



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE  
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA  
IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA**

**NANOPARTICELLE D'ORO FUNZIONALIZZATE  
COME CATALIZZATORI BIOMIMETICI  
MULTIVALENTI**

RELATORE: CH.MO PROF. PAOLO MARIA SCRIMIN

CONTRORELATORE: CH.MO PROF. GAETANO GRANOZZI

LAUREANDA: CLAUDIA MORA

*Anno Accademico 2007-2008*







---

**INDICE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABBREVIAZIONI.....</b>   | <b>V</b>  |
| <b>1. INTRODUZIONE.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Sistemi catalitici multivalenti.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Nanoparticelle d'oro come sistemi multivalenti</b><br><b>autoassemblati.....</b>                                 | <b>2</b>  |
| <b>1.3 Nanoparticelle come catalizzatori.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1.4 Catalisi di processi idrolitici.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.5 Organizzazione del monostrato di tioli presente sulla</b><br><b>superficie metallica del cluster.....</b>        | <b>8</b>  |
| <b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3.1 Sintesi di nanoparticelle di Au, eterofunzionalizzate con una</b><br><b>miscela di due tioli differenti.....</b> | <b>19</b> |
| 3.1.1 Sintesi del tiolo 18, TACN-TIOLO.....   | 19        |
| 3.1.2 Sintesi del tiolo 8, TEG-TIOLO.....   | 23        |
| 3.1.3 Sintesi di nanoparticelle d'oro.....  | 25        |
| <b>3.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle ottenute.....</b>   | <b>28</b> |
| 3.2.1 TEM.....  | 28        |
| 3.2.2 TGA.....  | 29        |
| 3.2.3 Caratterizzazione della matrice organica tramite <sup>1</sup> H-NMR.....  | 31        |
| 3.2.4 Analisi UV-Vis.....   | 36        |
| <b>3.3 Attività catalitica.....</b>   | <b>40</b> |
| 3.3.1 Cinetiche al variare della concentrazione di Zn <sup>2+</sup> .....   | 41        |
| 3.3.2 Cinetiche al variare della concentrazione di HPNP   |           |
| Michaelis-Menten.....   | 44        |
| 3.3.3 Cinetiche di NP 100 % TACN al variare del rapporto Zn-NP.....   | 53        |
| 3.3.4 Cinetiche in presenza di inibitore.....   | 59        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.5 Cinetiche al variare della concentrazione di tampone HEPES.....                              | 61        |
| 3.3.6 Prospettive future.....  | 62        |
| <b>3.4 Studi realizzati con substrati multivalenti.....</b>  | <b>64</b> |
| 3.4.1 Cinetiche in presenza di ct-DNA e di defibrotide.....  | 64        |
| 3.4.2 Prospettive future.....  | 67        |
| <b>4. CONCLUSIONI.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>5. PARTE SPERIMENTALE.....</b>  | <b>73</b> |
| 5.1 Materiali.....   | 73        |
| 5.2 Strumentazione.....  | 74        |
| 5.3 Metodi.....  | 76        |
| 5.4 Procedure di sintesi.....  | 85        |
| 5.4.1 Sintesi Acido S-acetil-8-mercaptoottanoico.....  | 85        |
| 5.4.2 Sintesi S-acetil-8-mercaptoottanoil cloruro.....   | 86        |
| 5.4.3 Sintesi Pentafluorofenil S-acetil-8-mercaptoottanoato.....                                   | 86        |
| 5.4.4 Sintesi 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-1-etil-p-toluensolfonato.....                         | 87        |
| 5.4.5 Sintesi 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-etilazide.....  | 88        |
| 5.4.6 Sintesi 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-etilammina.....                                       | 88        |
| 5.4.7 Sintesi di<br>7-({2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}carbammioil)eptiletantiolato..           | 89        |
| 5.4.8 Sintesi di N-({2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}-8-mercapto<br>ottilammide (TEG-TIOLO)..... | 91        |
| 5.4.9 Sintesi 1,4-Bis(t-butilossicarbonil)-1,4,7-triazaciclononano.....                            | 92        |
| 5.4.10 Sintesi Metil {1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclononan]}-acetato.....                           | 93        |
| 5.4.11 Sintesi Acido 2-{1-[4,7-diBOC-1,4,7-triazaciclononan]}-acetico...                           | 94        |
| 5.4.12 Sintesi di<br>pentafluorofenil{1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclononan]}acetato.....            | 95        |
| 5.4.13 Sintesi N-Boc-diamminobutano.....   | 96        |
| 5.4.14 Sintesi N-Boc-N'-8-tioacetilottanoil-etilendiammina.....                                    | 97        |
| 5.4.15 Sintesi N-8-tioacetilottanoil-etilendiammina.....   | 98        |
| 5.4.16 Sintesi diBOC triazaciclononan derivato.....  | 98        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 5.4.17 Sintesi triazaciclononan derivato.....  | 99         |
| 5.4.18 Sintesi del triazaciclononan-tiolo (TACN-TIOLO).....                              | 100        |
| <b>5.5 Procedura generale per la preparazione dei colloidi d'oro in<br/>toluene.....</b> | <b>101</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>7. SPETTRI.....</b>   | <b>111</b> |





**ABBREVIAZIONI**

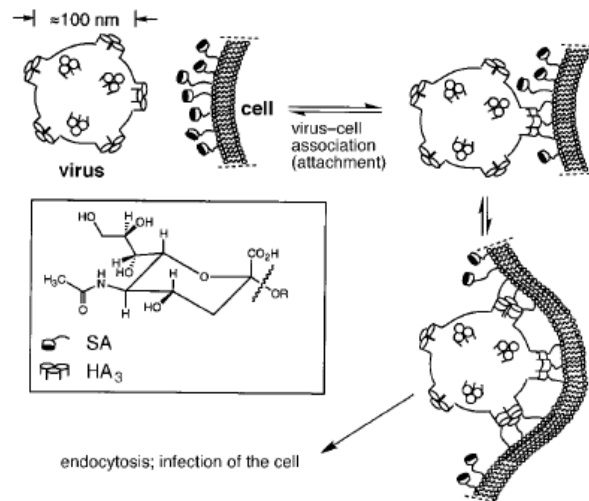
|                    |  |
|--------------------|--|
| ACN                | Acetonitrile   |
| Boc                | ter-butilossicarbonile                               |
| DBU                | 1,8 diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene                 |
| DIPEA              | di-isopropil-etil-ammina                             |
| DMAP               | dimetilammino-piridina                               |
| DMF                | dimetilformammide                                    |
| DMP                | dimetilfosfato                                       |
| EDC                | 1-(3- Dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimmide.HCl   |
| 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'-2-etansolfonico |
| HOBT               | 1-idrossibenzotriazolo                               |
| HPLC               | cromatografia liquida ad alta prestazione            |
| HPNP               | p-nitrofenil-2-idrossipropil-fosfato                 |
| IR                 | spettrometria infrarossa                             |
| MeOH               | metanolo   |
| MES                | acido (2-N-morfolino)etansolfonico                   |
| NMR                | risonanza magnetica nucleare                         |
| NP                 | nanoparticelle                                       |
| PIPES              | acido N-N'-piperazin-1,4-bis(2-etansolfonico)        |
| P(Ph) <sub>3</sub> | trifenilfosfina                                      |
| SAM                | self-assembling monolayer                            |
| TOABr              | tetraottilammonio bromuro                            |
| TACN               | 1,4,7-triazociclononano                              |
| TFA                | acido trifluoroacetico                               |
| THF                | tetraidrofurano                                      |
| TLC                | cromatografia su strato sottile                      |



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Sistemi catalitici multivalenti

Studi recenti in ambito biochimico<sup>1</sup> hanno permesso di meglio comprendere i sofisticati meccanismi che avvengono a livello cellulare in ogni organismo vivente; in modo particolare, essi sottolineano come spesso l'efficacia e la selettività dei meccanismi chimici di interazione, riconoscimento e catalisi derivino dalla somma di numerose interazioni deboli tra gruppi chimici che nel complesso danno luogo ad elevate affinità ed attività. Un esempio sono i fenomeni di riconoscimento e binding come l'adesione cellulare, il riconoscimento anticorpo-antigene, l'interazione virus-superficie cellulare (figura 1); in questi sistemi agiscono le cosiddette interazioni multivalenti, ovvero l'associazione specifica e simultanea di leganti multipli su molteplici recettori presenti su un'unità complementare<sup>2,3</sup>.



**Figura 1.1:** Interazione del virus dell'influenza con la superficie cellulare.

Inoltre, la presenza contemporanea di più gruppi funzionali in uno spazio ridotto consente loro di agire in maniera cooperativa, dando luogo ad un sistema in cui l'effetto dato dalla somma di diverse interazioni è superiore alla semplice addizione dei contributi singoli.

A seguito di tali scoperte, negli ultimi anni, si è sviluppato un forte interesse nei confronti dei cosiddetti *sistemi sintetici multivalenti*; si vuole infatti disporre di sistemi che mimino le strutture multivalenti presenti in natura e possano così trovare le più svariate applicazioni.

I sistemi multivalenti già noti possiedono quindi un'architettura di base (*scaffold* tripodali<sup>4</sup>, dendrimeri<sup>5</sup>, polimeri<sup>6</sup> o superfici<sup>7</sup>) che possa essere funzionalizzata con molteplici copie della molecola responsabile dell'attività desiderata: un gruppo di riconoscimento, un sensore, un'unità catalitica o un marker. Di conseguenza, i gruppi funzionali periferici sono responsabili della interazione con il target, mentre alla struttura centrale si deve la definizione della forma del sistema.

Sistemi sintetici multivalenti sono stati sfruttati in numerosi ambiti, come il (bio)riconoscimento<sup>8,9,10,11</sup>, la catalisi<sup>12,13</sup>, la chimica supramolecolare<sup>14</sup> e nell'ambito delle nanotecnologie<sup>15,16</sup>.

## 1.2 Nanoparticelle di oro come sistemi multivalenti autoassemblati

Come si è accennato nel paragrafo precedente, per poter disporre di un sistema multivalente si rende necessaria la sintesi di una piattaforma (*scaffold*) dotata di molteplici siti reattivi, che ne consentano la polifunzionalizzazione con una molecola responsabile dell'attività della struttura. Come strutture di base, si sono già utilizzati dendrimeri<sup>17</sup> o polimeri<sup>18</sup>: gli studi condotti hanno tuttavia mostrato come siano difficili la sintesi e la funzionalizzazione di entrambi. Infatti, spesso, per ottenere dei prodotti puri, si deve ricorrere a metodiche di sintesi e purificazione particolarmente rigorose; inoltre, nel caso dei polimeri, il controllo della composizione e della conformazione in soluzione è risultato molto scarso<sup>19</sup>.

Se invece la formazione del sistema multivalente avvenisse attraverso un processo spontaneo di autoassemblaggio dei singoli componenti, il problema sintetico sarebbe estremamente semplificato poiché si ridurrebbe alla sintesi delle unità monomeriche. Tra i vari esempi di strutture organiche autoassemblate, oltre a ricordare le micelle, costituite dall'aggregazione

spontanea di tensioattivi, spiccano gli MPCs (Monolayer Protected Clusters)<sup>20</sup>, ossia aggregati di atomi di oro, protetti da un monostrato di molecole organiche tiolate. I vantaggi nell'utilizzo di questi sistemi, in ambiti applicativi come il riconoscimento cellulare<sup>21</sup> e la catalisi<sup>22</sup>, sono molteplici: la sintesi semplice e standardizzabile<sup>23,24</sup>, la geometria simil-sferica, a garantire una distribuzione uniforme delle molecole attive sulla superficie, ed infine l'elevata densità di legante sul singolo cluster metallico.

### 1.3 Nanoparticelle come catalizzatori

Sfruttando il processo di autoassemblaggio degli atomi di Au e la nota affinità di legame dei tioli verso tale metallo, si possono facilmente portare a formazione gli MPCs, noti come sistemi multivalenti molto efficaci. Tali strutture hanno trovato una prima applicazione come leganti, nell'ambito del riconoscimento cellulare; il gruppo di Scrimin<sup>22</sup>, nonché altri gruppi di ricerca<sup>1</sup>, hanno però messo in luce le potenzialità notevoli di questi sistemi quando vengano sfruttati anche come catalizzatori artificiali. Infatti, la loro geometria consente alle molecole attive di essere ancorate alla superficie metallica, forzate a coesistere in uno spazio ridotto: si realizza in tale modo il principale, sebbene non unico, requisito strutturale alla base dei fenomeni di cooperatività. L'azione concertata di più gruppi funzionali di un sistema nei confronti di un target è il meccanismo più efficace di cui si avvalgono gli enzimi naturali durante un processo catalitico. Perciò, per poter competere con gli analoghi naturali, i catalizzatori artificiali devono necessariamente possedere una struttura che consenta loro di manifestare collaborazione tra le unità costituenti.

Molto spesso, nonostante si abbiano a disposizione sistemi multivalenti, risulta comunque difficile riscontrare una reale cooperatività. Si guardi per esempio ai casi di micelle<sup>25</sup> e liposomi<sup>26,27</sup>, dove i vantaggi cinetici osservati sono imputabili semmai ad incrementi locali della concentrazione dei reagenti o delle unità catalitiche, o ancora a variazioni locali del pH - dovute al fatto che la reazione avviene in uno spazio ridotto - piuttosto che ad una reale

cooperatività. La ragione di tale lacuna di cooperatività nei sistemi colloidali è in larga parte entropica, connessa alla mobilità delle unità costituenti: il sito catalitico ha una vita media di durata inferiore rispetto al tempo richiesto dalla reazione per avvenire.

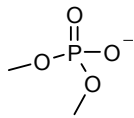
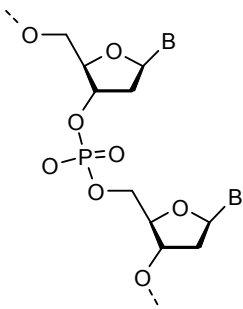
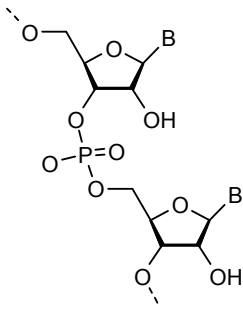
Viceversa, il legame Au-tiolo che si realizza sulla superficie delle nanoparticelle, benché non sia un vero e proprio legame covalente, è sufficientemente stabile (sia cineticamente che termodinamicamente) da consentire di definire con precisione la specie catalitica presente; inoltre, la limitata mobilità di cui dispongono le catene tioliche consente loro di sviluppare una forte cooperatività tra unità monomeriche prossime. Sulla base di tali considerazioni, e basandosi sugli ottimi risultati ottenuti, tali sistemi catalitici sono stati ribattezzati “nanozimi”<sup>22</sup>.

#### 1.4 Catalisi di processi idrolitici

Il gruppo di Scrimin ha sfruttato le nanoparticelle d'oro come metallonucleasi artificiali, enzimi caratterizzati dalla presenza di più ioni metallici (Zn(II) o Mg(II)) complessati che agiscono cooperativamente, al fine di idrolizzare un estere fosforico.

