni di substrato crescenti (*Cfr. Sez. 2.6*), valutando l'attività catalitica mediante determinazione dei parametri di k_{cat} e K_M che descrivono un sistema interpolabile con equazione di Michaelis-Menten.

I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 4.11:

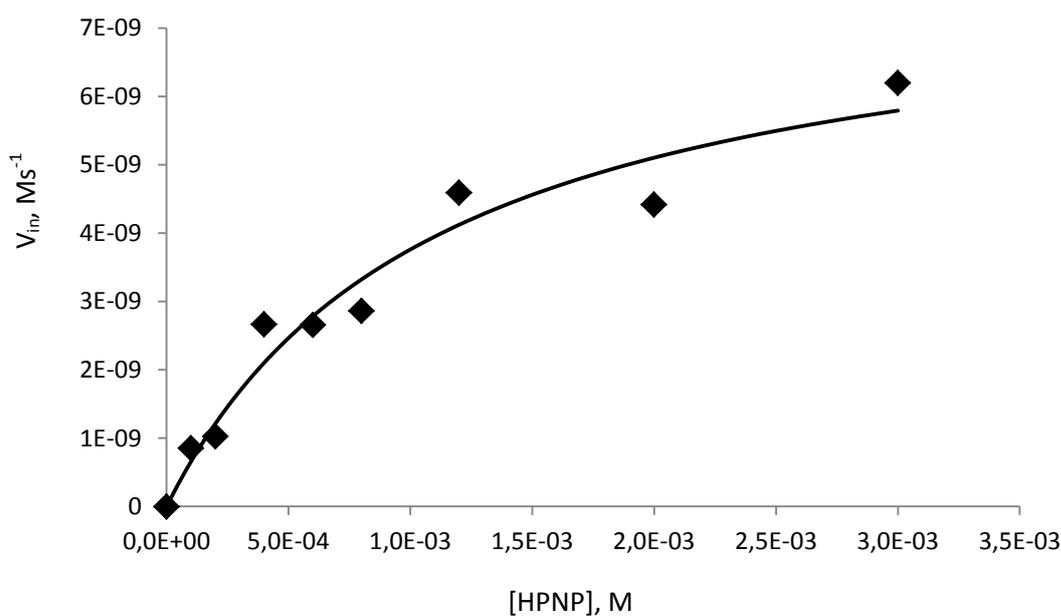


Fig. 4.11: Velocità iniziali della reazione di transfosforilazione di HPNP a concentrazione variabile di substrato per Au NPs C9TACN 13 nm. [TACN-Zn(II)] = 20 μ M, HEPES 10 mM pH 7.5, λ =400 nm, 40°C.

Si può osservare come, nonostante l'attività catalitica sia limitata, il sistema si comporta in accordo con l'equazione di Michaelis-Menten, permettendo interpolazione dei punti.

I parametri cinetici sono stati calcolati e presentati in Tab. 4.1 in confronto con quelli ottenuti per il sistema analogo supportato su nanoparticelle con diametro di 2 nm.

Campione	k_{cat}, s^{-1}	K_M, M	k_{cat}/K_M
Au NPs C9TACN 2 nm	$5.7 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	$4.1 \pm 0.4 \times 10^{-4}$	13.9 ± 1.2
Au NPs C9TACN 13 nm	$3.9 \pm 0.4 \times 10^{-4}$	$1.1 \pm 0.3 \times 10^{-3}$	0.4 ± 0.1

Tab. 4.1: Parametri ricavati dal fitting dei punti sperimentali interpolati mediante equazione di Michalis-Menten.

Lo studio dei parametri evidenzia come il nanosistema sintetizzato sia un catalizzatore peggiore rispetto all'analogo basato sul tiolo C9TACN, presentato nel capitolo precedente. Mentre è stato provato come la presenza di Ca(II) residuo in soluzione abbia un effetto marginale sulla catalisi mediata da TACN-Zn(II) (*Cfr. Parte Sperimentale*), è necessario ricordare che la caratterizzazione non ha escluso incontrovertibilmente la presenza di sodio citrato in soluzione, fattore che comporterebbe inibizione dell'attività catalitica per ostruzione dei siti catalitici carichi positivamente. In ogni caso tale impurezza interferirebbe unicamente con il valore di K_M , spostando la concentrazione di substrato necessaria ad un 50% di azione catalitica a molarità maggiori, non compromettendo però il valore di k_{cat} osservato. Tale considerazione vale nel caso sia evidente come, nel range considerato, si possa approssimare che il sistema abbia raggiunto saturazione di substrato, passando da un processo di secondo ordine a un processo di primo ordine.

4.4 Conclusioni e prospettive future

Il confronto tra la capacità catalitica dei due sistemi Au NPs C9TACN 13 nm e Au NPs C9TACN (presentata nel capitolo precedente) è significativo.

Nonostante la variazione strutturale non interessi il monostrato organico, ma sia invece puramente a carico dello scaffold inorganico suggerisce un ruolo seppur indiretto, del

nucleo d'oro nell'evento catalitico. È possibile ricondurre tale comportamento alla disposizione peculiare dei tioli in un monostrato realizzato su una nanoparticella dalla curvatura estrema, dove la lunghezza del tiolo è paragonabile al diametro del supporto, e dalla disomogeneità della superficie d'oro dovuta alla presenza di facce piccole rispetto agli spigoli, dovuta al numero ridotto di atomi d'oro componenti il cluster. Tali condizioni potrebbero indurre la formazione di diversi siti catalitici su nanoparticelle piccole con eterogeneità di attività catalitica tra sito e sito, influenzando la k_{cat} del sistema.

Tale riflessione comporta come sia opportuno utilizzare un catalizzatore di dimensioni contenute al di fuori dalla semplice considerazione del rapporto vantaggioso tra superficie e volume for supporto, una scelta motivata a monte dalla formazione di un rapporto reciproco delle singole subunità del monostrato favorevole alla catalisi.

In seconda battuta dalla analisi del campione sintetizzato emergono diversi aspetti che limitano l'eventuale utilizzo di nanoparticelle di 13 nm in campo applicativo. Le limitazioni di caratterizzazione inficiano sia la determinazione qualitativa e, in misura inferiore, la determinazione quantitativa, escludendo l'utilizzo della spettroscopia $^1\text{H-NMR}$. Un altro problema rilevante per l'utilizzo di questo sistema risiede nell'instabilità della sospensione per lunghi periodi di tempo, rendendo difficile la conservazione del campione. Tale problematica è da attribuire ad un concerto di fattori di cui potrebbe essere responsabile principale la modesta polarità del tiolo utilizzato.

4.5 Parte Sperimentale

Per informazioni riguardo reagenti e strumentazioni utilizzate si faccia riferimento alla sezione sperimentale del capitolo precedente. In questa sezione ci si limiterà a descrivere preparazione, purificazione e caratterizzazione di Au NPs C9TACN 13 nm.

4.5.1 Sintesi di Au NPs C9TACN 13 nm

La sintesi del sistema presentato in questo capitolo è stata eseguita in soluzione utilizzando un protocollo descritto in letteratura^[2].

Tutta la vetreria utilizzata viene lavata con acqua regia prima dell'utilizzo, sciacquata con acqua distillata e asciugata accuratamente prima dell'uso .

50 mg di $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sono disciolti in 125 mL di acqua mQ e la soluzione viene scaldata fino a raggiungere una vigorosa ebollizione. Alla soluzione bollente vengono addizionati 12.5 mL di una soluzione 38.8 mM di sodio citrato tribasico: la soluzione vira da un colore debolmente giallo a un rosso borgogna intenso dopo pochi secondi, indicando la formazione dei core d'oro passivati da molecole di citrato. La soluzione è fatta bollire per 10 minuti e poi fatta raffreddare lentamente a temperatura ambiente, risultando in una sospensione stabile.

Il tiolo (deprotetto da tioacetile contestualmente alla sintesi delle nanoparticelle con la procedura descritta nella Sez. 2) è disciolto in 1 mL di acqua mQ e addizionato alla sospensione di nanoparticelle. In seguito all'aggiunta della specie passivante si può osservare formazione di precipitato nero, dovuto a inter-reticolazione tra le nanoparticelle passivate e il citrato in soluzione. Si sottopone il campione, a cui viene addizionato un eccesso di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, a centrifugazione a 3000 rpm con eliminazione del surnatante, procedendo a lavaggi con mQ consecutivi con eliminazione del surnatante in seguito a centrifugazione a 14000 rpm. Ad ogni ciclo di eliminazione del surnatante ed aggiunta di mQ pulita si può osservare un netto viraggio verso il rosso della sospensione, conseguente ad eliminazione del citrato residuo. Il campione è ridotto di volume per evaporazione a pressione ridotta del solvente e flussato attraverso una colonna cromatografica ad esclusione dimensionale Sephadex G-25 con eluente H_2O mQ.

4.5.2 Caratterizzazione di Au NPs C9TACN 13 nm

1. TEM

Il campione è stato analizzato con uno strumento Jeol 300 PXTEM in dotazione al Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova. In seguito sono riportate ulteriori immagini TEM a diversi ingrandimenti rispetto a quelle presentate nella sezione precedente a conferma di monodispersione, uniformità di morfologia e assenza di aggregati.

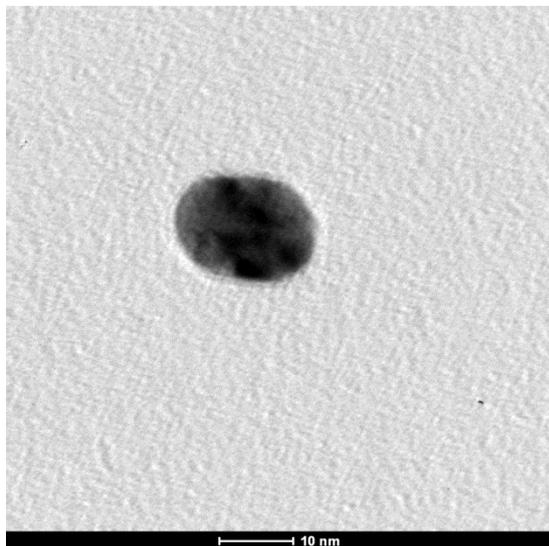
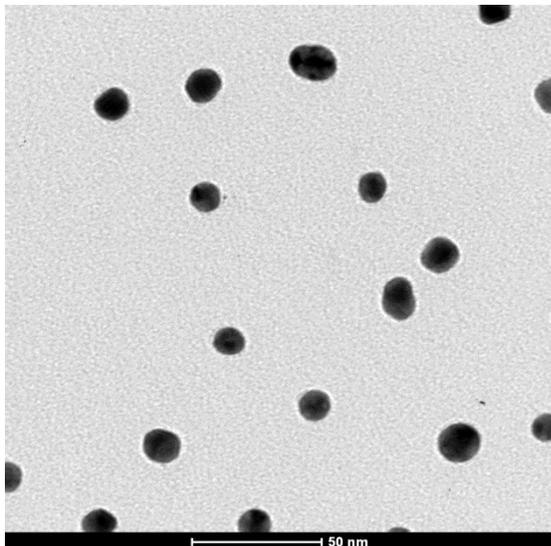
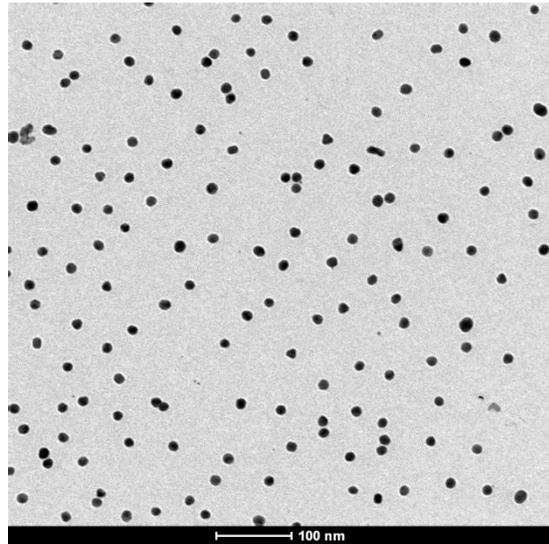
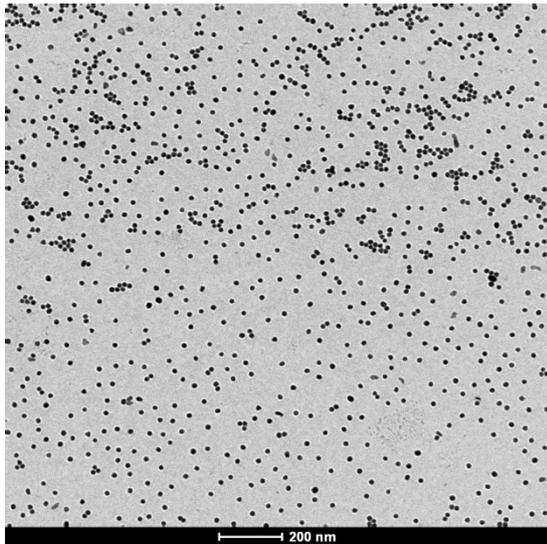


Fig. 4.12: Immagini TEM di Au NPs C9TACN 13 nm a diversi livelli di ingrandimento (come riportato nella barra della scala come riferimento).