L'idrolisi enzimatica di un estere fosforico è un processo importante dal punto di vista metabolico, del trasferimento di energia e della riparazione o idrolisi di DNA e RNA. Il legame fosfoestereo è estremamente stabile in quanto la sua natura anionica ostacola l'avvicinamento di un nucleofilo. Questa stabilità si riflette in un valore molto elevato del tempo di emivita per i processi idrolitici che coinvolgono esteri fosforici come ben evidenziano i dati riportati in Tabella 1.2.

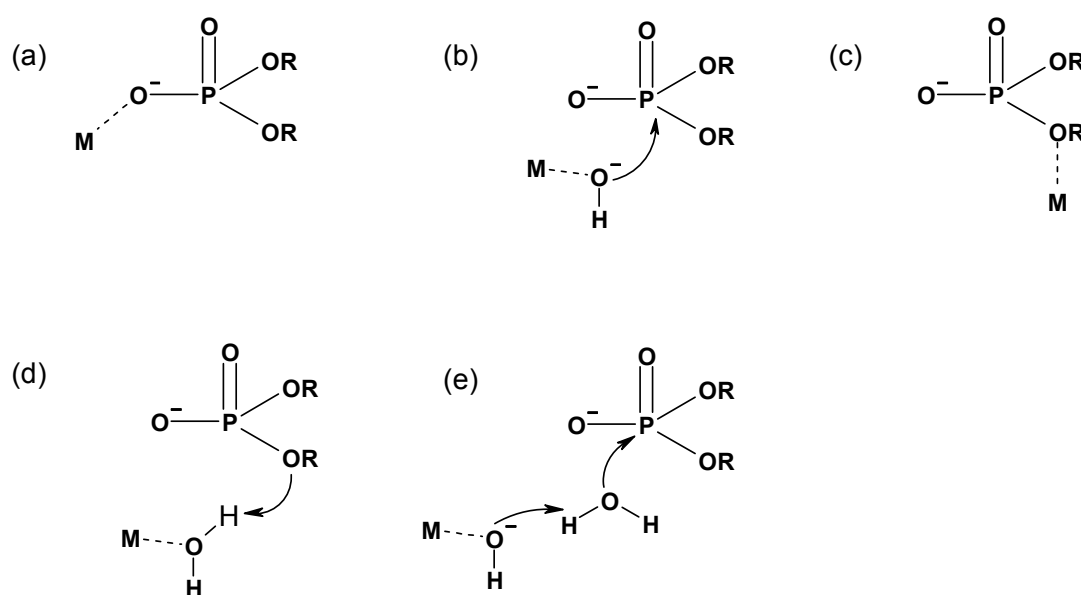
**Tabella 1.2.** Costanti di pseudo primo ordine e tempi di emivita per il processo di scissione idrolitica non catalizzato di alcuni esteri fosforici.

| Estere  | $k_{\Psi}$ ( $s^{-1}$ )              | $t_{1/2}$ (anni)  |
|---|--------------------------------------|-------------------|
|          | $1 \times 10^{-15}$ (25 °C, pH 7)    | $2.2 \times 10^7$ |
| <br>DNA  | $2 \times 10^{-14}$ (37 °C, pH 7)    | $1.1 \times 10^6$ |
| <br>RNA | $2.3 \times 10^{-9}$ (37 °C, pH 7.4) | 9.5               |

La minore stabilità dell' RNA rispetto al DNA è dovuta al fatto che, nel primo caso, il processo di scissione è intramolecolare e vede come nucleofilo il gruppo 2'-OH del ribosio, assente invece nel secondo. La ragione di tale differenza è facilmente compresa quando si pensi a quali siano i ruoli svolti dalle due molecole: mentre il DNA deve conservare il patrimonio genetico di un organismo, l'RNA svolge un ruolo fondamentale nella sintesi proteica. E' chiaro allora che la prima struttura deve essere il più stabile possibile nel tempo e quindi il più resistente possibile agli attacchi di un eventuale metallonucleasi; viceversa, si desidera che la vita media dell'RNA sia breve durata, di qui la più facile scissione della catena fosfodiesterica.

Per scindere RNA e DNA in pochi minuti in condizioni fisiologiche, gli enzimi devono accelerare le reazioni di fattori che vanno, rispettivamente per i due

substrati, da  $10^8$  a  $10^{17}$  volte; a tale fine le metallonucleasi sfruttano ioni metallici che possono avere ruoli diversi (e complementari). La figura 1.3 riporta appunto le varie casistiche che si possono presentare, dal punto di vista meccanicistico, per la catalisi metallica nell'idrolisi di un estere fosforico<sup>28</sup>. Vi sono tre modi diretti che comprendono: (a) l'azione di acido di Lewis mediante coordinazione nei confronti degli ossigeni del fosfato, a rendere più elettroneficiente il fosforo (b) l'attivazione della specie nucleofila ( $H_2O$  o  $OH^-$  molecolare) mediante abbassamento del suo  $pK_a$ , anche in questo caso per coordinazione, (c) la stabilizzazione del gruppo uscente. Vi sono poi modi di attivazione "indiretti" che vedono l'intermediazione di una molecola d'acqua come acido (d) o base (e) generali. In molte nucleasi vi sono più centri metallici che permettono di combinare più di uno degli aspetti meccanicistici illustrati sopra.

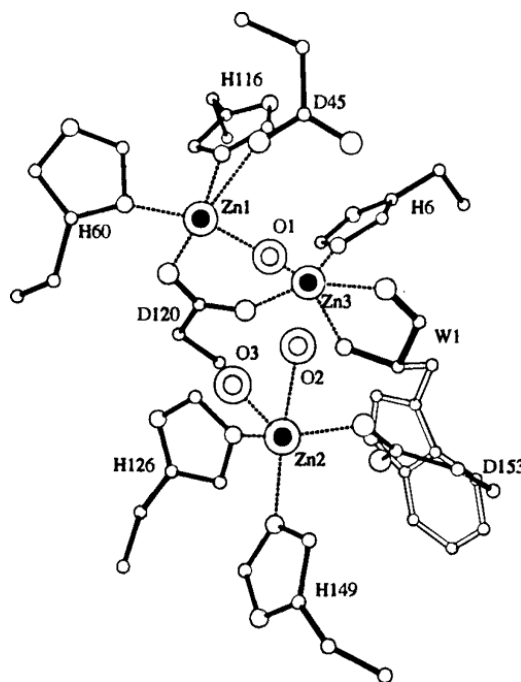


**Figura 1.3** Ruolo giocato dagli ioni metallici nell'accelerare l'idrolisi di esteri fosforici.

Un esempio pertinente di metallonucleasi naturale è costituito dall'enzima P1 nucleasi, una glicoproteina di 36 kDa che idrolizza DNA e RNA a singolo filamento<sup>29</sup>. Il sito catalitico contiene diversi gruppi funzionali dovuti alla catene laterali degli amminoacidi presenti: istidina (x5) acido aspartico (x3) e triptofano (x1) (Figura 1.4). I residui istidinici e quelli di acidi aspartico



servono per coordinare in tutto 3 ioni  $Zn^{II}$  e per collocare in maniera opportuna gli ioni metallici nello spazio. (figura 1.3).



**Figura 1.4** Il sito attivo della metallonucleasi P1.

Vista l'evidente complessità della struttura dell'enzima naturale, ci si rende conto di come la progettazione di un catalizzatore debba soddisfare le più svariate e complicate esigenze. Si deve infatti garantire che la struttura ideata rispetti alcuni parametri fondamentali, quali il ruolo dello ione metallico, la distanza tra i centri metallici e la flessibilità conformazionale.

Le nanoparticelle d'oro rispondono in maniera soddisfacente alle esigenze descritte e, presentando un numero limitato di vincoli geometrici, godono della qualità di massima flessibilità, consentendo in questo modo di realizzare delle buone condizioni di interazione catalizzatore/substrato. Il gruppo di Scrimin ha quindi sfruttato le proprietà di questi sistemi, sintetizzando nanoparticelle funzionalizzate con tioli recanti un'unità 1,4,7-triazaciclononano<sup>22</sup>, ciascuna delle quali permette di complessare uno ione metallico, che sulla superficie del cluster può agire cooperativamente con gli altri ioni complessati. I test condotti per studiare l'attività catalitica di tali sistemi nei confronti di un analogo dell'RNA, l'HPNP, hanno dimostrato che le nanoparticelle hanno comportamento enzimatico, venendo caratterizzate da valori delle costanti di

Michaelis-Menten ( $K_M=0.93$  mM e  $k_{cat}= 4.2 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>) che le qualificano come buoni sistemi catalitici. Infatti, il rapporto tra la costante di velocità della reazione catalizzata e quella relativa alla reazione in assenza di catalizzatore è pari a 21000, a dimostrare l'efficacia catalitica dei sistemi sintetizzati.

### 1.5 Organizzazione del monostrato di tioli presente sulla superficie metallica dei cluster

La copertura spontanea di nanoparticelle d'oro con un monolayer organico è dovuta alla naturale tendenza delle superfici metalliche nude di adsorbire molecole organiche, dato che queste ultime abbassano l'energia libera dell'interfaccia tra il metallo e l'ambiente circostante<sup>30</sup>. Le molecole organiche tiolate che, sfruttando la loro elevata affinità per l'oro, si adsorbono sulla superficie metallica costituiscono i cosiddetti SAM<sup>31</sup>, Self-Assembled Monolayer: i componenti della miscela di partenza, presente in fase di sintesi, si organizzano spontaneamente a dare sulla superficie metallica una struttura ben definita.

Le nanoparticelle d'oro funzionalizzate con una miscela di tioli costituiscono un ottimo esempio di materiali di dimensioni nanometriche, le cui proprietà possono essere modulate variando la struttura o la composizione del monostrato. Notevole è quindi l'interesse nei confronti di tali sistemi organici: usando come riferimento i modelli già noti, si potrebbero ottenere delle strutture che abbinano capacità proprie delle entità presenti in natura (enzimi, inibitori, gruppi di riconoscimento) alle proprietà elettriche, magnetiche e ottiche dei metalli di dimensioni nanometriche. Le proprietà superficiali di un metallo infatti possono essere modulate<sup>32</sup>, variando in modo controllato la composizione e l'organizzazione del monolayer organico; per raggiungere tale scopo, si rende necessario prima lo studio delle modalità con le quali i componenti si organizzano nel SAM, per arrivare a definire poi una strategia atta a manipolare e selezionare i gruppi funzionali esposti all'interfaccia nanoparticella/ambiente esterno.

Già da tempo perciò, si è avviato il dibattito su come due molecole costituenti un mixed SAM possano disporsi spontaneamente quando vengano adsorbite su di una superficie metallica. Si riportano i tre possibili meccanismi limite tramite i quali si pensa possa avvenire l'adsorbimento<sup>33</sup>:

1. Controllo cinetico: le molecole presenti in soluzione in fase di sintesi raggiungono in modo casuale, statistico, la superficie metallica e si legano in modo irreversibile ad essa. Il risultato di questo processo porta alla formazione di una matrice organica al cui interno i due componenti sono disposti in modo random, in proporzione tale da riflettere la composizione della soluzione di partenza;
2. Meccanismo diffusivo: il chemiadsorbimento irreversibile, descritto in precedenza, viene seguito da una diffusione in superficie che comporta una redistribuzione degli adsorbati, a dare una situazione finale in cui essi si dispongono nel modo a loro più congeniale (seppur limitati dalle costrizioni cinetiche imposte dalla fase iniziale di adsorbimento);
3. Meccanismo di scambio: l'adsorbimento non è un processo irreversibile, ma dinamico: dopo una prima disposizione statistica, i continui processi di adsorbimento e desorbimento comportano il raggiungimento di una situazione finale di equilibrio termodinamico, generalmente rappresentata dalla formazione di domini di molecole dello stesso tipo.

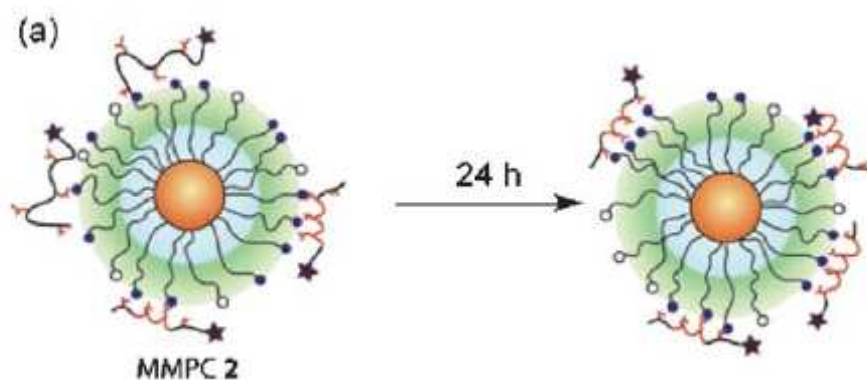
Ciascuno di questi tre meccanismi o la combinazione di essi porterebbe ad una distribuzione finale dei due tioli diversa da caso a caso: numerosi sono stati gli studi condotti per appurare quale delle teorie avanzate sia la più plausibile.

Rotello et al.<sup>34</sup> sostengono la tesi secondo cui l'adsorbimento di un mixed SAM comporta la formazione sulla superficie metallica di domini di molecole dello stesso tipo, mediante il meccanismo di scambio descritto al punto 3, anche nel caso di molecole che abbiano scarse interazioni tra loro. Tale modalità di disposizione risulta essere ulteriormente evidente nel caso in cui la formazione di domini comporti un incremento dell'attività della nanoparticella (tipico esempio è il caso in cui si richieda cooperatività tra più molecole dello stesso tipo).

Per poter giungere a questa conclusione, il gruppo di ricerca ha sintetizzato delle nanoparticelle funzionalizzate con un mixed-SAM composto (secondo un rapporto 1:0.4) da un tiolo con una funzione trimetilammonio - carica positivamente - e un tiolo con una catena TEG terminale, che conferisse solubilità alla struttura. Tali sistemi si sono dimostrati capaci di indurre una conformazione ad  $\alpha$ -elica nel peptide tetraaspartato (TAP), che altrimenti avrebbe avuto una struttura secondaria a random-coil. L'energia richiesta per cambiare la conformazione del peptide veniva fornita dall'entalpia di interazione ionica tra la nanoparticella, carica positivamente, e il substrato, con carica invece negativa.

Inoltre, si è notato che la percentuale di TAP a conformazione elicoidale aumentava nel tempo: dopo un'incubazione di 24 ore del peptide in presenza degli MPCs, è stato registrato un incremento del 16% (figura 1.5). Ciò è stato imputato alla capacità dei tioli di essere mobili all'interno del SAM: dopo 24 ore, ad una iniziale distribuzione statistica dei tioli, si è sostituito un'arrangiamento caratterizzato dalla presenza di domini. I tioli con la funzione trimetilammonio si sono così trovati gli uni accanto agli altri, vedendo di fatto notevolmente aumentata la loro capacità di interazione con il peptide e quindi la loro efficacia nell'indurre il cambio di conformazione. Il costo entropico dell'operazione di redistribuzione è stato fornito dall'aumento di entalpia di interazione peptide/nanoparticella che il sistema è riuscito a raggiungere con tale nuovo assetto.