La valutazione della distribuzione è stata effettuata su un campione di 50 nanoparticelle misurate con ausilio del software di elaborazione immagini ImageJ.

2. DLS

Tutte le misure di Dynamic Light Scattering sono state effettuate con uno strumento Malvern Nanosizer, utilizzando cuvette usa e getta in PMMA, in acqua mQ a 25°C dopo equilibratura della temperatura per 360 secondi.

3. Spettroscopia UV-Vis

La determinazione dell'assorbimento del campione e i test di stabilità in presenza di $Zn(NO_3)_2$ sono stati effettuati con uno strumento Varian Cary 50, su 5 μ L di stock solution, predisponendo un opportuno bianco per ogni analisi su cui accertare la baseline, mantenendo la temperatura a 25°C. I successivi test di stabilità del sistema in condizioni catalitiche sono stati effettuati su 5 μ L di campione in soluzione HEPES 10 mM pH 7.0 ad una temperatura di 40°C.

4. Spettroscopia FT-IR

Lo spettro IR di Au NPs C9TACN 13 nm è stato effettuato con uno strumento Thermo Nicolet 5700 FT-IR su pastiglia di KBr. Per la preparazione del campione una aliquota di stock solution di Au NPs C9TACN 13 nm è stata portata a secco per evaporazione a pressione ridotta del solvente, risultando in 3 mg di solido. Al residuo sono addizionati 80 mg di KBr e si procede compressazione meccanica per sinterizzazione delle polveri.

Lo spettro ottenuto viene interpretato come segue:

FT-IR: 3700-3000 cm^{-1} : N-H stretch, C-H stretch. ; 1650 cm^{-1} : N-H bend. ; 1450 cm^{-1} : C-N stretch. ; 1380 cm^{-1} : CH_2 bend. ; 530 cm^{-1} : N-H wag.

Dallo spettro ottenuto non emerge presenza univoca rilevante di segnali attribuibili a residui di sodio citrato in soluzione (identificabili come segnali dei gruppi carbossilici O-H stretch. a $3400-2400\text{ cm}^{-1}$, C=O stretch. a $1730-1700\text{ cm}^{-1}$, C-O stretch. $1320-1210\text{ cm}^{-1}$, O-H bend. $1440-1400\text{ cm}^{-1}$).

5. Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica viene sostenuta utilizzando uno strumento TGA 5000 IR TA instruments. Per l'analisi riportata si è utilizzato un pan di platino HT per alte temperature. L'analisi è stata sostenuta impostando per 10 minuti evaporazione del solvente (acqua) a 100°C , imponendo poi una rampa fino a 1000°C a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ utilizzando come gas aria industriale.

6. Determinazione della concentrazione di headgroups

La titolazione con $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ in presenza di HPNP è stata utilizzata come tecnica di elezione per la determinazione della concentrazione di TACN in soluzione a partire da una aliquota arbitraria di stock solution di Au NPs C9TACN 15 nm.

Sono state adottate le seguenti condizioni sperimentali:

- Au NPs C9TACN 13 nm= 5 μL
- [HEPES]=10 mM, pH 7.0
- [HPNP]=2 mM
- [Zn(II)] variabile
- T= 40°C

L'esperimento viene effettuato a 40°C , misurando la velocità iniziale della formazione di p-nitrofenato a $\lambda=400\text{ nm}$ ($\epsilon=8503\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a pH 7.0) conseguente ad idrolisi di HPNP mediata da TACN-Zn(II).

I dati vengono elaborati da intersezione con la retta passante per i punti descritti dalla zona di onset dell'andamento sigmoidale con la retta costruita sui punti che descritti dalla zona andamento proporzionale alla concentrazione di Zn(II), come da figura.

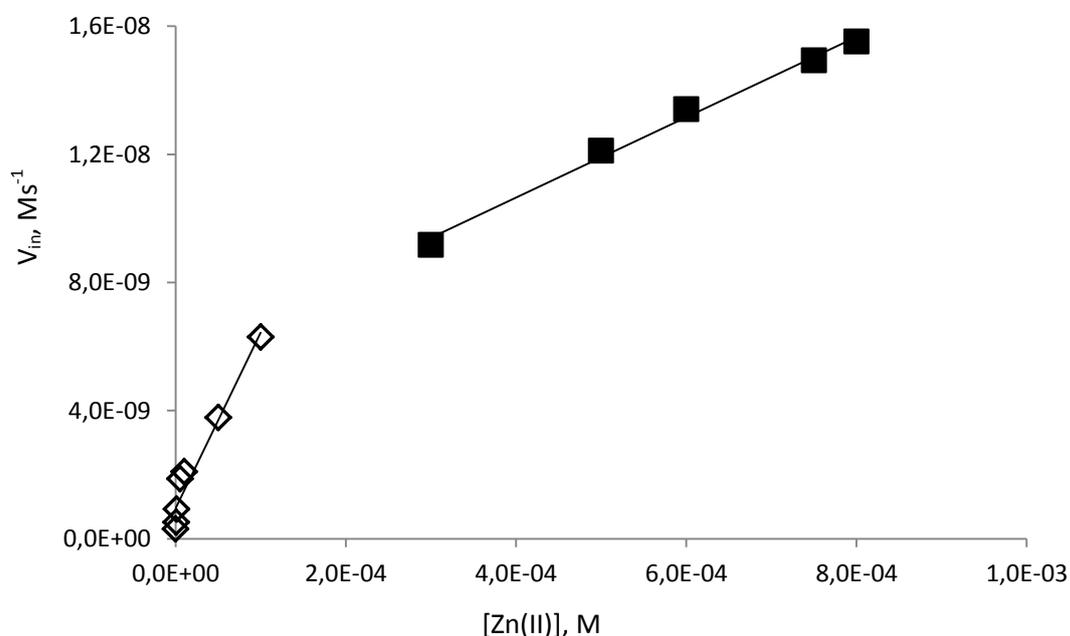


Fig. 4.13: elaborazione dei dati relativi alla titolazione di Au NPs C9TACN 13 nm con $Zn(NO_3)_2$ in presenza di HPNP.

La titolazione diretta con $Cu(NO_3)_2$ è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro Varian Cary 100 a doppio raggio nelle seguenti condizioni sperimentali:

- [TACN]= 50 μM
- [MES]=10 mM, pH 6.5
- [Cu(II)] variabile
- T=25°C

Contestualmente alla cuvetta in cui viene effettuata la titolazione si prepara anche un bianco, preparato nelle stesse condizioni in assenza di nanoparticelle, a cui vengono aggiunte aliquote di acqua mQ corrispondenti alle aggiunte di soluzione di $Cu(NO_3)_2$ effettuate nella cuvetta titolata. L'assorbimento del complesso TACN-Cu(II) viene valutato a $\lambda=264$ nm.

7. Influenza della presenza di Ca(II) sull'attività catalitica

L'effetto della presenza di catione Ca(II) nella catalisi mediata da complessi TACN-Zn(II) sulla superficie di Au NPs viene associato osservando la velocità iniziale di Au NPs C9TACN 2 nm (Cfr. Sez. 2 per sintesi e caratterizzazione del sistema) in presenza di diversi equivalenti di Ca(NO₃)₂ in soluzione rispetto a TACN.

L'esperimento è stata effettuato utilizzando uno spettrofotometro Varian Cary 50 nelle seguenti condizioni sperimentali, osservando l'evoluzione di p-nitrofenato a $\lambda=400$ nm.

- [TACN-Zn(II)]= 20 μ M
- [HEPES]=10 mM, pH 7.0
- [Ca(II)] variabile
- [HPNP]= 1 mM
- T=40°C

I risultati dell'esperimento sono riportati in Tab. 4.2:

Eq. Ca(II) in soluzione rispetto a TACN	V_{in}, M s⁻¹	Diminuzione di V_{in}, %
0	3.2×10^{-8}	-
0.5	3.1×10^{-8}	3.1
1	3.0×10^{-8}	6.3
10	2.9×10^{-8}	9.4
100	2.0×10^{-8}	37.5

Tab. 4.: Velocità iniziali nella reazione di transfosforilazione di HPNP mediata da Au NPs C9TACN 2 nm in funzione del numero di equivalenti di Ca(II) in soluzione.

Come si può osservare la presenza di Ca(II) in soluzione ha effetti importanti sulla catalisi della reazione in oggetto solo se presente in un numero di equivalenti di due ordini di grandezza superiori al numero di equivalenti di TACN, probabilmente imputabile a

variazione della forza ionica della soluzione piuttosto che a un'interazione con i centri catalitici.

8. Valutazione dell'attività catalitica nella transfosforilazione di HPNP

L'attività catalitica viene accertata mediante titolazione a concentrazione variabile di substrato, effettuata utilizzando uno spettrofotometro Varian Cary 50, nelle seguenti condizioni sperimentali:

- [TACN]=20 μ M
- [Zn(NO₃)₂]=20 μ M
- [HEPES]=10 mM pH 7.5
- [HPNP] variabile
- T=40°C

La velocità iniziale della reazione di idrolisi di HPNP è valutata seguendo l'assorbimento a $\lambda=400$ nm del p-nitrofenato ($\epsilon=13135$ M⁻¹cm⁻¹ a pH 7.5).

Il data set di punti sperimentali è stato interpolato con OriginPro 8 utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten,

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

ottenendo la curva di fit e i valori di K_M e V_{MAX} del sistema.

4.6 RIFERIMENTI

- [1]. Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. *Langmuir* **1998**, *14*, 17-30;
- [2]. Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. *Anal.Chem.***1995**, *67*, 735-743;
- [3]. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Disc. Farad. Soc.* **1951**, *11*, 55-75;
- [4]. Lin, S. Y.; Tsai, Y. T.; Chen, C. C.; Lin, C. M.; Chen, C. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2134-2139;
- [5]. Moores, A.; Goettmann, F.; *New J. Chem.*, **2006**, *30*, 1121-1132;
- [6]. Malinsky, M. D.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1471-1482;
- [7]. Bonomi, R.; Cazzolaro, A.; Sansone, A.; Scrimin, P.; Prins, L. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2307.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI ADOTTATE