La conclusione a cui il gruppo di Rotello è giunto sulla base degli esperimenti condotti è che i colloidali di oro funzionalizzati siano capaci di modulare nel tempo la distribuzione dei componenti il mixed-SAM, al fine di aumentare l'entalpia di interazione tra essi e il target. La driving-force del processo di riarrangiamento del monolayer, che si fonda sull'assunto che l'adsorbimento sia un processo reversibile, consisterebbe allora nel miglioramento delle prestazioni del sistema nei confronti di un elemento bersaglio.



**Figura 1.5** Formazione di domini di tioli sostenuta dal gruppo di Rotello: nel tempo si ha redistribuzione delle molecole adsorbite, per conferire alla nanoparticella maggiore attività. I tioli attivi sono maggiormente efficaci ad indurre una conformazione ad  $\alpha$ -elica in un peptide se sono prossimi gli uni gli altri (si massimizzano le interazioni con il target e la cooperatività tra i tioli).

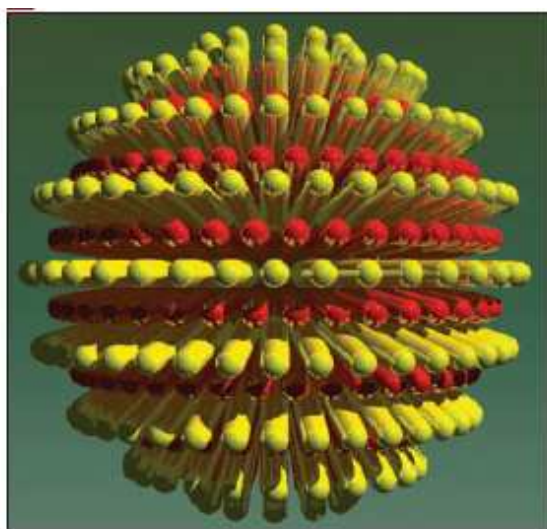
Recentemente, anche il gruppo di Lévy ha condotto prove sperimentali e modellizzazioni computazionali che confermano tale ipotesi<sup>35</sup>: si sono sfruttate delle nanoparticelle passivate con un mixed SAM, composto da una molecola inattiva (a dare la matrice della miscela) e da un peptide funzionale più lungo, in un dato rapporto tra loro. Per misurare la distanza sulla superficie metallica tra due peptidi funzionali, si è utilizzata una molecola in grado di dare cross-linking tra due gruppi reattivi specifici. La struttura del peptide infatti è stata studiata in modo tale che possedesse due gruppi reattivi che potessero formare un legame chimico tra essi (cross-linking intramolecolare) o con un gruppo reattivo di un altro peptide funzionale (cross-linking intermolecolare).

Se un dato peptide fosse stato isolato nel monolayer, in presenza del cross-linker, esso avrebbe potuto dare solo un legame intramolecolare (e quindi dare una struttura finale dello stesso peso molecolare del monomero), altrimenti, in presenza di un altro peptide funzionale, ad una distanza accettabile, si avrebbe avuto inevitabilmente un legame intermolecolare (a dare una struttura dal peso molecolare più elevato). Dall'analisi dei risultati sperimentali (basati su di una misura specifica dei pesi molecolari, Western-blot) e dal confronto di questi con i dati provenienti da una simulazione computazionale, si è concluso che i peptidi funzionali sono portati a formare cluster sulla superficie metallica della nanoparticelle.

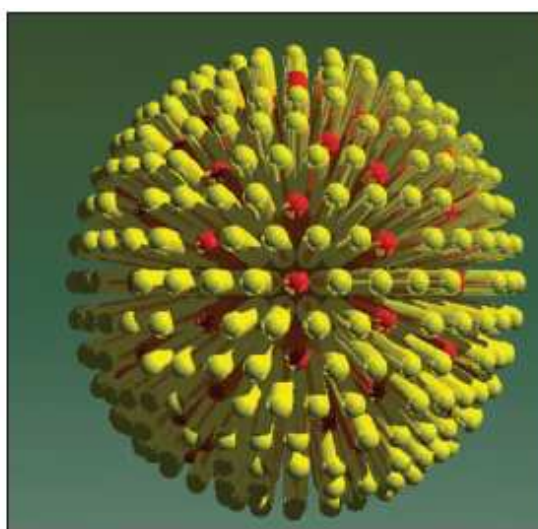
Secondo il gruppo di ricerca, tale aggregazione di molecole dello stesso tipo si verifica durante il processo di copertura delle nanoparticelle: si è ipotizzato un meccanismo di adsorbimento preferenziale seguito da un processo di scambio di leganti, come quello precedentemente esposto.

Tuttavia, l'ipotesi appena descritta non è l'unica avanzata: Stellacci et al<sup>36</sup>. sostengono che sulla nanoparticella si formino degli "anelli" longitudinali costituiti alternativamente dall'uno o dall'altro componente il mixed SAM e hanno riportato immagini TEM, STM e analisi con raggi-X a validare tale ipotesi. Sempre secondo tale gruppo di ricerca, l'altezza, la spaziatura o la morfologia dell'anello possono essere modulati in modo controllato variando rispettivamente il raggio di curvatura della NP o il rapporto tra i due reagenti. Essi infatti sostengono che si possa avere la formazione dei domini descritti da Rotello solo nel caso in cui uno dei due tioli sia presente in percentuale molto bassa rispetto all'altro; viceversa, quando si abbiano percentuali comparabili tra i due si assiste alla formazione di tali anelli.

a)



b)



**Figura 1.6** Schematizzazione dei risultati ottenuti da analisi STM; a) formazione di anelli per rapporto 1:2 tra i due tioli; b) formazione non di anelli ma di domini ordinati del tiolo presente in minore quantità, nella matrice formata dall'altro tiolo (rapporto molare 1:10).

Per confermare i risultati delle analisi descritte, il gruppo di Stellacci ha sfruttato una particolare intuizione: poiché i due tioli di un mixed-SAM si dispongono in anelli attorno alla NP, esistono ai due poli due tioli in uno stato

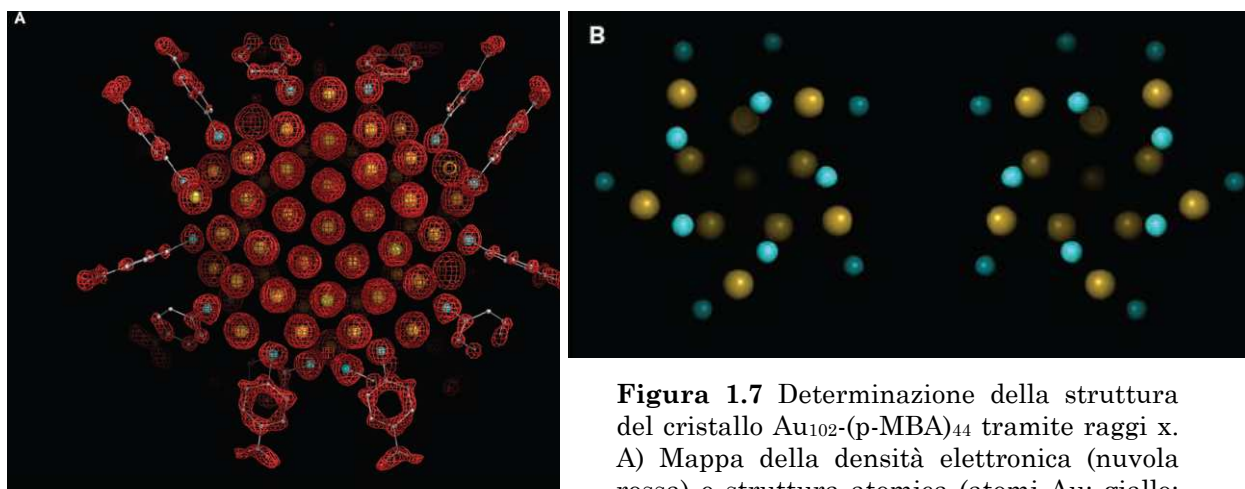
di massima energia, dato che essi non sono stabilizzati dalle interazioni con le molecole a fianco; ne segue che, in una reazione di scambio, essi sono le prime e sole molecole ad essere sostituite.

Si sono quindi sintetizzate delle nanoparticelle, il cui mixed-SAM fosse costituito da una miscela di 1-nonantiolo e 4-metilbenzentiolo; per avviare la reazione di scambio dei tioli ai poli, le NP sono state disciolte in una soluzione di acido 11-mercaptoundecanoico (MUA) attivato con N-idrossisuccinimide. Quindi, è stata avviata una polimerizzazione interfacciale tradizionale per dare nylon: si è messa a contatto una fase organica, costituita dalle nanoparticelle funzionalizzate con MUA disciolte in toluene, con una fase acquosa, contenente 1,6 diamminoesano. Nel giro di pochi minuti si è registrata la formazione di un precipitato: le immagini TEM hanno confermato la formazione di lunghe catene di NP -legate le une le altre con tratti di nylon 6,11- e la contemporanea assenza sia di catene ramificate che di reticoli tridimensionali, a dimostrare che solo le molecole ai poli hanno partecipato alla prima reazione di scambio.

Secondo tale gruppo di ricerca, questo risultato è da ritenersi l'evidenza sperimentale che convalida quanto assunto precedentemente: sulla superficie delle NP, i componenti di un mixed-SAM si organizzano a dare una morfologia specifica, caratterizzata dalla presenza di domini ad anelli dell'uno o dell'altro componente.

Come evidenziato da tali esempi, la scienza della nanotecnologia si trova oggi a dovere affrontare una sfida di enorme rilevanza: determinare con precisione atomica la struttura degli MPCs. Uno studio di notevole rilievo è già stato effettuato a riguardo: Jadzinsky et al.<sup>37</sup> hanno saputo determinare la struttura atomica di nanoparticelle protette da un monolayer di acido p-mercaptobenzoico (p-MBA). Essi, infatti, hanno sintetizzato dei cluster d'oro sufficientemente uniformi in dimensioni per portare alla crescita di un singolo cristallo, la cui struttura è stata quindi determinata tramite analisi a raggi X. Si è così potuto valutare che le nanoparticelle hanno struttura chirale, nel cristallo si è riscontrata la presenza di una miscela racemica dei due

enantiomeri; la chiralità della struttura è evidente quando si visualizzano i cluster lungo il loro asse principale (figura 1.7)



**Figura 1.7** Determinazione della struttura del cristallo  $\text{Au}_{102}\text{-(p-MBA)}_{44}$  tramite raggi x. A) Mappa della densità elettronica (nuvola rossa) e struttura atomica (atomi Au: giallo; S: azzurro; C: grigio); B) I due enantiomeri visti lungo l'asse del cluster (colori come nel caso precedente).

La particolare disposizione degli atomi di Au è la conseguenza della ordinata struttura che le molecole organiche del SAM acquisiscono per rendere massime le interazioni tra esse.

Sarebbe quindi molto interessante se si riuscisse a valutare la struttura a raggi X di nanoparticelle il cui monolayer sia misto, composto magari da una o entrambe le molecole con un centro chirale al loro interno.

Raggiungere tale ambizioso obiettivo potrebbe consentire di controllare la morfologia dei mixed SAM e quindi consentire di ideare ed ottenere nanoparticelle dalla composizione superficiale desiderata. Progettando opportunamente il monolayer di copertura dei colloidali di Au, si potrebbero ottenere dei composti nanostrutturati dalle desiderate ed innovative proprietà, sfruttabili come sonde biologiche, nanowires o come scaffold nanostrutturati funzionalizzabili.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Come evidenziato nella parte introduttiva, le metallonucleasi naturali mostrano un'attività catalitica elevata, poiché hanno una struttura tale da garantire cooperatività tra ioni metallici ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ).

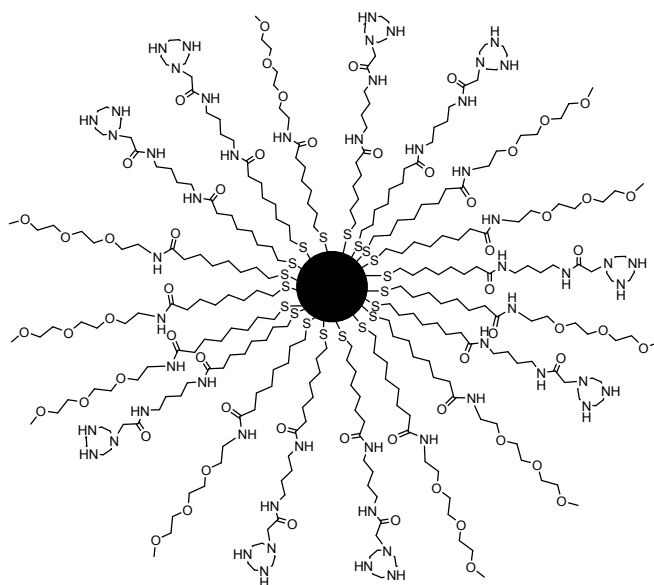
Il nostro gruppo si è in precedenza impegnato in studi volti all'identificazione di quelle strutture artificiali che fossero capaci di realizzare l'idrolisi di composti modello dell'RNA, operando con meccanismo cooperativo simile a quello enzimatico. Nel corso degli anni, sono state messe a punto metodiche di sintesi di dendrimeri e nanoparticelle d'oro, funzionalizzati entrambi in periferia con l'unità 1,4,7-triazaciclononano, macrociclo in grado di complessare ioni  $Zn(II)$  e  $Cu(II)$ ; si sono inoltre studiate le tecniche più opportune per valutare e confrontare la loro attività enzimatica.

Scopo di questo lavoro è confermare le conoscenze già a disposizione sul meccanismo d'azione delle nanoparticelle d'oro e comprendere come varia la loro attività in funzione della composizione della matrice organica che le ricopre, quando essa sia costituita non più da un solo componente, ma da più elementi.

Inoltre, si vogliono sfruttare le pregresse conoscenze allo scopo di sviluppare un metodo analitico d'indagine che consenta di comprendere anche come si distribuiscono due tioli di un mixed SAM sulla superficie metallica. Si vogliono cioè sfruttare i risultati delle analisi cinetiche e la conoscenza che l'azione idrolitica è basata sulla cooperatività tra due ioni metallici, per comprendere se i due tipi di tioli si distribuiscono in modo random, come nel caso dei dendrimeri, o si aggregano a individuare dei domini separati.

Sfruttando le competenze acquisite grazie agli altri studi svolti, con questo progetto di Tesi si vuole sintetizzare una serie di nanoparticelle, che siano identiche per quanto riguarda la loro matrice inorganica, ma che si differenzino per il monolayer che ricopre la superficie metallica: il monolayer organico sarà costituito da due tioli in miscela (mixed SAM), in proporzioni differenti per ciascun caso. I due tioli scelti sono già stati utilizzati per altri studi e la loro sintesi è già nota: si tratta di due strutture, di cui una -inattiva

ai fini catalitici, ma sostanziale per la solubilità in acqua delle nanoparticelle - presenta una funzione TEG all'estremità terminale, mentre l'altra - fondamentale per la reazione idrolitica - possiede un'unità triazaciclononano. Una volta terminata la sintesi, si vuole procedere alla caratterizzazione completa dei sistemi ottenuti, utilizzando e, dove possibile, perfezionando le tecniche solitamente sfruttate (Analisi  $^1\text{H-NMR}$ , TEM, TGA). Si vuole far uso della caratterizzazione per confermare che la via di sintesi seguita permetta effettivamente di soddisfare più esigenze: ottenere nanoparticelle dal diametro desiderato (1.5-2nm) -con una stretta distribuzione in dimensioni- e funzionalizzarle con una matrice organica che presenti il rapporto tra i due tioli imposto in fase di sintesi.



**Figura 2.1** Schema esemplificativo di nanoparticelle passivate con un mixed SAM.

Le nanoparticelle ottenute verranno sfruttate per condurre degli esperimenti atti a testare l'attività catalitica, che, oltre a confermare le pregresse conoscenze sul meccanismo di catalisi, permettano anche di appurare quale sia la distribuzione dei due tioli sulla superficie del cluster metallico.

Infine, si vuole sfruttare appieno la multivalenza del nostro sistema: si dispone con le nanoparticelle di un catalizzatore in cui molteplici cariche positive sono "costrette" ad occupare uno spazio ridotto e sono perciò a ridotta distanza. L'intuizione che si vuole confermare è che la catalisi offerta dal nostro sistema possa essere tanto più efficace quanto più multivalente è il substrato. Per cui,

---

si vogliono condurre degli esperimenti sfruttando due tipi di substrato: dapprima l'HPNP, che possiede una sola carica negativa e un solo legame da idrolizzare; in seguito, un oligoRNA che possiede più cariche negative e quindi più legami fosfodiesterici da idrolizzare. Se l'ipotesi avanzata fosse corretta, il catalizzatore dovrebbe mostrare un'attività di gran lunga maggiore con il substrato multivalente, cioè nel caso in cui durante il meccanismo idrolitico si generino tra i due reagenti molteplici interazioni.



### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Sintesi di nanoparticelle di Au, eterofunzionalizzate con una miscela di due tioli differenti

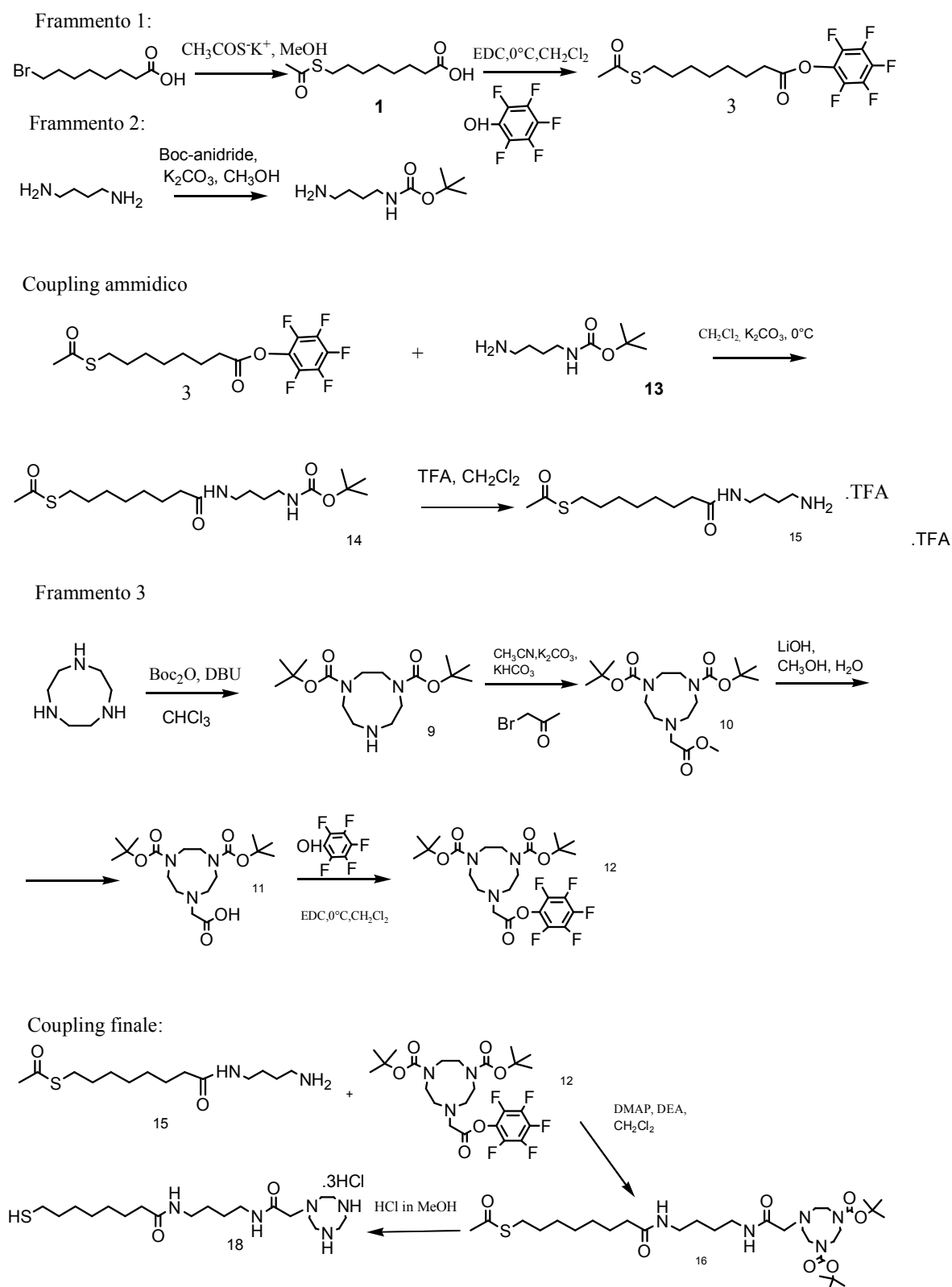
La prima parte del lavoro svolto consiste nella sintesi di due tioli, utilizzati poi, come mixed SAM (Self-Assembled Monolayer), per la copertura dei colloidi di Au. La progettazione della struttura chimica dei due tioli è dettata da esigenze specifiche: si vogliono due molecole che presentino struttura e lunghezza di catena simile, in modo tale che la loro affinità nei confronti delle nanoparticelle d' Au sia la medesima<sup>30</sup>. Per questo motivo, i due tioli presentano la stessa catena alchilica legata alla funzione tiolica terminale.

Inoltre, uno dei due tioli deve essere attivo ai fini della catalisi e quindi presentare l'1,4,7-triazaciclononano, nella posizione più conveniente possibile, ossia all'estremità  $\omega$ . Infatti, le unità terminali sono esposte all'interfaccia nanoparticella/soluzione e quindi più facilmente raggiungibili dai reagenti. Inoltre, essendo legati alla superficie metallica, i tioli sono forzati a condividere uno spazio ridotto: i gruppi funzionali terminali di tioli diversi sono molto prossimi e diviene così possibile la realizzazione di fenomeni di cooperatività.

L'altro componente la miscela, invece, non deve presentare attività catalitica, ma, semmai, avere una struttura tale da rendere più facilmente solubili le NP in acqua; si procede così alla sintesi di un tiolo con una catena TEG.

##### 3.1.1 Sintesi del tiolo 18, TACN-TIOLO

La molecola in questione presenta ad un'estremità la funzione tiolica, che consente di sviluppare forte affinità nei confronti della superficie metallica, mentre, all'altra, vede la poliammina ciclica, sito di complessazione dello  $Zn^{2+}$ . La sintesi del tiolo in questione è schematizzata di seguito (prodotto numero 18).



Schema 3.1

La molecola finale è sintetizzata tramite reazioni di coupling ammidico tra tre frammenti ottenuti separatamente:

Sintesi frammento 1:

Si ottiene l'acido  $\omega$ -tioacetilottanoico (**1**) per attacco nucleofilo dell'acido tioacetico, deprotonato dal metilato di sodio, all'acido 8-bromoottanoico. Affinché la reazione di coupling successiva avvenga rapidamente e con una resa elevata, si attiva poi la funzionalità carbossilica, trasformando l'acido nell'estere attivo (**3**) e dotandolo quindi di un gruppo uscente migliore.

Sintesi frammento 2:

Il 4-diamminobutano (commerciale) viene protetto ad una delle due funzioni amminiche con il gruppo *ter*-butilossicarbonile (Boc), per reazione con l'anidride corrispondente. Il Boc è resistente all'idrogenolisi catalitica, mentre viene facilmente rimosso in ambiente acido. Per far sì che solo uno dei due gruppi amminici sia protetto, si usa un rapporto anidride/diammina pari a 1:2. (resa finale 60%). Per eliminare i sottoprodotti inevitabilmente presenti, si effettua dapprima un'estrazione con una soluzione di acido acetico: sia il prodotto desiderato che la diammina non protetta si protonano e passano dalla soluzione organica di partenza a quella acquosa acida, mentre la diammina protetta ad entrambe le estremità rimane in diclorometano. Quindi, si estrae il prodotto desiderato dalla soluzione acquosa neutralizzata con diclorometano, mentre la diammina non protetta rimane nella fase acquosa.

Coupling frammento 1 e 2:

Si promuove quindi il coupling tra l'estere attivo dell'acido  $\omega$ -tioacetilottanoico (**3**) e la diammina protetta (**13**) appena sintetizzata, in presenza di  $K_2CO_3$  per mantenere basico il pH di reazione. Il gruppo protettore Boc è poi rimosso in ambiente acido (soluzione di TFA al 30%), ottenendo il prodotto **15** come trifluoroacetato.

Sintesi frammento 3:

Il TACN tricloroidrato commerciale viene protetto in modo selettivo con il gruppo *ter*-butilossicarbonile (Boc), molto usato nella protezione della funzione amminica.

La protezione selettiva del TACN avviene in presenza dell'anidride simmetrica del Boc in cloroformio a temperatura ambiente; l'aggiunta lenta dell'anidride del Boc (0.5 mmol/ora) consente di ottenere il prodotto di-protetto con una resa

molto buona (88%). Per purificare la molecola desiderata dai sottoprodotti inevitabilmente presenti (TACN non protetto, monoprotetto o triprotetto), ci si avvale di una colonna cromatografica.

Si procede con la sintesi del prodotto **10**: garantendo un pH di reazione basico con la presenza di  $K_2CO_3$  e  $KHCO_3$ , si assiste ad un rapido attacco nucleofilo dell'azoto del triazaciclononano al bromoacetato. L'estere ottenuto è facilmente idrolizzato con LiOH, a dare il prodotto **11**. A questo punto, per assicurare che la reazione di coupling ammidico successiva avvenga senza problemi, si sceglie, come prima, di attivare la funzione carbossilica, trasformandola nell'estere del pentafluorofenolo.

#### Coupling finale:

L'attacco nucleofilo della funzione amminica del prodotto **15** alla molecola precedente è reso più efficace dalla presenza della DMAP, che rende ulteriormente elettroneficiente la funzione carbossilica del frammento **3**; la presenza di DIEA assicura un pH basico.

Il tiolo protetto ottenuto dopo 15 ore di reazione (**16**) è purificato tramite flash-chromatography, con una resa finale pari al 64%.

#### Deprotezione finale:

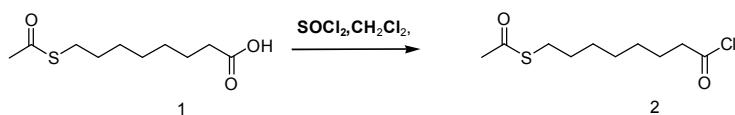
Poco prima della copertura delle nanoparticelle, è necessario rimuovere i gruppi protettori sia delle funzioni amminiche sul ciclo TACN, che della funzione tiolica; due sono le alternative tentate. In un primo caso, si rimuovono selettivamente i gruppi Boc del ciclo, utilizzando una soluzione al 30% di TFA, acido troppo debole per rimuovere anche l'acetile (che invece viene rimosso in seguito in ambiente basico per metilato di sodio). Tuttavia, per rendere più snelle le operazioni di preparazione, risulta più semplice avviare una deprotezione totale usando un acido più forte: ciò consente inoltre di evitare la formazione sgradita di disolfuri (che avviene invece in condizioni basiche).



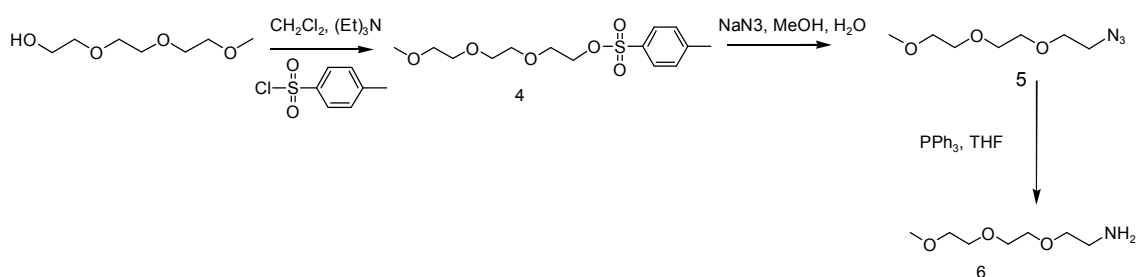
### 3.1.2 Sintesi del tiolo 8, TEG-TIOLO

Viene riportata nello schema la via di sintesi seguita per l'ottenimento del tiolo desiderato:

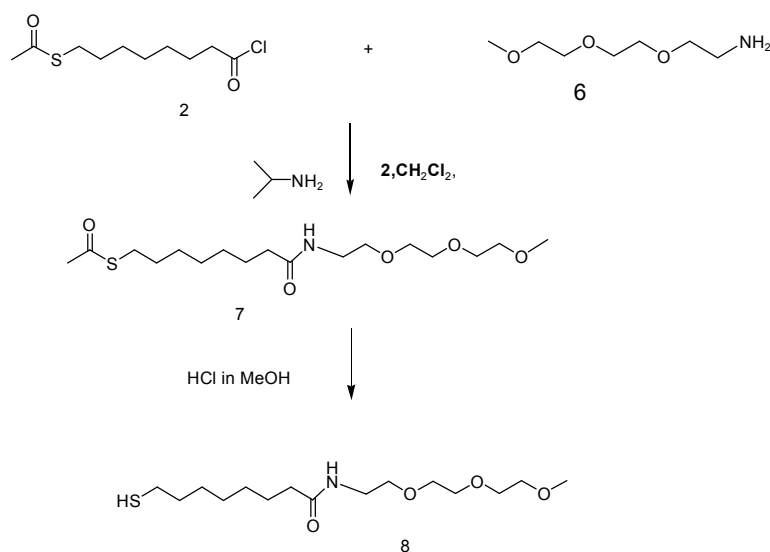
Frammento 1:



Frammento 2



Coupling tra i due frammenti:



Schema 3.2

Anche in questo caso, il prodotto finale è ottenuto a seguito di un coupling ammidico tra due frammenti separatamente sintetizzati:

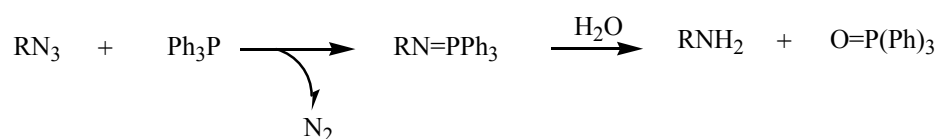
### Sintesi frammento 1:

L'acido ω-tioacetilottanoico (**1**), sintetizzato come nella reazione precedente, è fatto reagire con tionil-cloruro, a ottenere l'alogenuro dell'acido, più reattivo ai fini del coupling amidico successivo.