ACN: acetonitrile

AMP: adenosina-5'-monofosfato

ATP: adenosina-5'-trifosfato

Au NPs: nanoparticelle d'oro

Boc: ter-butilossicarbonile

EP: etere di petrolio

ESI-MS: spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray

EtOAc: acetato di etile

EtOH: etanolo

HEPES: acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-etansolfonico

HPNP: p-nitrofenil-2-idrossipropilfosfato

MANT: gruppo N-metilantirainoilico

MeOH: metanolo

MES: acido 2-(N-morfolino)etansolfonico

NMR: risonanza magnetica nucleare

RT: temperatura ambiente

SAM: self-assembled monolayer

TOABr: tetraottilammonio bromuro

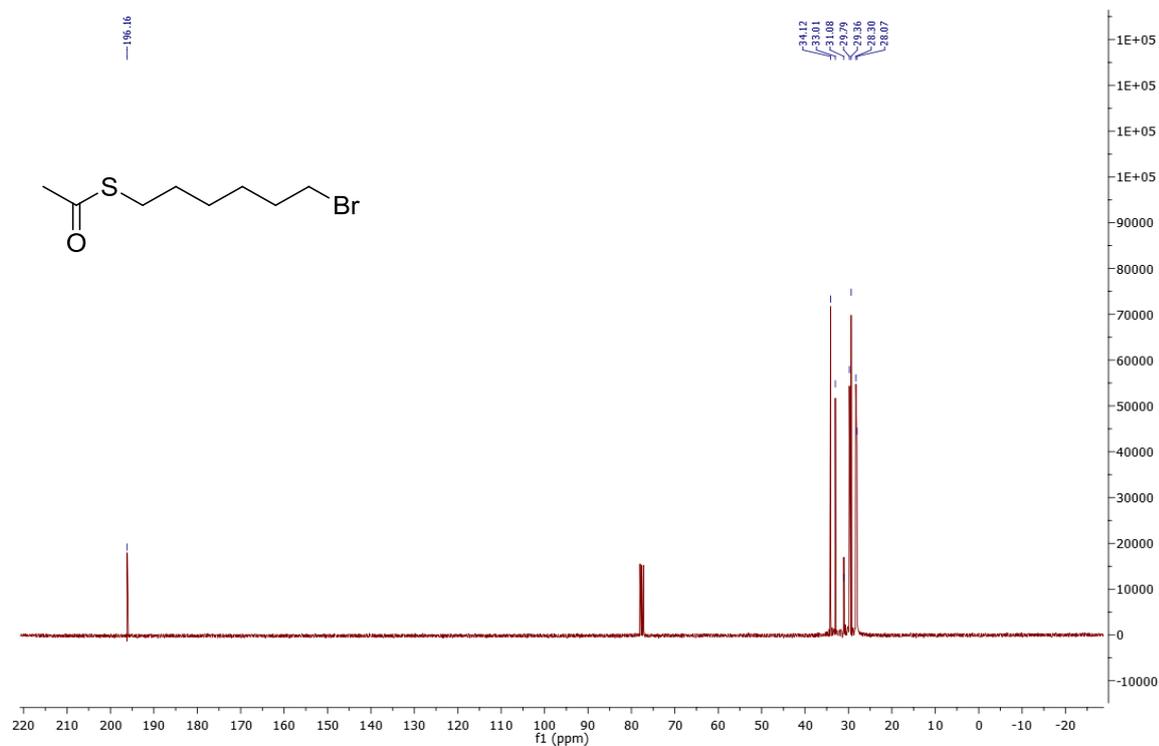
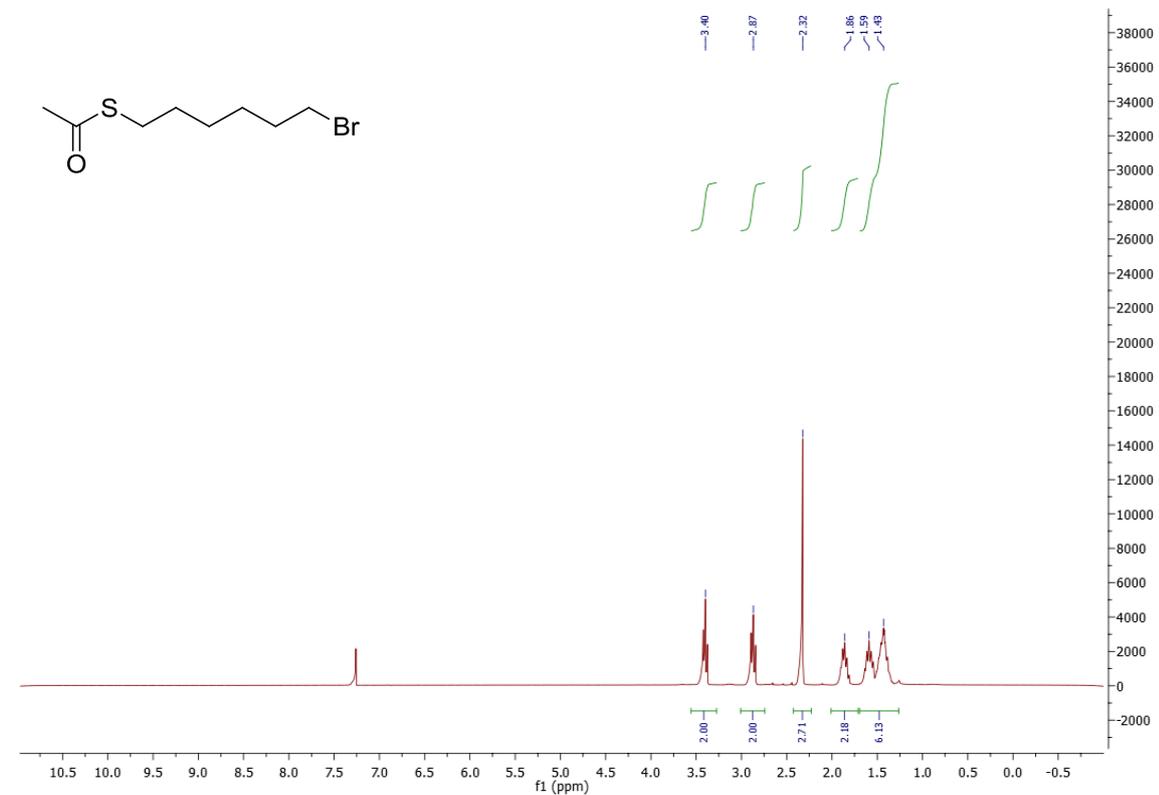
TACN: 1,4,7-triazaciclononano

TLC: cromatografia su strato sottile

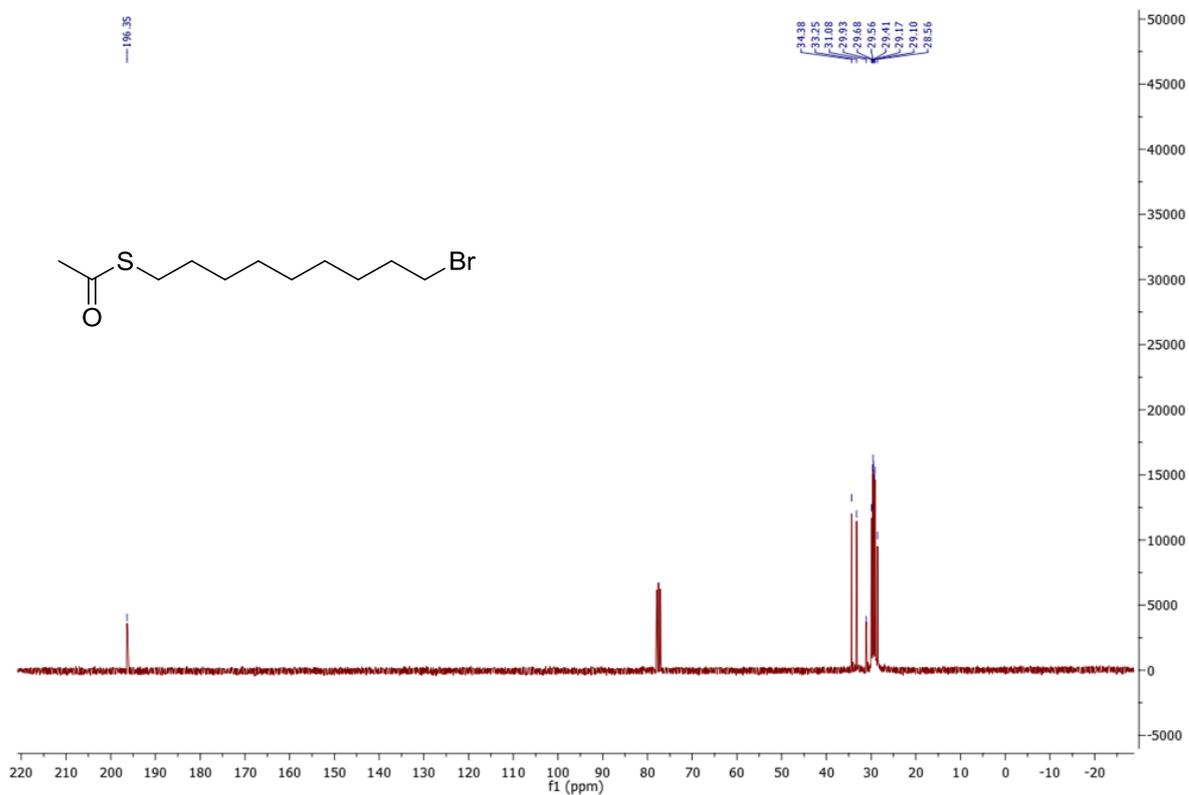
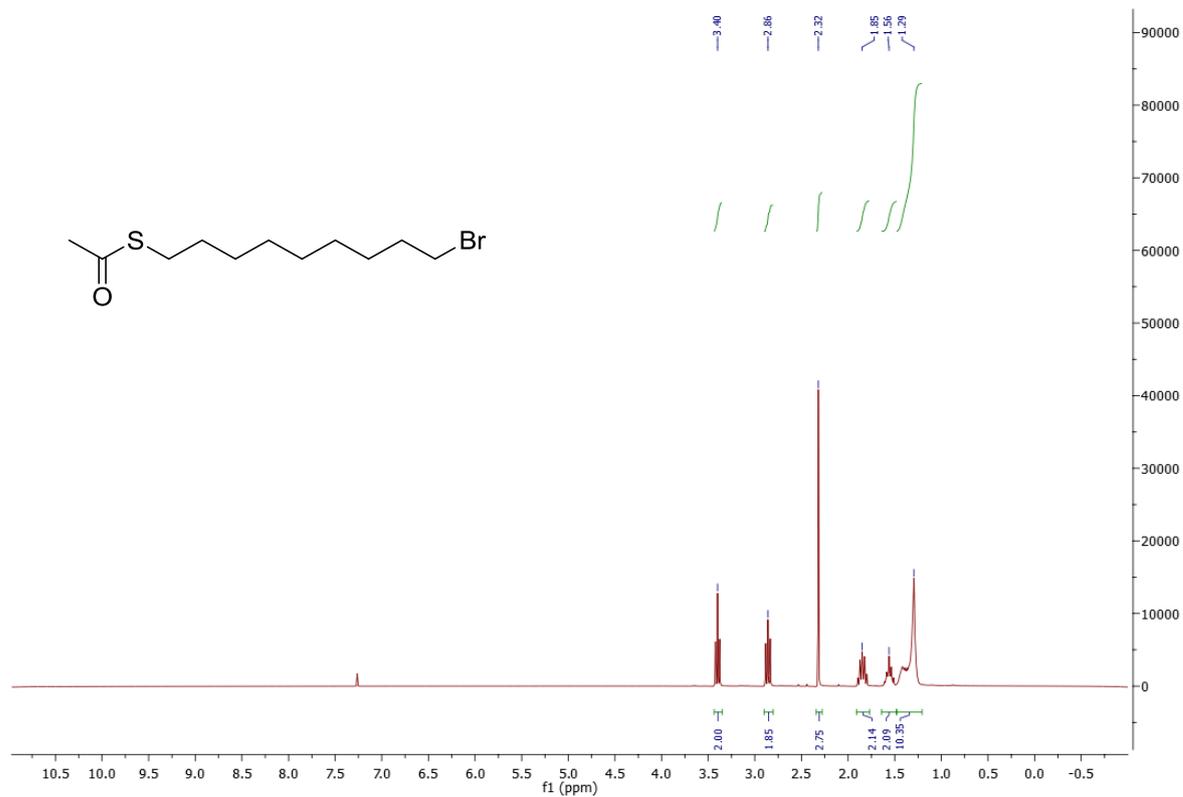
5. APPENDICE