### Sintesi frammento 2

Al fine di ottenere la 2-[2-(2-metossietossi)-etossi]-etilammina (**6**) partendo dal prodotto commerciale trietilenglicole monometil etero, è necessario effettuare più passaggi. Innanzitutto, si rende l'etere più reattivo nei confronti di una sostituzione nucleofila, dotandolo di un gruppo uscente migliore: per reazione con tosilcloruro, si assiste alla formazione del prodotto **5**. Il secondo passaggio consiste in una sostituzione nucleofila con sodio azide e permette di ottenere il composto **6**.

Per ottenere l'ammina finale è sufficiente ridurre l'azide in condizioni blande con trifetilfosfina a dare l'intermedio imminofosforano, il quale viene poi idrolizzato ad ammina dall'acqua (reazione di Staudinger):



Per eliminare la trifetilfosfina e il trifetilfosfinossido, si effettuano dei lavaggi della soluzione acquosa con toluene.

### Coupling amidico tra i due frammenti:

La formazione del legame amidico viene condotta in ambiente basico per la presenza di diisopropilammina; il grezzo ottenuto è purificato con colonna cromatografica.

### Deprotezione finale:

Come nel caso precedente, al fine di realizzare la copertura delle nanoparticelle, si deve deproteggere la funzione tiolica. Delle due sintesi tentate, quella che sfrutta un ambiente acido risulta notevolmente migliore, poiché si evita così la formazione di disolfuri.

### 3.1.3 Sintesi di nanoparticelle d'oro

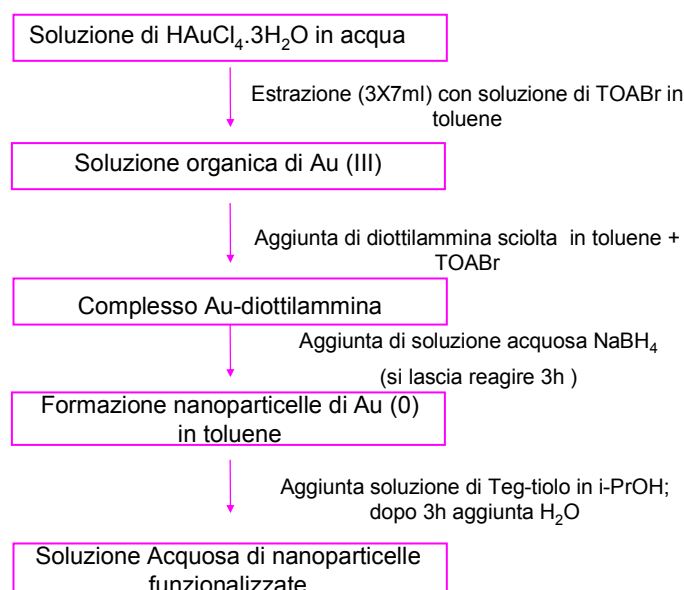
La scelta della via sintetica da seguire per la formazione dei colloidali di oro è dettata da più esigenze. Innanzitutto, si desiderano particelle dalle dimensioni ridotte, all'incirca 1.5-2 nm: ciò permette infatti di ottenere un rapporto componente organica/componente inorganica massimizzato; in questo modo si dispone di un potente sistema catalitico multivalente, caratterizzato da un numero molto elevato di siti catalitici vicini gli uni gli altri. Perciò è necessario avvalersi di un metodo sintetico che consenta il controllo e la modulazione della dimensione dei cluster.

Si vuole inoltre che la sintesi porti a formazione dei colloidali resistenti nel tempo all'aggregazione e solubili in acqua, mezzo in cui la maggior parte dei substrati su cui operano gli enzimi è solubile.

Infine, si necessita di un metodo di preparazione che permetta di guidare la copertura dei colloidali, in modo tale da ritrovare, sul substrato metallico, lo stesso rapporto tra i tioli imposto in soluzione.

Per tali ragioni, si sceglie di seguire la via sintetica proposta dal gruppo del professor Scrimin<sup>23</sup>, a cui sono state apportate lievi e non sostanziali modifiche. Diversamente dalla sintesi proposta da Brust e Schriffin<sup>24</sup>, tale metodica prevede di portare a formazione dei colloidali "nudi" e di passivarli solo successivamente con i tioli; ciò permette di conseguire gli scopi precedentemente descritti. Si riporta uno schema riassuntivo della procedura seguita:

## SINTESI DI NANOPARTICELLE DI DIAMETRO MEDIO PARI A 2 nm



Schema 3.3

Per soddisfare il primo requisito, la sintesi prevede l'aggiunta alla soluzione organica di Au (III) di una precisa quantità di diottilammina (per il calcolo si veda la parte sperimentale). Due sono i ruoli che la diottilammina svolge: consente di ottenere dei cluster dalla dimensione desiderata e stabilizza tali colloidali per un tempo ragionevole. Il meccanismo mediante il quale il rapporto diottilammina/metallo controlla la taglia delle nanoparticelle è noto in termini ancora qualitativi. Si imputa<sup>38</sup>, infatti, tale successo alla natura debole dei legami che le ammine sono in grado di formare con la superficie metallica: le specie si adsorbono e desorbono con rapidità in un equilibrio dinamico, tale da consentire il controllo sulle dimensioni del core.

La stabilità nel tempo dei colloidali si spiega, invece, chiamando in causa più ragioni<sup>39</sup>: l'ingombro sterico della diottilammina costituisce una barriera fisica che impedisce il contatto diretto tra due superfici metalliche; inoltre, la sua presenza può far variare la carica superficiale del cluster ed infine può abbassare l'energia libera e quindi la reattività dei colloidali. Il concorso di questi tre fattori rende notevolmente difficile il contatto tra nanoparticelle e quindi elimina il rischio di aggregazione.

Nostro intento è non solo ottenere cluster dalle dimensioni desiderate, ma anche far sì che la distribuzione delle dimensioni sia molto ridotta. Per far ciò,

il riducente,  $\text{NaBH}_4$ , è aggiunto il più velocemente possibile: ciò permette di avere una rapida nucleazione di tutti i colloidi di  $\text{Au}(0)$ , seguita da una loro lenta e uniforme crescita.

#### Copertura dei colloidi

Il passo successivo consta della rimozione del riducente e della passivazione delle nanoparticelle ottenute con la miscela di tioli precedentemente preparata.

Per questo lavoro di tesi, si necessita della sintesi di più batch di nanoparticelle che siano identiche per quanto riguarda la loro costituente inorganica, ma che si differenzino nella matrice organica di copertura. I colloidi, sintetizzati secondo la procedura descritta prima, sono quindi divisi in più porzioni e funzionalizzati contemporaneamente, realizzando in ciascuno batch il rapporto tioloTACN/tioloTEG che si desidera sia presente sulla superficie metallica. Si garantisce così che le nanoparticelle abbiano lo stesso diametro, essendo preparate insieme, e che non presentino grandi altre differenze, essendo contemporanea la loro sintesi.

La quantità totale di tioli introdotta in ciascun batch in sede di reazione deve essere il doppio rispetto a quella stechiometricamente richiesta (si veda la parte sperimentale per il calcolo), al fine di garantire che la copertura delle nanoparticelle avvenga in modo completo. Seguendo queste direttive, si preparano i seguenti batch di nanoparticelle:

| <b>Batch</b>   | <b>%TEG<sup>i</sup></b> | <b>%TACN<sup>i</sup></b> |
|----------------|-------------------------|--------------------------|
| TEG            | 100                     | 0                        |
| A <sub>1</sub> | 95                      | 5                        |
| A <sub>2</sub> | 90                      | 10                       |
| A              | 80                      | 20                       |
| B              | 60                      | 40                       |
| C              | 40                      | 60                       |
| D              | 80                      | 20                       |
| E              | 0                       | 100                      |

---

<sup>i</sup> Le percentuali qui riportate rappresentano i rapporti tra i due tioli realizzati in soluzione; sono di fatto i valori che idealmente ci si aspetterebbe nel monolayer.

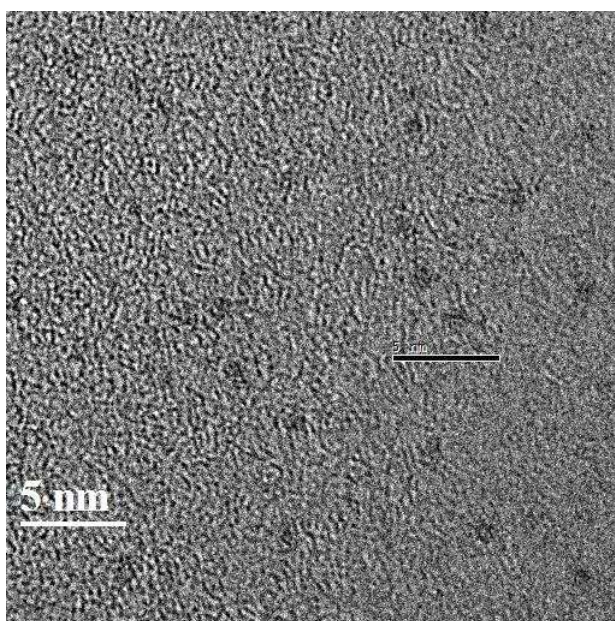
I lavaggi finali della soluzione acquosa in cui sono disciolte le NP permettono di rimuovere tutti i reagenti ancora presenti in soluzione, ma non adsorbiti sul colloide.

### 3.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle ottenute

Prima di procedere all'analisi dell'efficienza catalitica delle nanoparticelle sintetizzate, si rende necessaria una completa caratterizzazione delle stesse. Si procede dunque all'acquisizione di informazioni sia per quanto riguarda la componente inorganica (analisi TEM), sia per ciò che concerne la componente organica (analisi  $^1\text{H-NMR}$  e UV/Vis) ed infine si quantifica il rapporto tra le due (analisi termogravimetrica).

#### 3.2.1 TEM

L'analisi TEM dei campioni è stata effettuata dal professor Stefano Polizzi dell'Università di Venezia. Purtroppo, non si è ancora in grado di disporre delle immagini TEM definitive, devono ancora essere perfezionate. Si riporta quindi, a titolo di esempio, l'immagine provvisoria raccolta per il campione E:

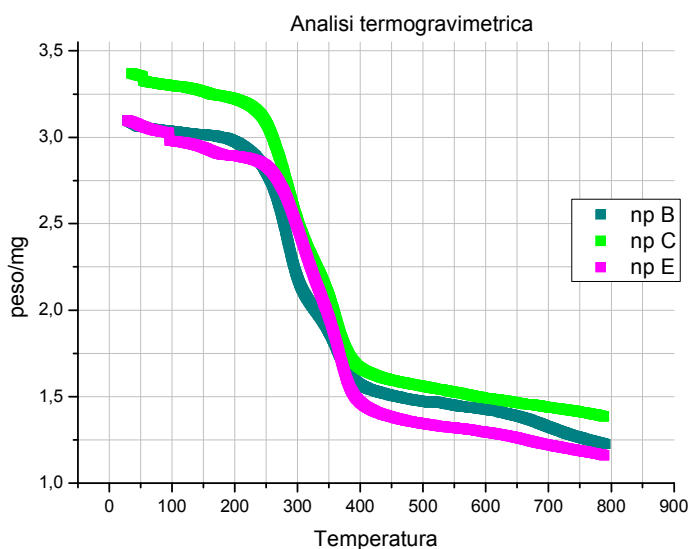


**Figura 3.4** Analisi TEM del campione E

Nonostante non sia ancora possibile quantificare con precisione il diametro medio delle NP e la dispersione dei dati, tuttavia si può già valutare qualitativamente la dimensione dei cluster sintetizzati. Prendendo come riferimento la scala riportata, si può affermare che le NP abbiano diametro ridotto, sull'ordine degli 1.1-1.3 nm.

### 3.2.2 TGA

L'analisi termogravimetrica consente di quantificare il peso percentuale della matrice organica rispetto al peso totale. Si riportano le curve ottenute per i tre batch analizzati (B, C ed E).



**Figura 3.5** Analisi termogravimetrica relativa ai batch B, C ed E.

Le curve registrate presentano andamento molto simile: la perdita consistente di peso si verifica tra i 200 ed i 400°C, a causa della combustione della matrice organica.

L'analisi dei dati consente di calcolare la percentuale in peso della parte organica rispetto al peso totale. Poiché si ha a disposizione la relazione matematica che collega il rapporto (atomi di Au)/(molecole di tiolo) con il raggio

delle nanoparticelle<sup>40,ii</sup>, la conoscenza dei dati ricavati dall'analisi termogravimetrica consente di calcolare il diametro dei cluster ottenuti.

Si riportano in tabella 3.6 i valori calcolati:

**Tabella 3.6** Elaborazione dei dati sperimentali ricavati dalla TGA.

| <b>Batch di NP</b> | <b>PM matrice organica (g/mol)</b> | <b>% in peso matrice organica (TGA)</b> | <b>Diametro calcolato (nm)</b> |
|--------------------|------------------------------------|---|--------------------------------|
| B                  | 354                                | 48                                      | 1.2                            |
| C                  | 372                                | 49                                      | 1.1                            |
| E                  | 416                                | 51                                      | 1.1                            |

L'analisi dimostra che le nanoparticelle ottenute, essendo state sintetizzate insieme e separate poi solo per il processo di copertura, presentano la medesima componente inorganica: il diametro risulta lo stesso per tutti i campioni analizzati e le differenze tra essi sono ragionevolmente imputabili agli errori sperimentali.

Tramite la TGA si confermano inoltre le conclusioni tratte dall'analisi TEM: il diametro dei cluster è molto ridotto; nonostante le dimensioni delle NP siano più piccole di quanto atteso, ciò non costituisce un problema o un ostacolo al loro utilizzo. Di fatto, si dispone così di sistemi in cui è massimo il rapporto tiolo/Au; infatti, dalle equazioni matematiche citate in precedenza (vedi nota a piè pagina), è noto che mentre il numero di atomi di Au aumenta con il cubo del raggio, il numero delle molecole di tiolo aumenta con il suo quadrato: il massimo rapporto tiolo/Au si realizza quindi a bassi valori di raggio della NP. Ciò è anche facilmente intuibile: all'aumentare delle dimensioni del cluster,

---

<sup>ii</sup> La relazione è la seguente:  $y=3.64x$ , con  $y$ =(atomi di Au/molecole di tiolo) e  $x$ =raggio della nanoparticella; tale equazione viene ricavata dal rapporto di altre due già note:

1. atomi di Au=283.72 (raggio NP)<sup>3</sup>;
2. molecole di tiolo= 77.91 (raggio NP)<sup>2</sup>



diminuisce la percentuale di atomi di Au presenti in superficie e quindi in percentuale diminuiscono i potenziali siti di attacco per i tioli.