Caratterizzazioni

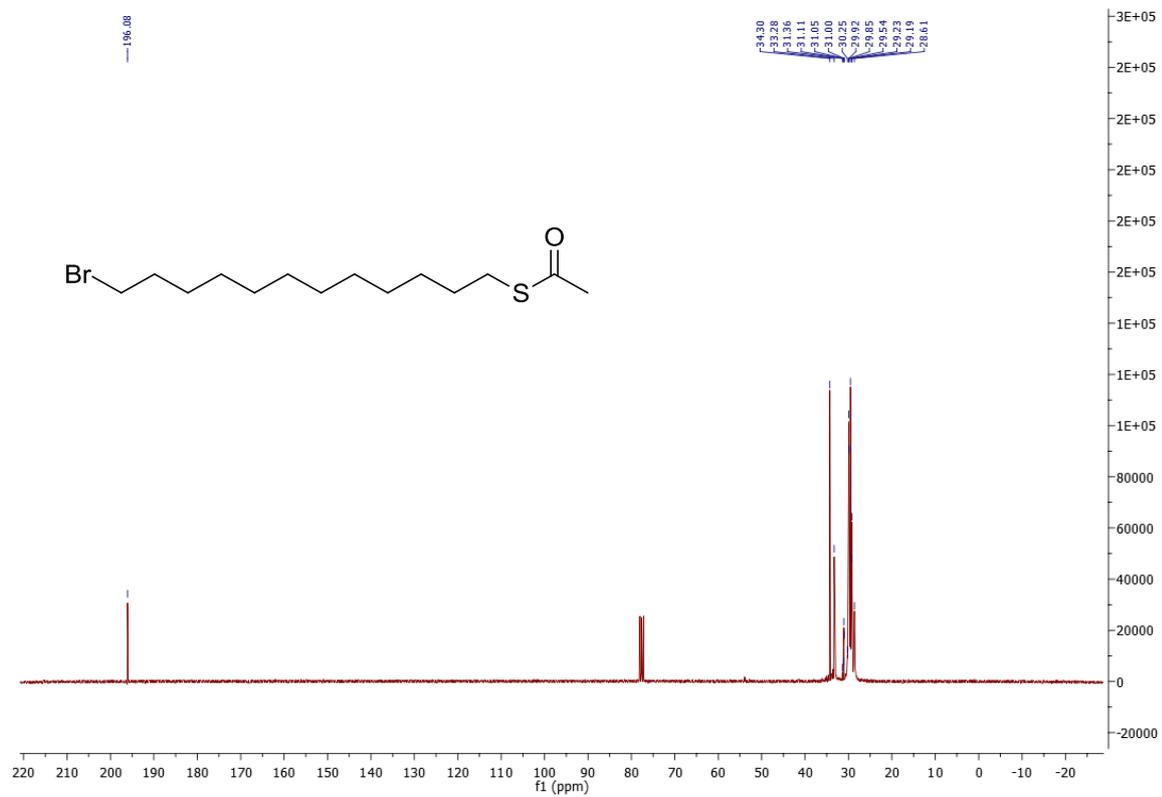
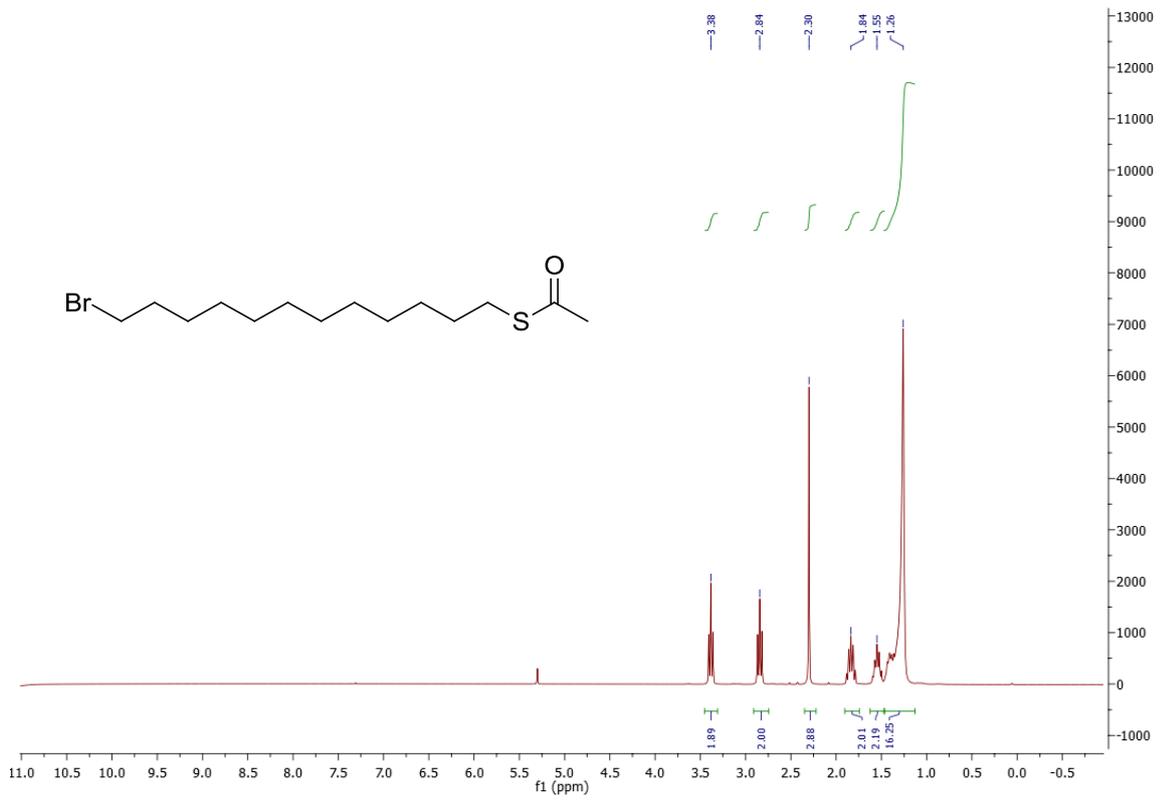
Composto A ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)



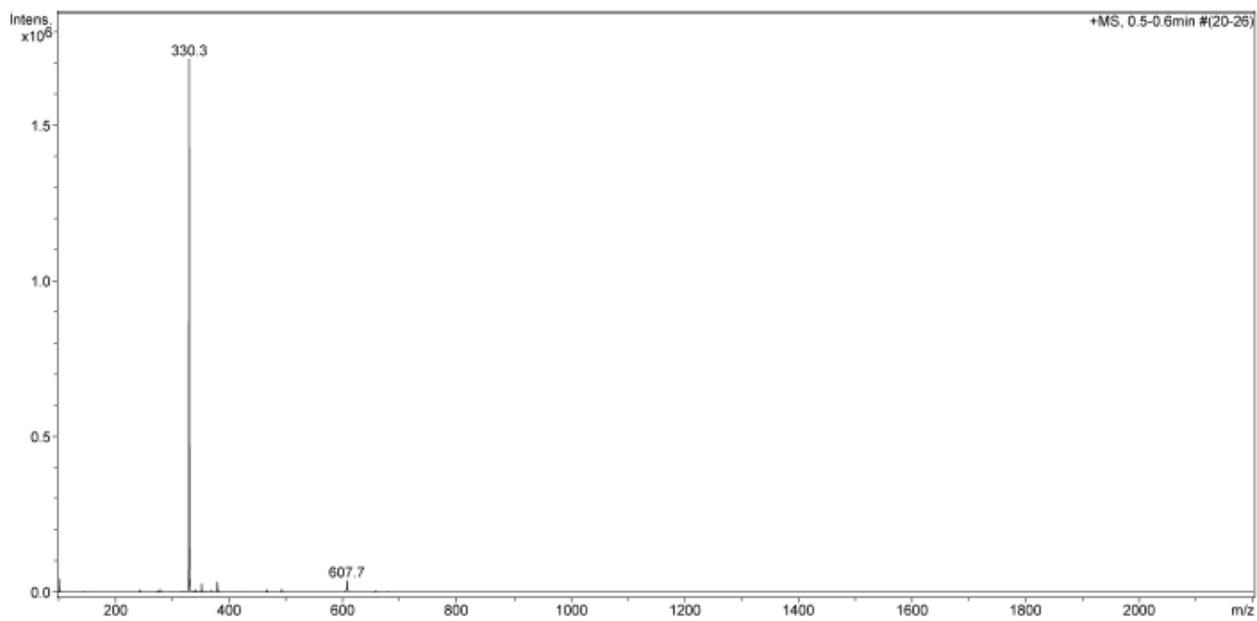
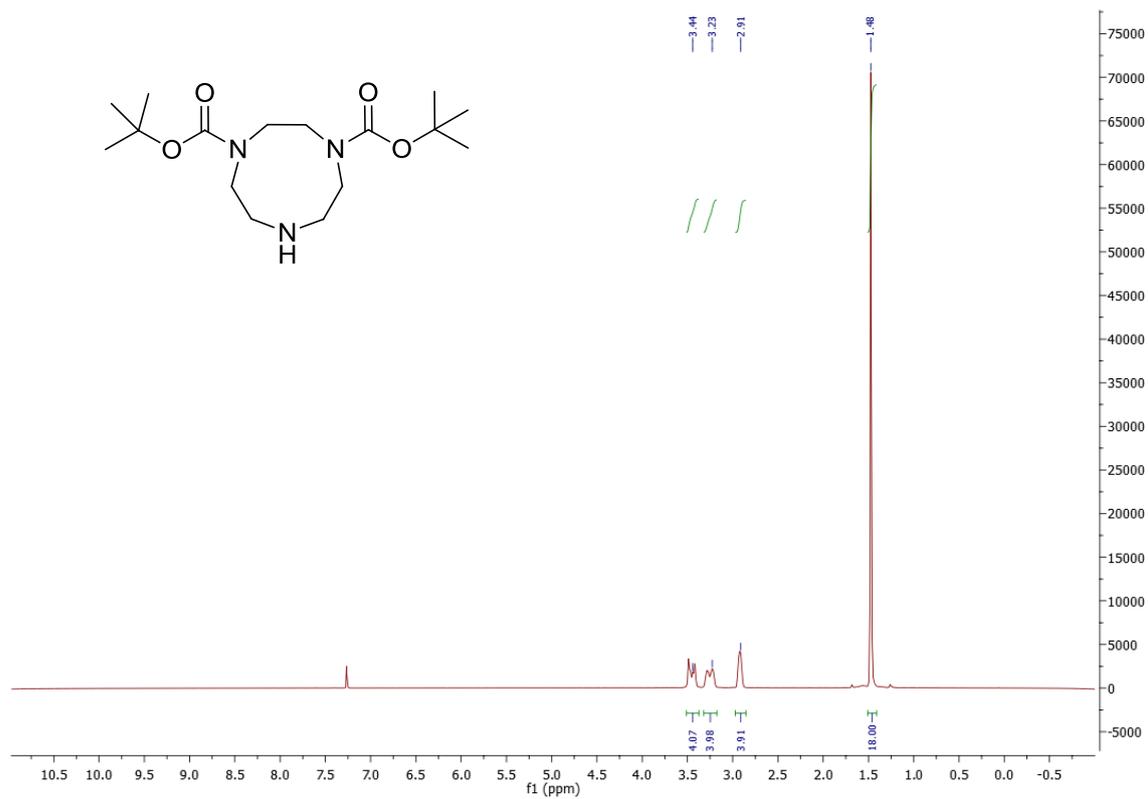
Composto **B** ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)



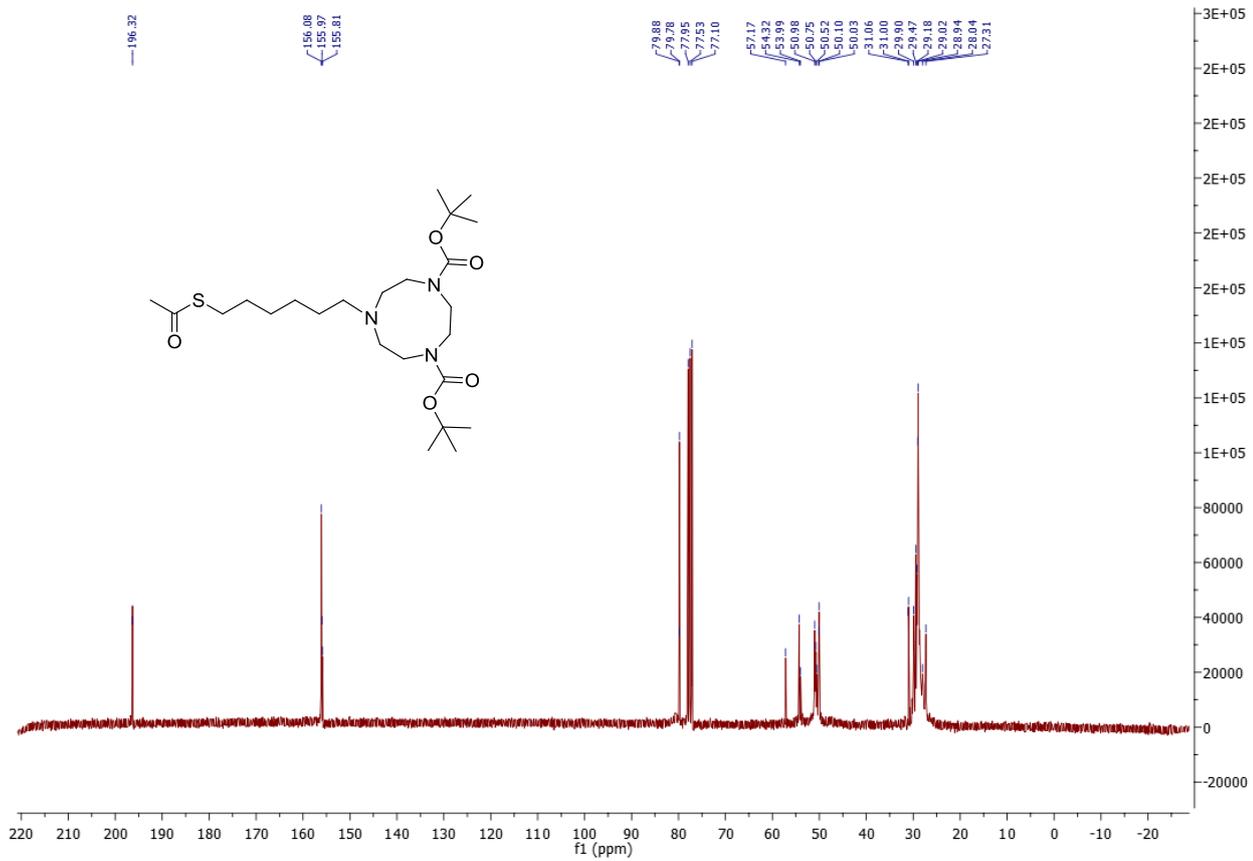
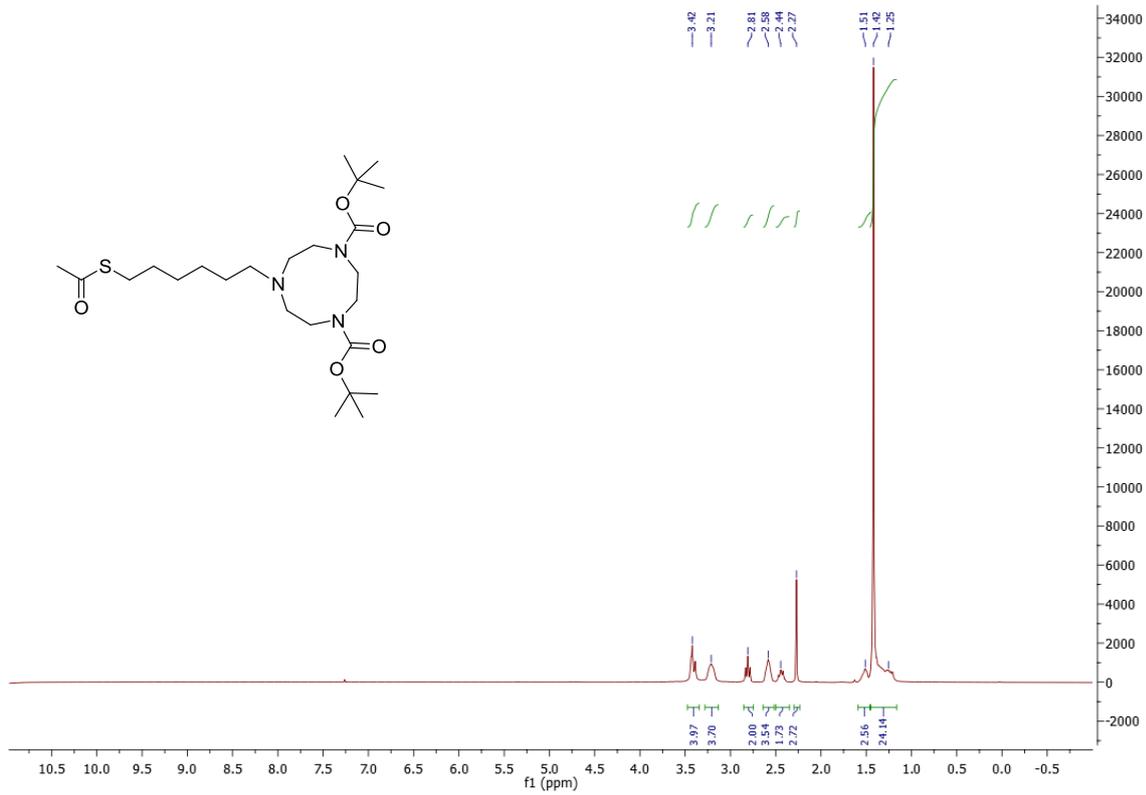
Composto C ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)

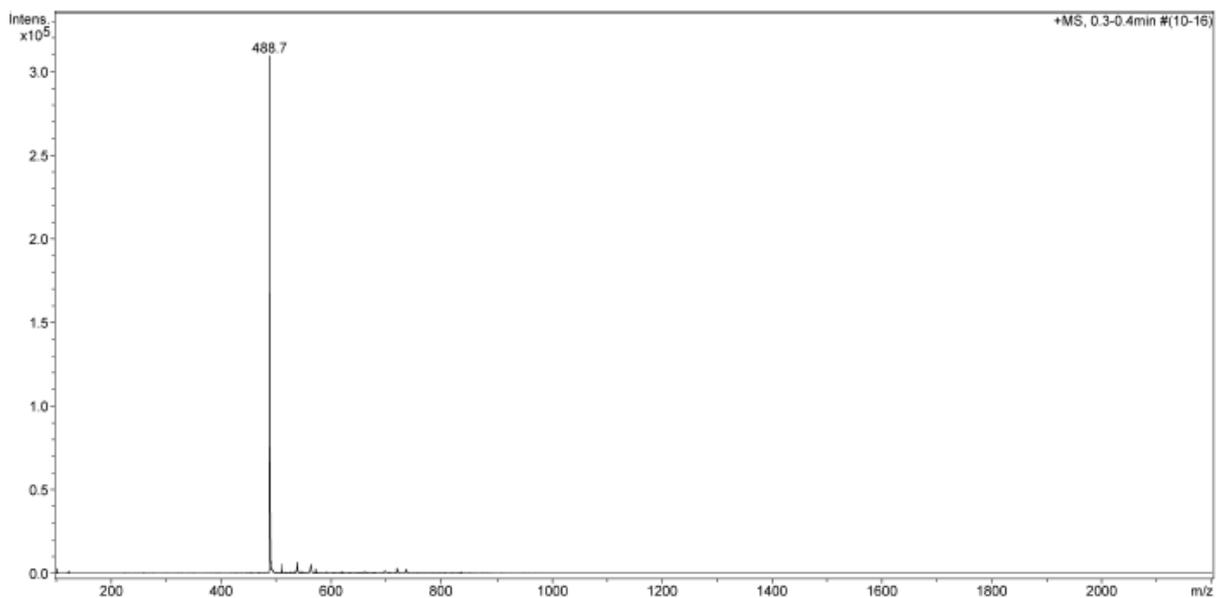


Composto **D** ($^1\text{H-NMR}$, MS)

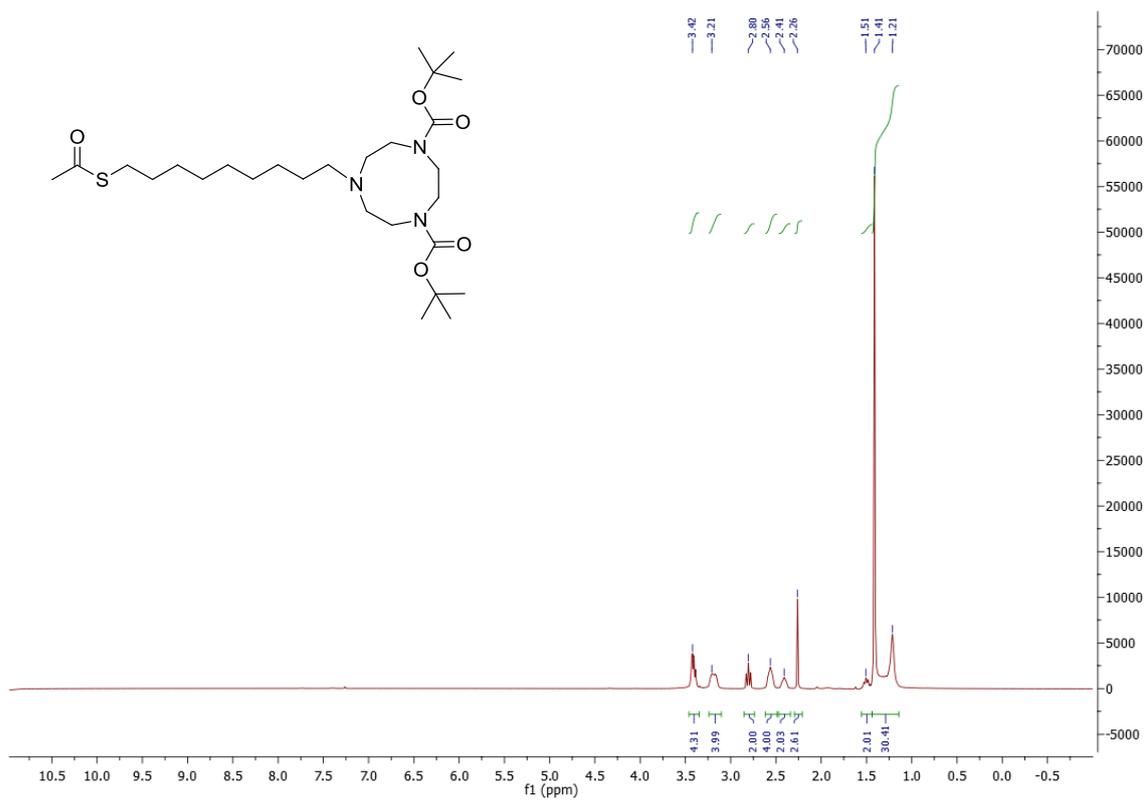


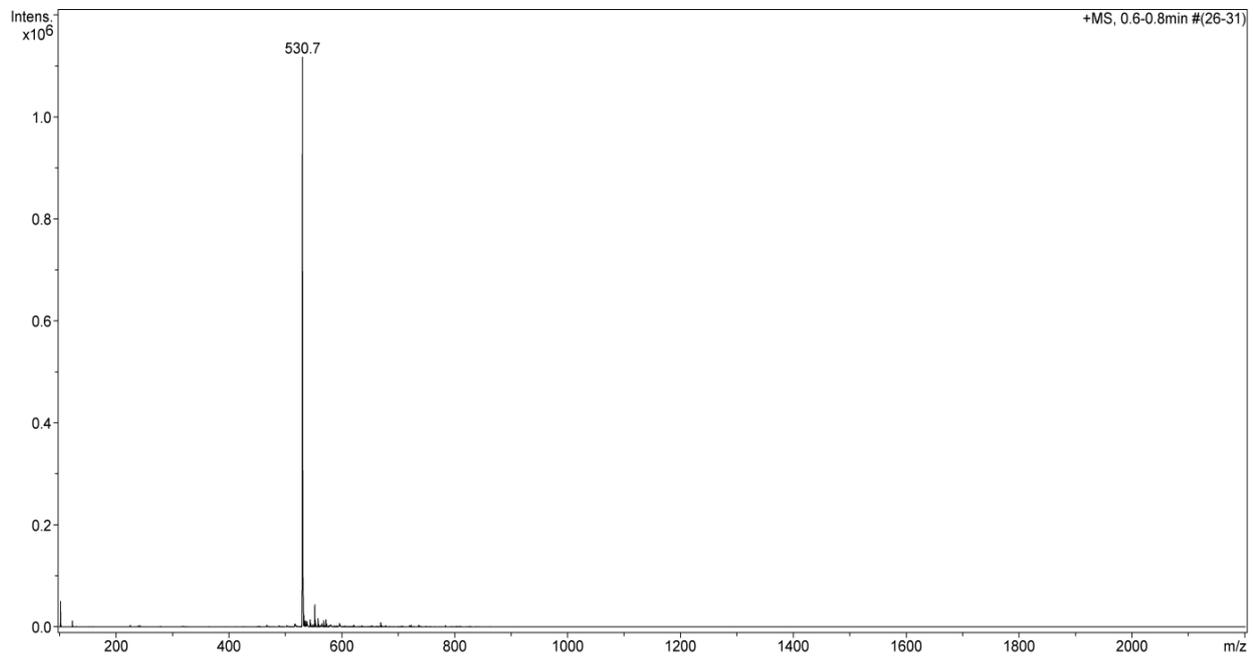
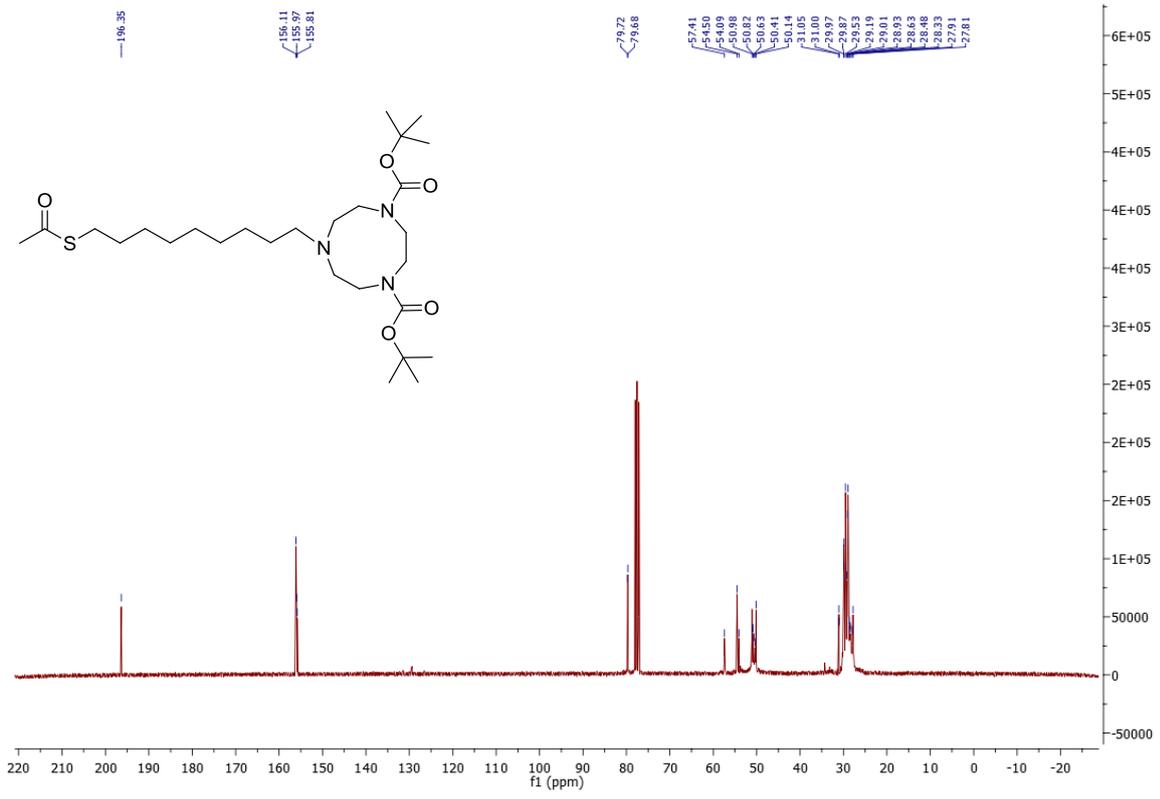
C6TACN protetto (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS)