### 3.2.3 Caratterizzazione della matrice organica tramite $^1\text{H-NMR}$

Al fine di caratterizzare completamente la componente organica delle nanoparticelle, si sono preparati i campioni di analisi sciogliendo una quantità nota di nanoparticelle in metanolo deuterato e si è proceduto all'acquisizione di più spettri  $^1\text{H-NMR}$ :

1. Spettro in assenza di gradiente di campo;
2. Spettro acquisito imponendo un gradiente di campo;
3. Spettro acquisito dopo 24 h dall'aggiunta di  $\text{I}_2$ .

1. La prima analisi consente di acquisire degli spettri in cui compaiono i picchi identificativi di tutte le molecole presenti nel campione, permettendo già a questo livello di distinguere i segnali delle molecole libere in soluzione da quelli delle molecole legate alle NP. Infatti, mentre i picchi delle molecole libere in soluzione appaiono stretti come nella norma, i segnali protonici delle molecole legate ai colloidi risultano allargati e tale fenomeno è tanto più evidente, quanto più il protone è prossimo alla superficie metallica. Quest'ultima evidenza sperimentale deve essere imputata a tre fattori: 1) all'allungamento del tempo di rilassamento spin-spin ( $T_2$ ), 2) alla presenza di diversità tra i vari siti di legame Au-tiolo nelle diverse parti del colloide (ciascun protone è quindi rappresentato da una distribuzione di chemical shifts) e 3) al gradiente di densità dei leganti tiolici andando dalla regione del core verso l'interfaccia nanoparticella-solvente.

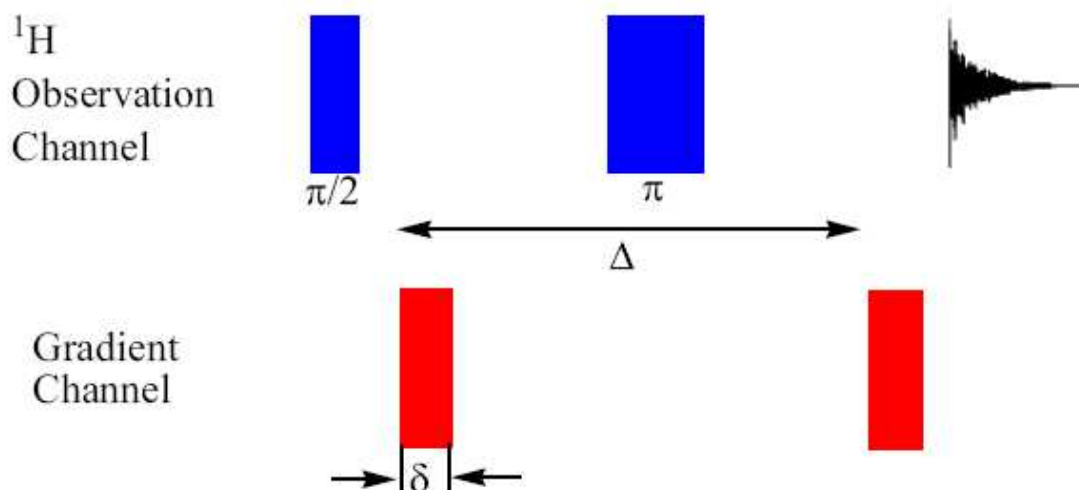
Oltre ai picchi allargati indicanti la presenza dei tioli nella matrice organica delle NP, nella quasi totalità dei casi, si nota la presenza di diotilammina non perfettamente rimossa (picchi con  $\delta$  a 0.92, 1.31, 2.17 ppm), unita

eventualmente al tensioattivo tetraottil-ammonio bromuro usato in sede di sintesi (picchi con  $\delta$  a 0.92, 1.31, 2.17 e 3.20 ppm).

Già con questa analisi, si può, dall'integrazione delle aree dei picchi distintivi dei due tioli, ricavare la percentuale di TACN nella matrice organica di copertura delle NP.

Si riporta un esempio di uno spettro di tale tipo nella figura 3.7.

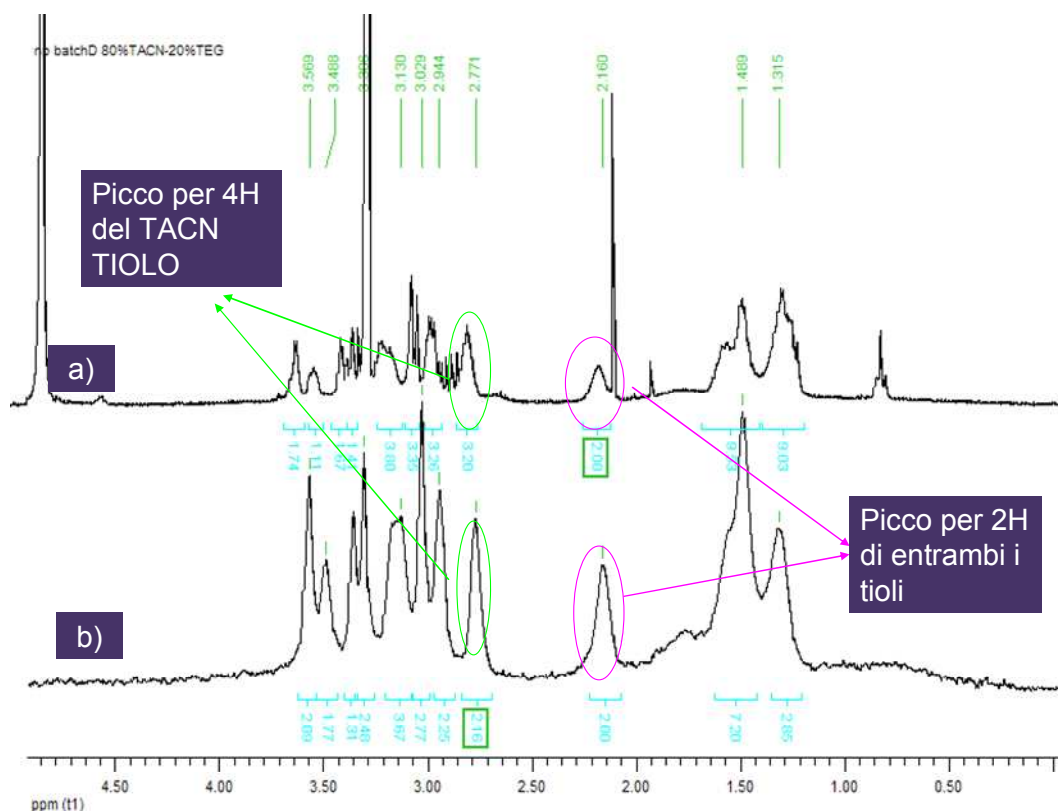
2. Con la seconda analisi si confermano le informazioni acquisite dagli spettri precedenti. In un'analisi NMR tradizionale il campo magnetico  $B_0$ , parallelo al vettore magnetizzazione, viene mantenuto costante; in questo caso, invece, si impone un gradiente monodimensionale del campo  $B_0$ , in una sequenza particolare di impulsi che può essere così schematizzata:



La sequenza ha inizio con un impulso del campo di eccitazione  $B_1$  per ruotare il vettore magnetizzazione di  $90^\circ$ , parallelo al piano  $xy$ ; questa operazione viene velocemente seguita dalla realizzazione di un gradiente del campo  $B_0$  lungo l'asse  $z$  per un dato intervallo di tempo  $\delta$ . Quindi la tecnica utilizzata (spin echo) prevede che dopo un tempo  $\Delta$  si imponga un nuovo impulso di  $B_1$  a  $180^\circ$ , per rifocalizzare tutti gli spin, ed infine che si abbia un nuovo gradiente lineare di  $B_0$ . Questa successione di operazioni consente di registrare selettivamente solo i segnali di quelle molecole che, avendo elevate dimensioni, diffondono a bassa velocità e quindi rispondono più lentamente alle variazioni del campo magnetico.

Dal confronto tra questo spettro e quello precedentemente registrato, si individuano quindi quali molecole siano effettivamente legate alla NP e si conferma quanto ipotizzato nell'analisi precedente. Inoltre, si può calcolare il rapporto tra i due tipi di tioli presenti sul colloide. Il calcolo in questione richiede dapprima l'esame degli spettri relativi al batch TEG e al batch E (100% TACN), che consente di ottenere i rapporti tra le aree dei loro picchi distintivi (TEG:  $\delta=3.6$  ppm che rappresenta 10 idrogeni; TACN:  $\delta=2.8$  ppm relativo a 4 H) rispetto ad un segnale comune ai due tioli (picco a  $\delta=2.16$  ppm, che integra per 2H). Si deve effettuare questa operazione preliminare poiché, a causa dell'allungamento del tempo di rilassamento spin-spin, soprattutto per ciò che riguarda i protoni più vicini al core metallico, i picchi sono molto allargati e gli integrali possono anche non corrispondere al reale rapporto tra i protoni nella molecola. Eseguito il primo calcolo descritto, per ciascun batch si calcola poi il rapporto tra le aree precedentemente citate e lo si divide per il valore ottenuto per le NP al 100% TACN; tale quoziente corrisponde alla percentuale di TACN nella matrice organica.

Si riportano a titolo di esempio i due tipi di spettri registrati per il batch D:



**Figura 3.7** Analisi  $^1\text{H}$ -NMR senza gradiente (a) e con gradiente di campo (b) effettuate per il batch D

Esempio di calcolo:

Spettro TACN 100%:

Rapporto tra (picco a  $\delta=2.8$  ppm/picco a  $\delta=2.16$ ) = 1.35

Spettro TEG 100%:

Rapporto tra (picco a  $\delta=3.6$  ppm/picco a  $\delta=2.16$ ) = 9

Spettro batch D

Rapporto tra (picco a  $\delta=2.8$  ppm/picco a  $\delta=2.16$ )=1.08

↓

**%TACN =  $(1.08/1.35) \times 100 = 80\%$**

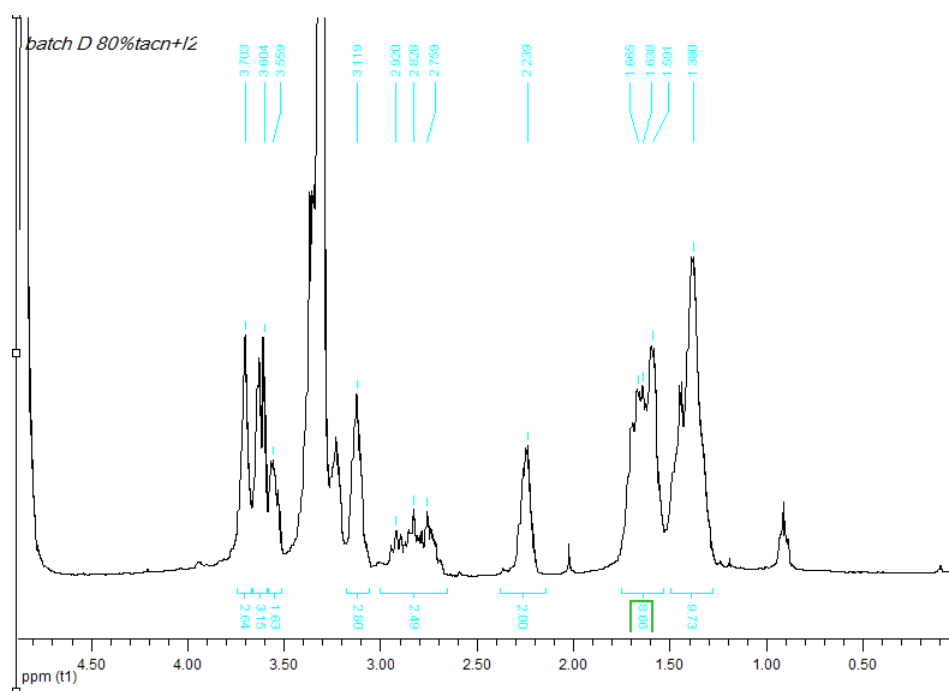
Rapporto tra (picco a  $\delta=3.6$  ppm/picco a  $\delta=2.16$ ) = 1.93

↓

**%TACN =  $[1-(1.93/9)] \times 100 = 78\%$**

3. Per avere ulteriore conferma del calcolo appena citato, si esegue una terza analisi. Si introduce una piccola quantità di  $I_2$  nei tubi NMR e si attendono 24 ore. Durante questo intervallo di tempo, l'azione ossidativa svolta dal reagente permette la disgregazione del colloide di Au, il distacco dei tioli e la conseguente formazione di disolfuri misti e non<sup>41</sup>. All'analisi NMR compaiono quindi i picchi distintivi dei due tioli, senza gli effetti di broadening sopra citati: la misura delle aree sottese ai picchi di interesse permette, ancora una volta, di calcolare il rapporto relativo tra i tioli presenti sulle NP.

Si riporta, a titolo di esempio, lo spettro raccolto per il Batch D.



**Figura 3.8** Spettro del Batch D a 24 ore dall'aggiunta di iodio.

Si riportano nella tabella 3.9 i valori dei rapporti tra i due tioli nel SAM.

**Tabella 3.9** Percentuali di TACN nel monolayer calcolate grazie alle tre analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

| Batch di NP    | % TACN attesa | % TACN da analisi 1 | % TACN da analisi 2 | % TACN da analisi 3 |
|----------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| A <sub>1</sub> | 5             | --                  | 4                   | 5                   |
| A <sub>2</sub> | 10            | --                  | 9                   | 10                  |
| A              | 20            | 20                  | 15                  | 15                  |
| B              | 40            | --                  | 40                  | 34                  |
| C              | 60            | 52                  | 60                  | 54                  |
| D              | 80            | 77                  | 79                  | 72                  |

La percentuale di TACN definitiva non è data dalla media matematica delle tre calcolate mediante i rispettivi esperimenti. Soprattutto per quanto riguarda i batch caratterizzati da un basso valore di TACN, si è fatto maggiore affidamento sui dati acquisiti tramite l'esperimento con  $\text{I}_2$ : questi spettri mancano infatti degli effetti di broadening inevitabilmente presenti negli altri e il calcolo dei rapporti tra i picchi risulta quindi più affidabile e preciso.

I dati costituiscono una conferma dell'efficacia della via di sintesi: si è raggiunto con successo lo scopo prefissato di ottenere nella matrice organica di copertura un rapporto tra i due tioli che rifletta, in maniera accettabile, quello presente in sede di preparazione delle NP.