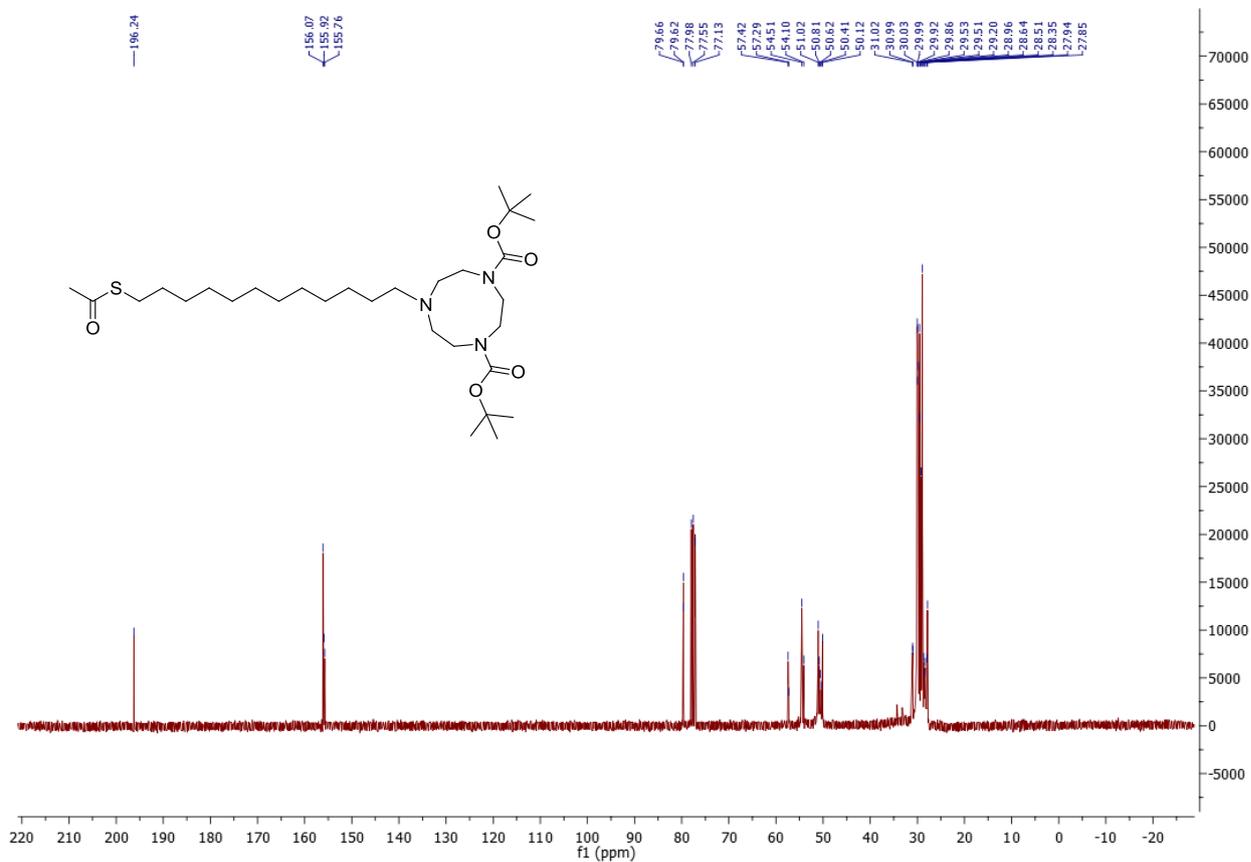
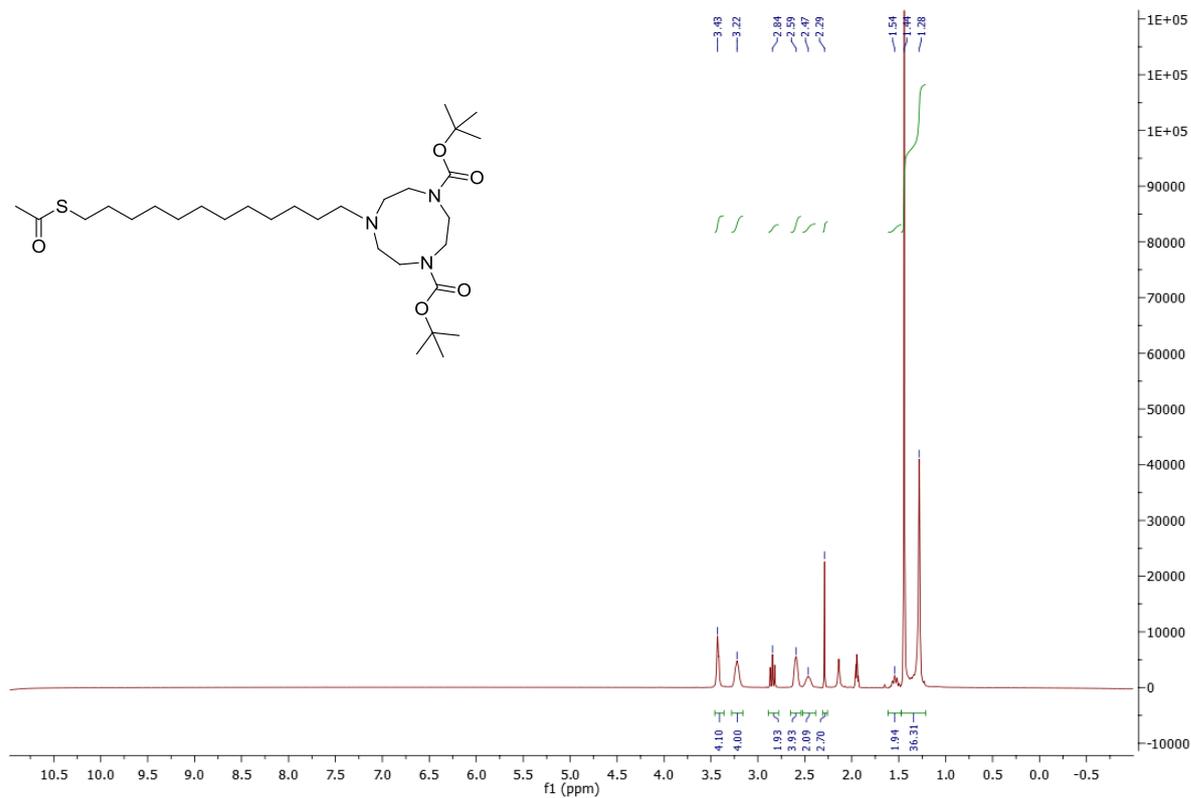


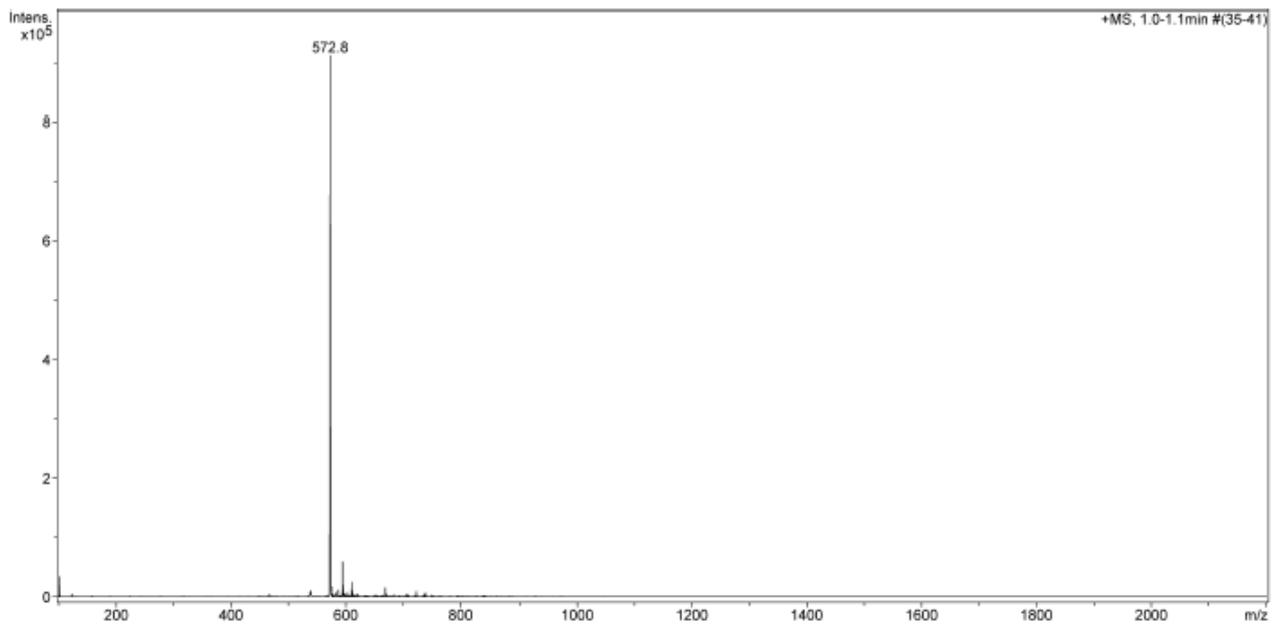
C9TACN protetto (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS)