Tuttavia, è da notare che la percentuale di TACN è in tutti i casi più bassa rispetto a quella attesa: tale evidenza sperimentale può essere in parte imputata all'intervento di un errore sistematico non riconosciuto, ma si può anche giustificare diversamente. Come analizzato da alcuni studi<sup>42</sup>, il coadsorbimento di due tioli di differente lunghezza su una superficie metallica piana o curva porta alla formazione di un monolayer che è spesso più ricco nella molecola dalla catena alchilica più lunga. La ragione di tale evidenza sperimentale potrebbe essere ritrovata nel meccanismo di formazione del monolayer, in cui giocano una grande influenza non solo le energie di legame Au-tiolo, ma anche le energie di interazione debole tra catene laterali. E' chiaro che un tiolo dalla maggior lunghezza vede un maggiore contributo di stabilità, dato da queste interazioni laterali, e quindi viene preferibilmente adsorbito. Inoltre, l'adsorbimento può essere notevolmente influenzato anche da ragioni di ordine sterico: molecole meno ingombrate possono essere più favorite nell'occupazione dei siti di legame. Nel nostro caso il tiolo più lungo e meno ingombro è il TEG, che di fatto, seppur di poco, risulta più abbondante di quanto atteso.

### 3.2.4 Analisi UV-Vis

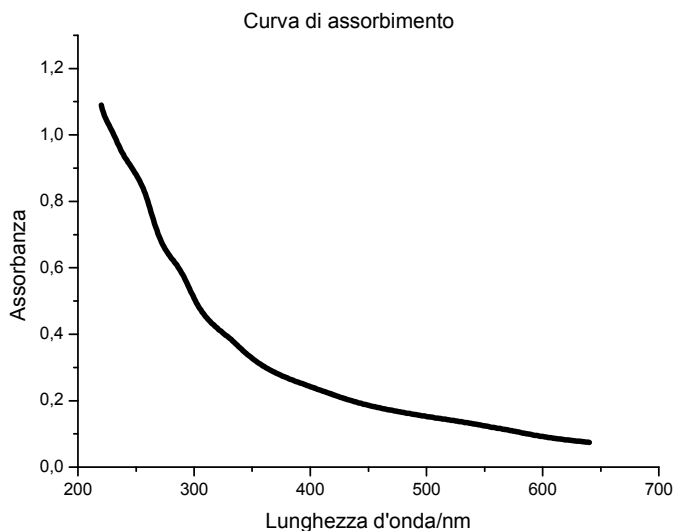
#### Concentrazione di NP a 264 nm

Per l'esecuzione degli esperimenti cinetici, per ciascun tipo di nanoparticelle sintetizzato, si preparano le soluzioni madre, sciogliendo un'opportuna quantità di NP in acqua milliQ.

Un primo metodo di caratterizzazione di tali soluzioni acquose consiste nella misura della loro assorbanza a 264 nm contro un bianco di acqua e tampone,

per valutare qualitativamente la concentrazione in NP delle stesse (I valori raccolti vengono riportati nella tabella 3.12).

Inoltre, dall'analisi degli spettri (figura 3.10) si può confermare quanto concluso grazie alle analisi TGA e TEM: l'assenza della SPB (Surface Plasmon Band)<sup>20,b</sup> a 520 nm indica che il diametro delle NP è sicuramente inferiore a 2 nm.



**Figura 3.10** Curva di assorbimento registrata per il campione A<sub>1</sub>.

### **Titolazioni spettrofotometriche con Cu(II)**

Si è provveduto poi a misurare la concentrazione di TACN delle stesse soluzioni, tramite titolazione spettrofotometrica con Cu(II). Il rame forma con il TACN un complesso con stechiometria 1:1, il cui massimo di assorbimento si presenta a 264 nm. Ciò permette d'eseguire una titolazione spettrofotometrica, a seguito della quale si raccolgono i dati di assorbanza a 264 nm, li si correggono per il fattore diluitivo e si procede all'elaborazione.

Si riporta, come esempio, il grafico di titolazione ottenuto per il batch E:

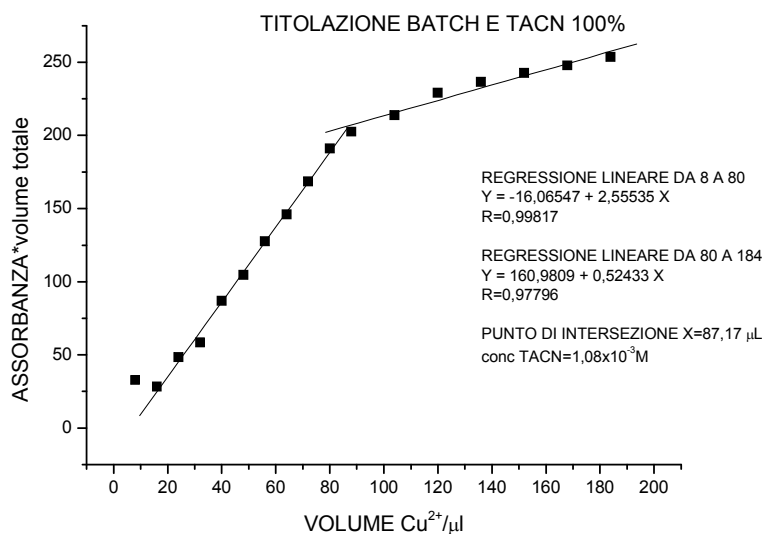


Figura 3.11 Grafico di titolazione ottenuto per il batch E

L'andamento crescente dei primi punti raccolti trova giustificazione nel forte aumento di assorbanza causato dalla formazione del complesso  $\text{Cu}^{2+}$ -TACN, il cui coefficiente di estinzione molare a 264 nm è pari a  $7800 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Una volta raggiunto il punto di fine, ossia una volta che tutto il TACN è stato titolato, l'assorbanza aumenta ancora, ma con pendenza notevolmente inferiore: il rame aggiunto in eccesso non viene complessato e rimane libero in soluzione, presentando un coefficiente di estinzione molare pari solo a  $800 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Il confronto tra i dati di assorbanza delle nanoparticelle e le concentrazioni calcolate può dare una conferma delle percentuali di TACN, valutate precedentemente con analisi  $^1\text{H-NMR}$ . Si calcola per tutti i campioni il rapporto tra la loro assorbanza e quella del Batch E (si utilizzano i dati relativi all'assorbanza delle nanoparticelle a 264nm); si procede quindi al calcolo del rapporto tra la concentrazione di ogni batch e quella del batch E. Il quoziente tra il primo e il secondo valore rappresenta la percentuale di TACN nel SAM di copertura.



Si riportano nella tabella 3.12 i dati raccolti e le percentuali calcolate per ogni batch di NP.

**Tabella 3.12** Presentazione dei dati ottenuti tramite analisi Uv-Vis.

| <b>Batch di NP</b>         | <b>NP/mg pesati<br/>e sciolti<br/>In 2 ml<br/>di H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub></b> | <b>Assorbanza<br/>a 264nm<br/>(conc. NP)</b> | <b>Concentrazione<br/>TACN (x10<sup>-4</sup>M)</b> | <b>%TACN<br/>calcolata</b> |
|----------------------------|--|--|--|----------------------------|
| A <sub>1</sub> (Tacn 5%)   | 9.2*   | 0.86 <sup>#</sup>                            | (2.6 ± 0.3)  | 7                          |
| A <sub>2</sub> (Tacn 10%)  | 11.5*  | 1.85 <sup>#</sup>                            | (8.6 ± 1.9)  | 11                         |
| A (Tacn 15%)               | 5*   | 0.22   | (1.2 ± 0.2)  | 25                         |
| B (Tacn 34%)               | 2.9  | 0.94   | (6.4 ± 1.3)  | 31                         |
| C (Tacn 54%)               | 4.6*   | 0.19   | (2.3 ± 0.4)  | 56                         |
| D (Tacn 72%)               | 3  | 0.38   | (5.9 ± 1.0)  | 72                         |
| E (Tacn 100%)              | 1.5  | 0.50   | (10.9 ± 0.1)                                       | 100                        |
| E <sub>1</sub> (Tacn 100%) | 1.5*   | 0.22 <sup>#</sup>                            | (10.2 ± 0.9)                                       | 94                         |
| E <sub>2</sub> (Tacn 100%) | 1.5*   | 0.10   | (2.5 ± 0.4)  | 110                        |

\* Queste soluzioni sono state filtrate prima di procedere all'analisi.

<sup>#</sup> La titolazione di tali soluzioni è effettuata con 24 µl di soluzione di NP.

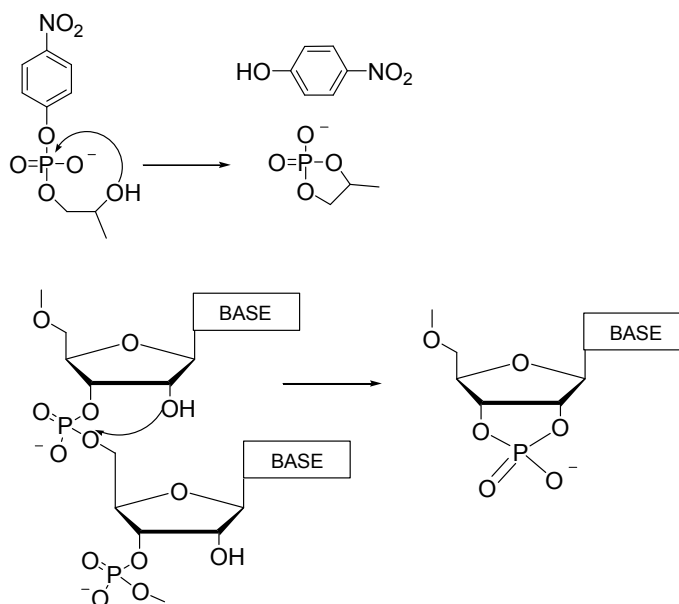
L'ultimo calcolo effettuato dà riprova della validità di tutte le misure, benché la percentuale di TACN misurata tramite <sup>1</sup>H-NMR e quella calcolata non siano coincidenti. Infatti, se si tiene conto degli errori sperimentali e della loro propagazione, si possono considerare buone le conclusioni tratte. Fa eccezione solo il batch A, dove i due valori di percentuale si differenziano in maniera significativa; l'errore potrebbe consistere proprio in un'errata valutazione della concentrazione di TACN, piuttosto che nella valutazione tramite NMR della percentuale del tiolo sul cluster.

### 3.3 Attività catalitica

Terminata la sintesi e la caratterizzazione delle nanoparticelle, si effettuano esperimenti cinetici allo scopo di definire l'efficacia di tali sistemi, quando essi vengano sfruttati come catalizzatori d'idrolisi del legame fosfodiesterico dell'HPNP, un analogo dell'RNA.

Il metallo, complessato dal TACN, usato negli studi cinetici è lo Zn(II), perchè è quello effettivamente presente nella stragrande maggioranza delle nucleasi. Inoltre, contrariamente a Cu(II), lo ione Zn(II) non presenta una chimica redox. Nel caso di applicazione del nostro catalizzatore a sistemi biologici, l'interferenza di una chimica redox nel processo degradativo di RNA (o DNA) potrebbe causare problemi di interpretazione. Inoltre, nel caso di applicazioni mediche, sistemi la cui attività sia dovuta a processi ossidoriduttivi danno luogo a prodotti secondari indesiderati perchè normalmente assai tossici.

Come già anticipato, come substrato di reazione, si è sfruttato l'HPNP (p-nitrofenil-2-idrossipropil-fosfato), un analogo dell'RNA. Anche se un modello non riflette necessariamente quanto accade nei sistemi naturali, può consentire di individuare i catalizzatori più promettenti sui quali concentrare l'attenzione. L'idrolisi della molecola di HPNP ha la caratteristica di avvenire attraverso un attacco intramolecolare da parte di un gruppo idrossilico, con formazione di un estere ciclico come intermedio. Per questo motivo, l'HPNP può essere considerato un buon modello per lo studio dell'idrolisi dell'RNA, che avviene con meccanismo analogo (Schema 3.13). Inoltre, l'impiego della molecola di HPNP in questo tipo di studi è vantaggioso in quanto, a seguito dell'idrolisi, si libera il p-nitrofenolato che assorbe a 400 nm, permettendo di seguire agevolmente l'avanzamento della reazione mediante misure spettrofotometriche.



**Schema 3.13** Meccanismo di idrolisi dell'HPNP e dell'RNA.

### 3.3.1 Cinetiche al variare della concentrazione di $Zn^{2+}$

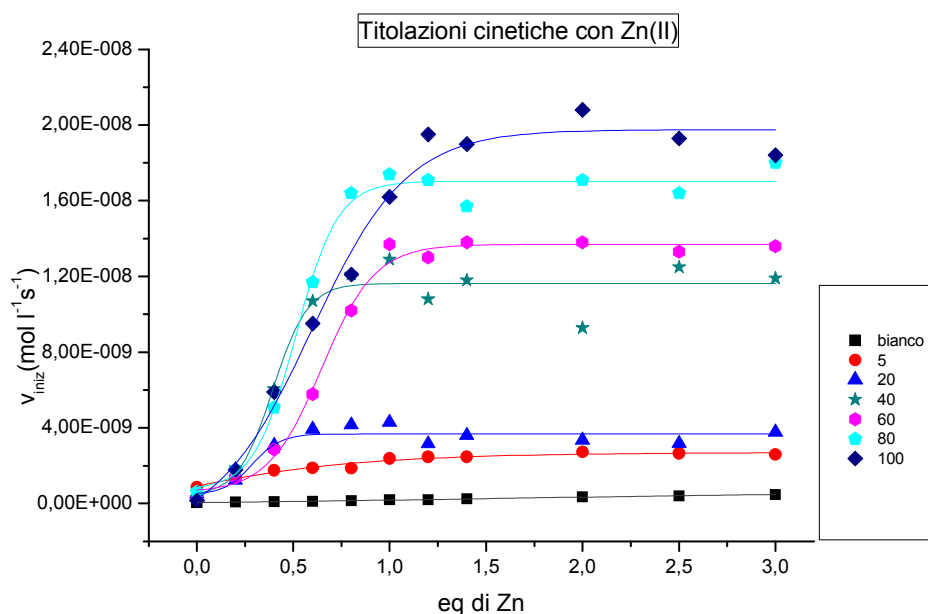
Attraverso questi esperimenti, si valuta come varia l'attività dei sistemi sintetizzati in funzione della concentrazione di  $Zn^{2+}$ . Inoltre si può sfruttare l'analisi per confermare o meno il titolo delle soluzioni, precedentemente misurato tramite titolazione spettrofotometrica con  $Cu^{2+}$ .

L'esperimento è condotto nelle seguenti condizioni:

- HEPES pH 7.5: 10 mM;
- HPNP: 0.2 mM;
- $Zn(NO_3)_2$ : da 0 a  $6 \times 10^{-5}$  M;
- TACN:  $2 \times 10^{-5}$  M.

Le cinetiche sono effettuate con un eccesso di substrato pari a 10 volte la concentrazione della NP, in modo da far lavorare il catalizzatore in condizioni di saturazione.