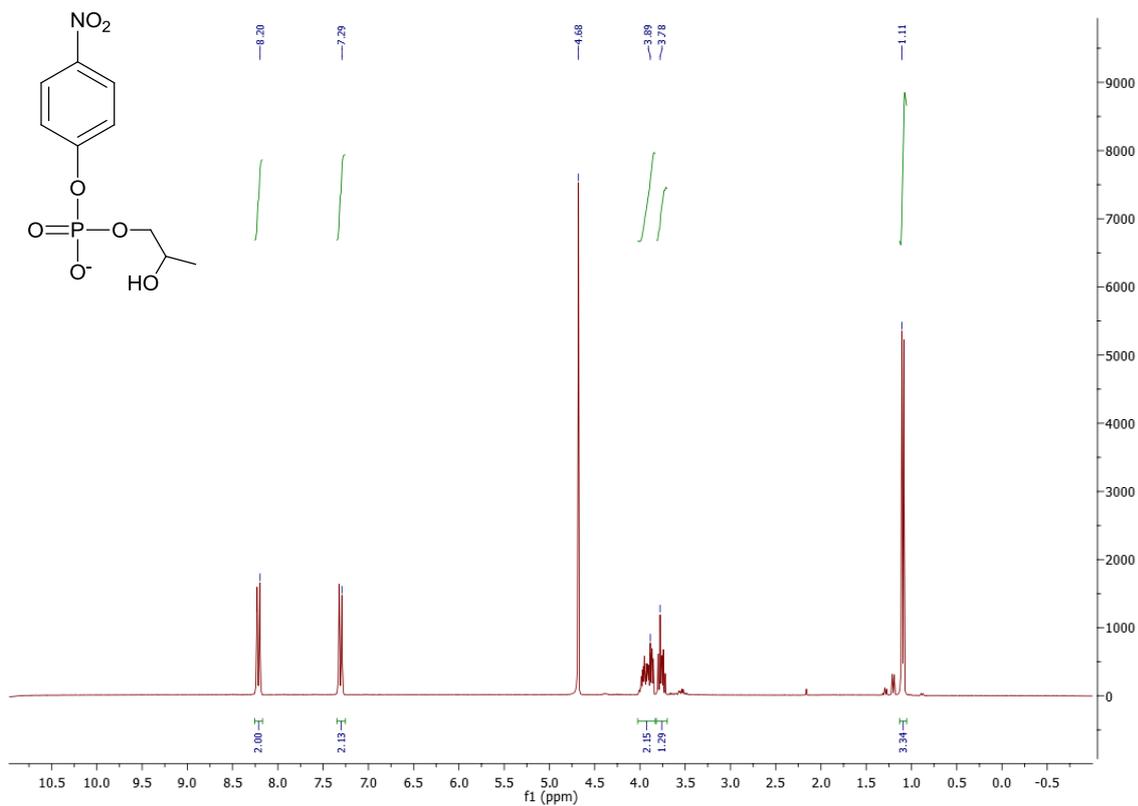


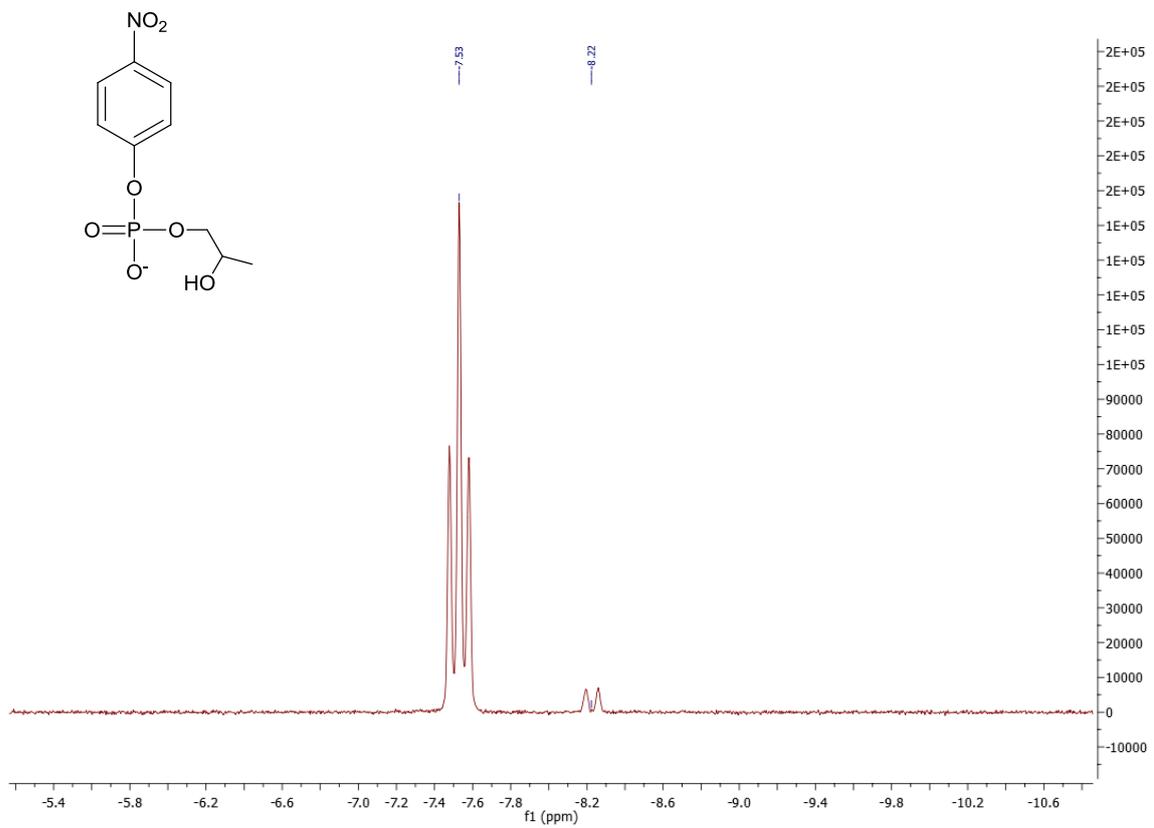
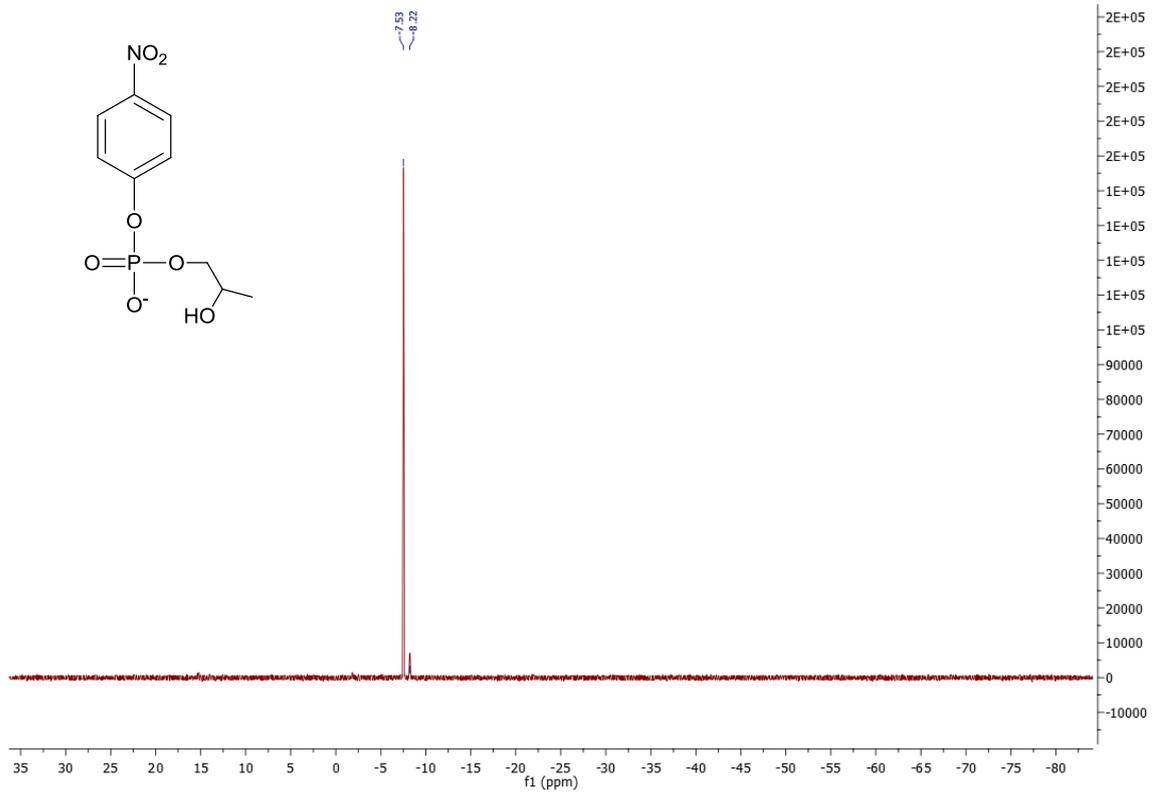
C12TACN protetto (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS)



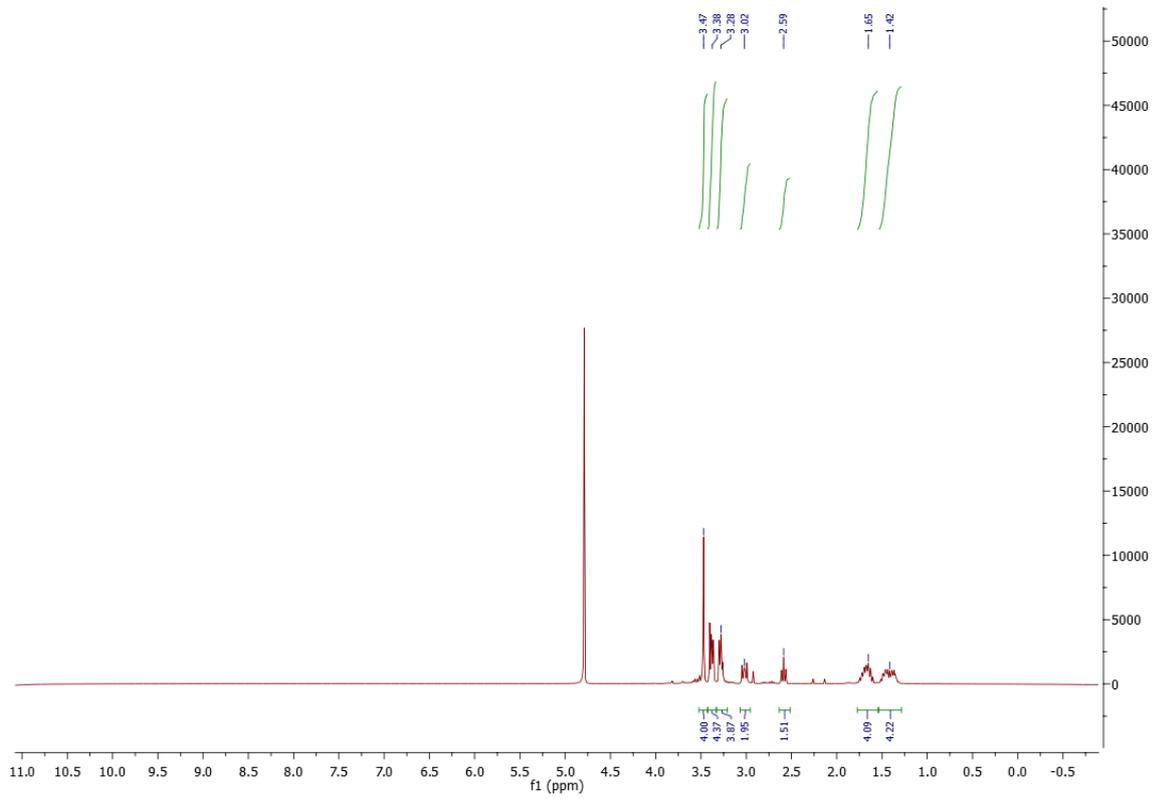


HPNP (¹H-NMR, ³¹P-NMR)

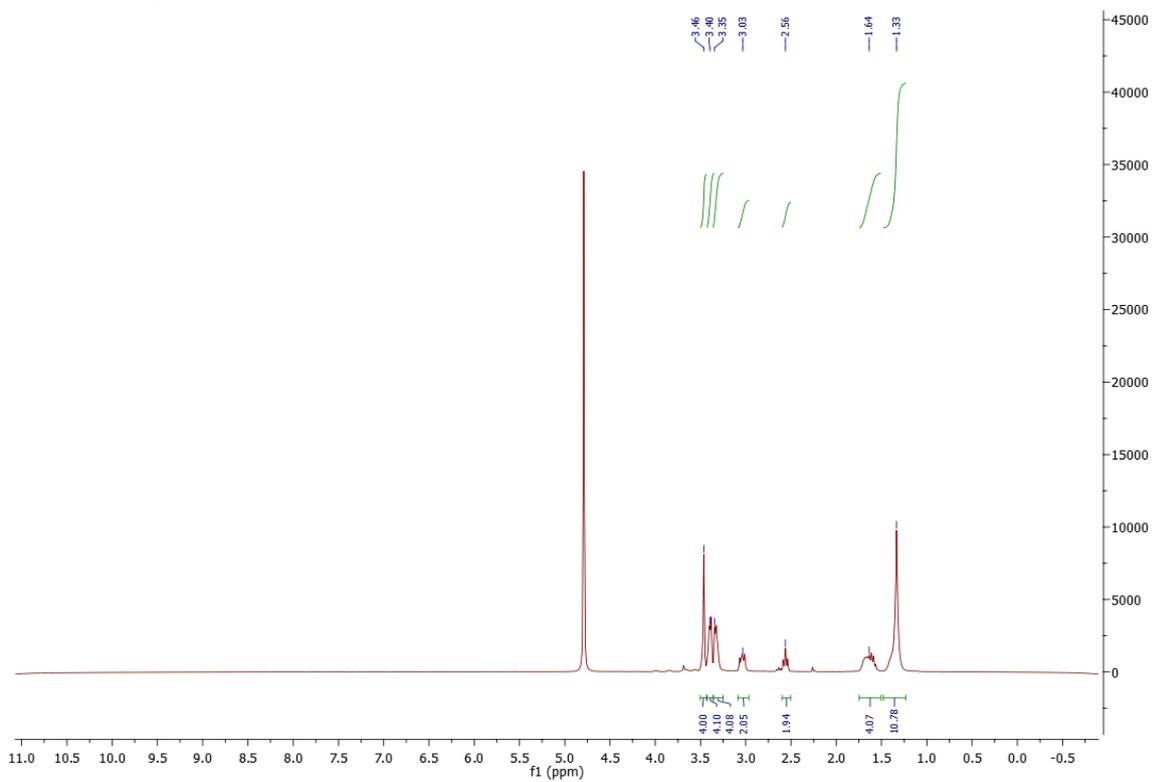




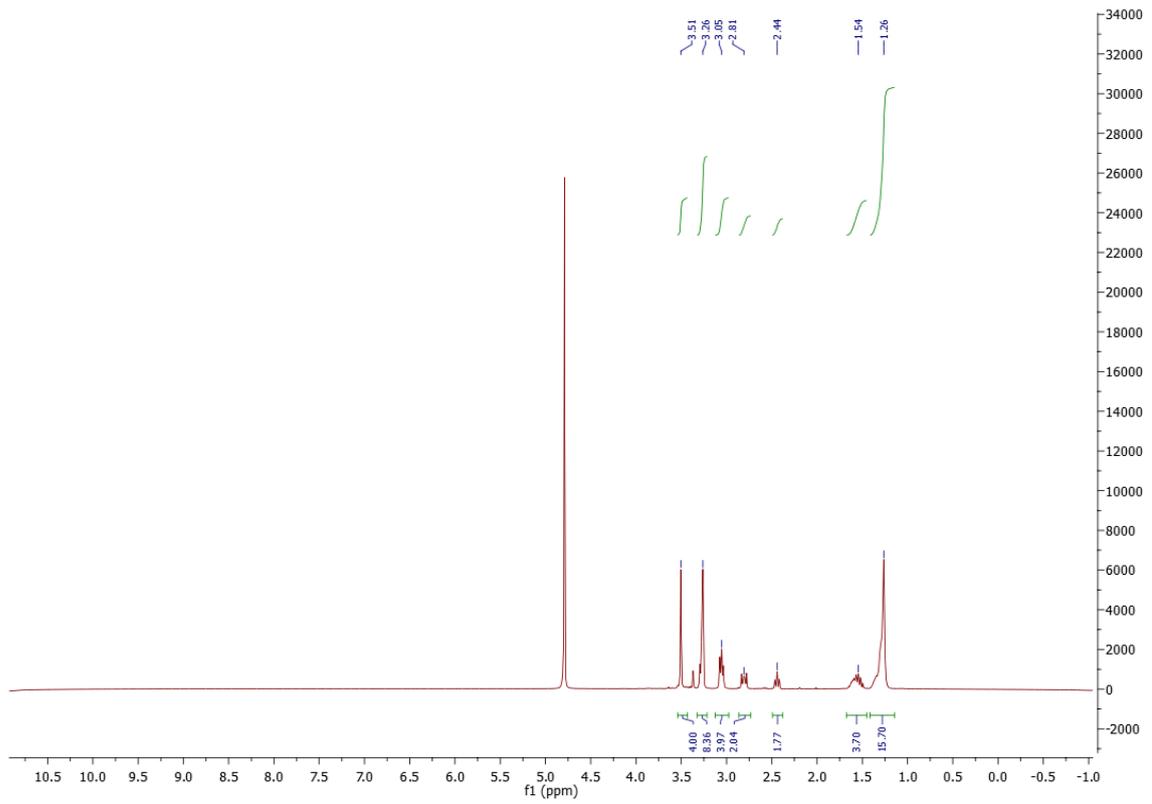
C6TACN deprotetto (¹H-NMR)



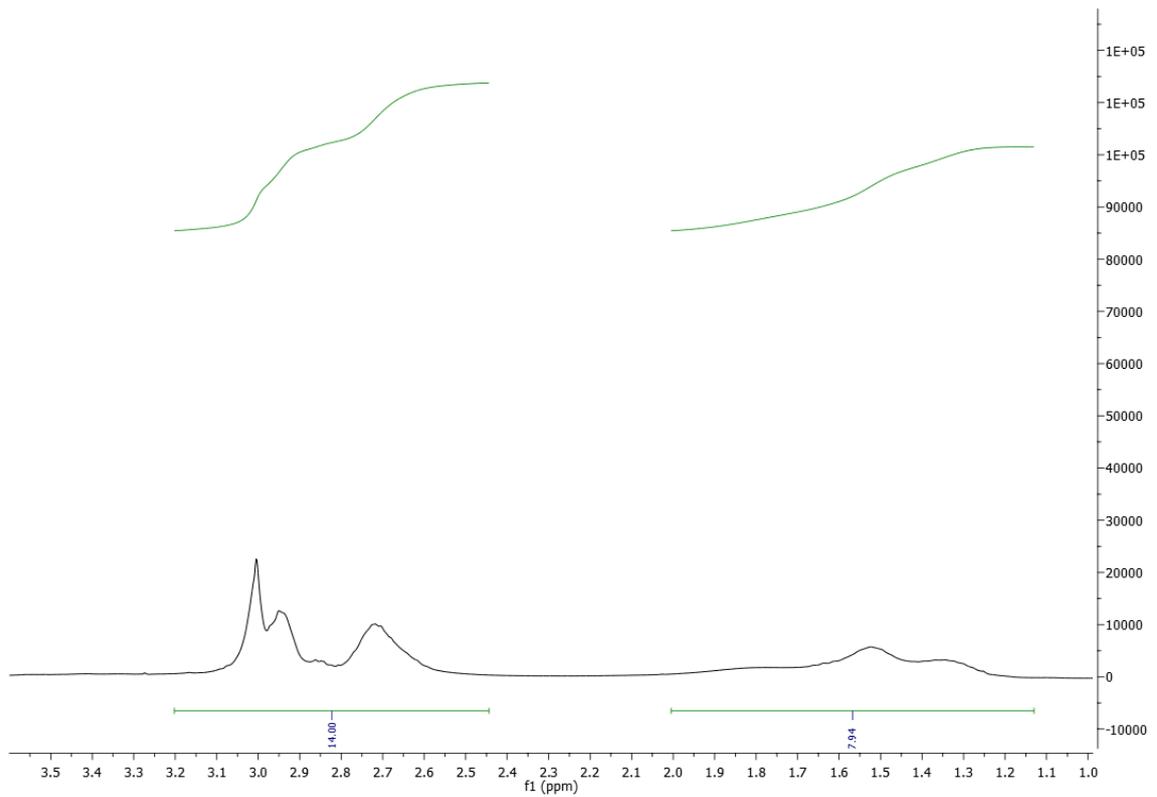
C9TACN deprotetto (¹H-NMR)



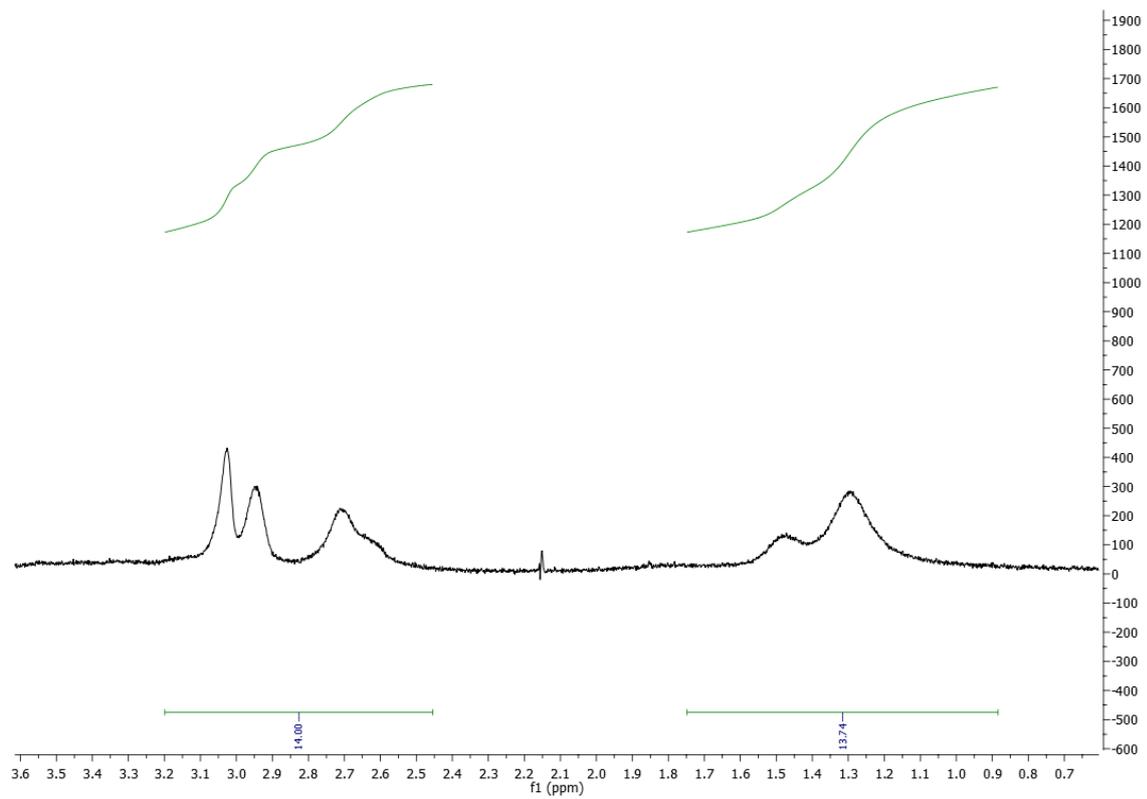
C12TACN deprotetto (¹H-NMR)



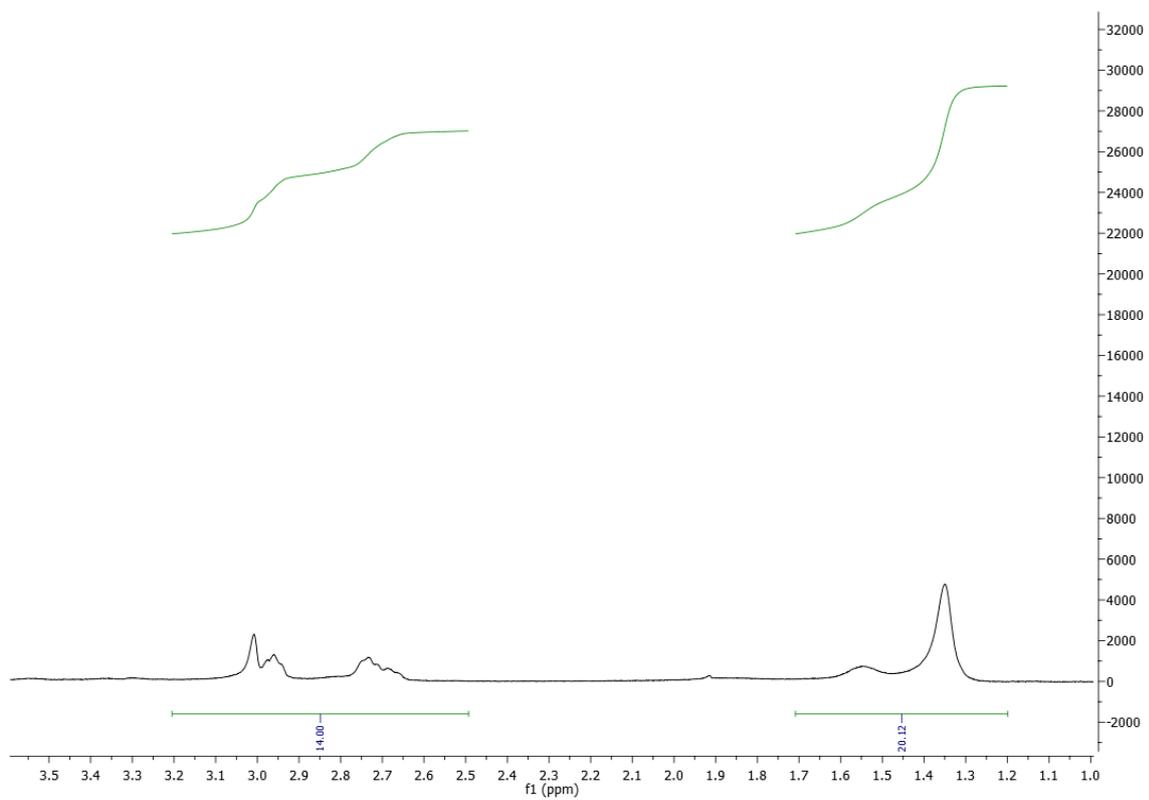
Au NPs C6TACN (gradiente di campo)



Au NPs C9TACN (gradiente di campo)



Au NPs C12TACN (gradiente di campo)



I miei più sinceri ringraziamenti per il contributo alla realizzazione di questo lavoro vanno al Prof. Leonard Jan Prins.

Un sentito ringraziamento alla mia commissione triennale per i preziosi consigli:

Prof.ssa Antonella Glisenti
Prof.ssa Margherita Morpurgo
Dott. Vincenzo Amendola

Un doveroso grazie al Direttore della SDSM:

Prof. Antonino Polimeno

Un grande ringraziamento ai colleghi di laboratorio e di ufficio per il sostegno in questi tre anni, permettendomi uno sviluppo professionale e personale indiscutibile.

Un enorme ringraziamento a chi mi ha sostenuto al di fuori dal laboratorio.

GRAZIE!

Nessuna nanoparticella è stata maltrattata per lo sviluppo di questo elaborato.