Per ogni tipo di NP analizzata, si costruisce un grafico riportando in ordinata le velocità iniziali e in ascissa gli equivalenti di  $Zn^{2+}$  aggiunti. I dati sperimentali sono riassunti nel grafico in figura 3.14.



**Figura 3.14** Andamento delle velocità iniziali in funzione degli equivalenti di Zn(II) aggiunti,  $[TACN]=2 \times 10^{-5}$  M,  $[HPNP]=2 \times 10^{-4}$  M. Le curve sono state tracciate per evidenziare l'andamento sigmoidale dei dati.

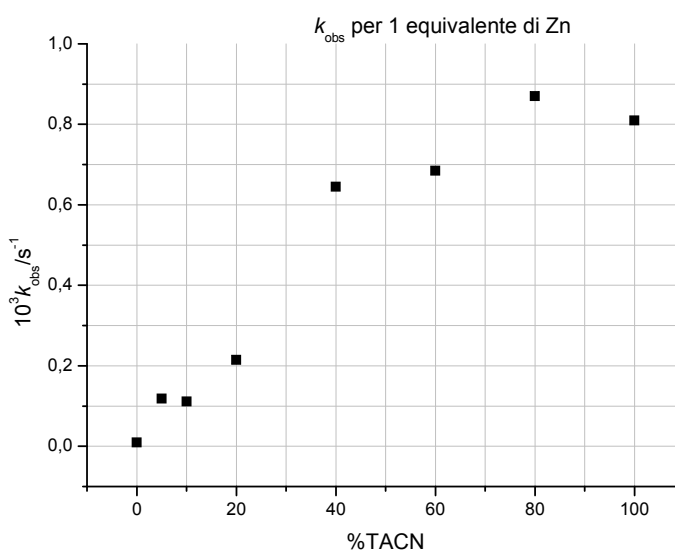
L'analisi dei risultati ottenuti fornisce le seguenti informazioni:

1. L'andamento dei dati può essere ragionevolmente rappresentato da una curva sigmoidale; ciò conferma che l'azione idrolitica sul substrato viene realizzata da due complessi  $Zn^{2+}$ -TACN vicini che operano cooperativamente (per le ipotesi di meccanismo si veda il paragrafo 1.4 dell'introduzione).
2. Tutte le curve, eccezion fatta per quella relativa al batch A, raggiungono plateau in corrispondenza di 1 equivalente di  $Zn^{2+}$ . Si conferma perciò che il complesso  $Zn^{2+}$ -TACN ha stechiometria 1:1; inoltre, ciò consente di validare il titolo della soluzione, precedentemente calcolato tramite titolazione con Cu(II). Infine, il fatto che l'attività del sistema non cresca, una volta saturati tutti i siti di complessazione, dimostra che lo  $Zn^{2+}$  libero ha attività idrolitica trascurabile.

Nel caso del batch A, si nota che il plateau viene raggiunto a 0.7 equivalenti di  $Zn^{2+}$ : il titolo della soluzione è quindi inferiore a quanto precedentemente stimato e viene ora posto pari a  $8.3 \times 10^{-5}$  M (in questo

modo si conferma anche la percentuale di TACN misurata tramite  $^1\text{H-NMR}$ ).

3. Benché per tutti gli esperimenti si sia realizzata la medesima concentrazione di TACN in soluzione, l'attività finale delle nanoparticelle cresce al crescere della percentuale di TACN nel SAM. A dimostrazione di ciò, si costruisce un grafico che riporta le costanti di velocità osservate per 1 equivalente di  $\text{Zn}^{2+}$  aggiunto, contro la percentuale di TACN nella matrice organica del colloide di Au (si ricorda che in tutti i batch si realizza la medesima concentrazione di TACN):



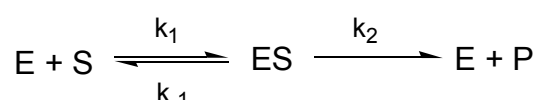
**Figura 3.15** Andamento delle costanti di velocità per 1 equivalente di Zn in funzione della percentuale di TACN nelle diverse NP,  $[\text{HPNP}] = 0.2 \text{ mM}$ ,  $[\text{TACN}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

A questo punto, il sistema deve essere ulteriormente analizzato, per metterne il luce le caratteristiche specifiche; in modo particolare si vuole:

- comprendere la relazione che lega l'ultimo risultato sperimentale presentato (figura 3.15) con la composizione del monostrato, ossia chiarire quale sia l'influenza della natura del monolayer sull'attività della NP;
- confermare che il sistema sintetizzato possa realmente essere considerato un catalizzatore biomimetico, che segue cioè un meccanismo simile a quello presentato dagli enzimi naturali.

### 3.3.2 Cinetiche al variare della concentrazione di HPNP (Michaelis-Menten)

Si effettuano degli esperimenti cinetici che valutino come cambiano le velocità iniziali d'idrolisi con la concentrazione del substrato HPNP. I catalizzatori biomimetici ideali dovrebbero possedere le caratteristiche cinetiche degli enzimi e seguire quindi uno schema catalitico di azione del tipo:



Dove  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  sono le costanti cinetiche rispettivamente per la reazione di interazione tra enzima e substrato a dare il complesso enzima-substrato ES, per la dissociazione del complesso, e per la formazione del prodotto a partire dal complesso 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, la costante di velocità  $k_2$  caratterizza lo stadio lento della reazione e la velocità di formazione del prodotto viene descritta dall'equazione proposta nel 1913 da Maud Menten e Leonor Michaelis:

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

- $V_0$ : velocità registrata all'inizio della reazione enzimatica ( $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
- $V_{\max}$ : velocità massima di catalisi, si ha in condizioni saturazione dell'enzima ( $\text{mol l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]_0$ .
- $K_M$ : costante di Michaelis-Menten, è una misura dell'affinità del substrato per l'enzima ( $\text{mol l}^{-1}$ ).
- $[S]$ : concentrazione del substrato espressa in ( $\text{mol l}^{-1}$ ).

Nell'ipotesi che la reazione d'idrolisi catalizzata dal complesso  $Zn^{2+}$ -NP segua una cinetica del tipo Michaelis-Menten, tali esperimenti consentono di calcolare i due parametri caratteristici del catalizzatore,  $k_{cat}$  e  $K_M$ .

$k_{cat}$  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  $V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0$ .

Invece,  $K_M$  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'affinità del substrato nei confronti dell'enzima: tanto più elevato è il valore di questa costante, tanto più piccola è tale affinità.

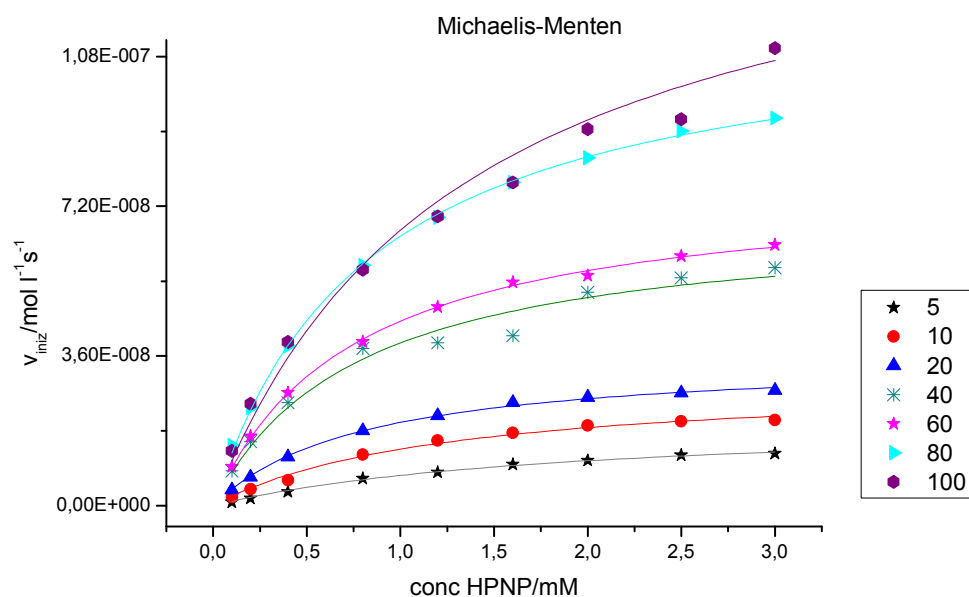
$k_{cat}/K_M$ : è una misura dell'efficienza dell'enzima a basse concentrazioni di substrato ed è quindi una misura della specificità dell'enzima nei confronti del substrato.

L'esperimento è condotto nelle seguenti condizioni:

- HEPES pH 7.5: 10 mM;
- HPNP: da 0.1 a 3 mM;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- TACN:  $2 \times 10^{-5}$  M.

Per realizzare la cinetica ci poniamo nelle condizioni di saturazione dei siti catalitici della NP da parte dello  $Zn(II)$ ; inoltre, scegliamo di realizzare la medesima concentrazione di TACN per tutti i batch analizzati: ciò significa che la quantità di NP, aggiunta per ciascun caso, aumenta al diminuire della percentuale di TACN presente nel monolayer corrispondente.

Si riportano nel grafico sottostante l'andamento delle velocità iniziali calcolate, nonché il loro fitting realizzato sfruttando l'equazione di Michaelis-Menten.



**Figura 3.16** Curve cinetiche relative a tutti i Batch di NP: andamento della velocità iniziale della reazione catalizzata in funzione della concentrazione di HPNP a pH=7.5,  $[\text{TACN}] = [\text{Zn}^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{M}$  ■: dati sperimentali —: fitting.

Si può affermare con sicurezza che l'andamento dei dati raccolti per ciascun batch di NP è ben descritto dal modello di Michaelis-Menten: nell'ambito dell'intervallo di concentrazione di HPNP considerato, il grafico presenta una curvatura, ad evidenziare la saturazione del sistema da parte del substrato. Tuttavia, essendo il nostro un sistema multivalente, per rendere lecito il fitting realizzato si deve fare una specificazione. L'equazione di Michaelis-Menten descrive il caso in cui una sola molecola di substrato S si lega al singolo sito catalitico di un enzima, E, con una costante di dissociazione  $K_M$ , e viene trasformata nel prodotto P, con una costante di velocità di primo ordine  $k_{cat}$ . Al contrario, un sistema multivalente è intrinsecamente diverso da un enzima singolo, poiché contiene una moltitudine di siti catalitici. Di conseguenza, in condizioni di saturazione, una grande quantità di molecole di substrato si lega al catalizzatore, dando un sistema  $\text{ES}_n$ . Il fitting dei dati ottenuti dai nostri esperimenti mediante l'equazione di Michaelis-Menten consente allora di ottenere valori composti di  $k_{cat}$  e  $K_M$ , alla cui definizione concorrono tutti i singoli eventi di binding e catalisi. Di fatto quindi i valori delle costanti



ricavati sono dei valori medi, dati dalla media dei valori relativi a tutti gli eventi catalitici del sistema.

Dal fitting dei dati, si ricavano i parametri desiderati per ciascun sistema di catalisi (tabella 3.17):

**Tabella 3.17** Parametri di Michaelis-Menten per i batch di NP.

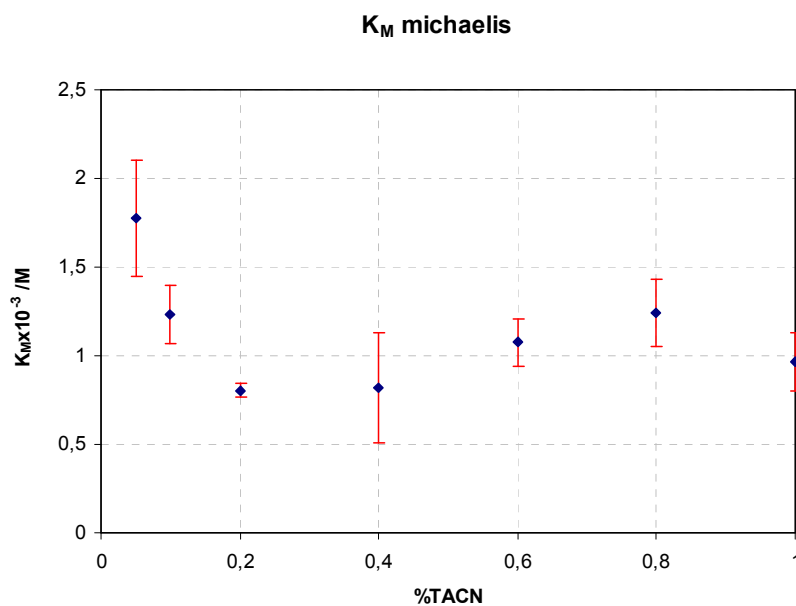
| Batch NP   | $k_{cat}$ ( $\times 10^{-3}/s^{-1}$ )                          | $K_M$ ( $\times 10^{-3}/mol\ l^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_M$<br>( $l\ mol^{-1}\ s^{-1}$ ) | $k_{cat}/k_{uncat\ a}$ |
|------------|--|--|--|------------------------|
| <b>A1</b>  | $1.0 \pm 0.1$  | $1.8 \pm 0.3$                          | $0.58 \pm 0.17$                            | 2882                   |
| <b>A2</b>  | $1.5 \pm 0.1$  | $1.2 \pm 0.2$                          | $1.2 \pm 0.2$                              | 6143                   |
| <b>A</b>   | $1.8 \pm 0.1$  | $0.80 \pm 0.04$                        | $2.2 \pm 0.1$                              | 11038                  |
| <b>B</b>   | $4.2 \pm 0.6$  | $0.82 \pm 0.31$                        | $5.1 \pm 2.6$                              | 25746                  |
| <b>C</b>   | $5.2 \pm 0.3$  | $1.1 \pm 0.1$                          | $4.8 \pm 0.7$                              | 24051                  |
| <b>D</b>   | $8.2 \pm 0.3$  | $1.2 \pm 0.2$                          | $6.6 \pm 1.1$                              | 32971                  |
| <b>E</b>   | $7.0 \pm 0.6$  | $0.96 \pm 0.16$                        | $7.3 \pm 1.7$                              | 36288                  |
| <b>TEG</b> | Non ha attività, per cui non si calcolano i parametri per esso |  |  |                        |

a= tale costante, calcolata eseguendo lo stesso esperimento senza NP, è pari a  $2 \times 10^{-7}\ s^{-1}$ .

A distanza di 21 giorni, l'esperimento appena descritto è nuovamente eseguito nelle stesse condizioni sperimentali. Lo scopo è verificare se sia eventualmente avvenuta una redistribuzione dei tioli sulla superficie metallica a dare dei domini, se precedentemente assenti, o se si sia verificata invece aggregazione dei colloidi di Au. I dati acquisiti dimostrano che l'attività delle nanoparticelle si mantiene costante nel tempo, non verificandosi né diminuzione dell'efficacia catalitica, né un aumento del potere idrolitico. Si può concludere allora che le soluzioni acquose di NP sono dei sistemi stabili: nel tempo non si registra né aggregazione delle NP, né redistribuzione dei tioli nel monolayer organico.

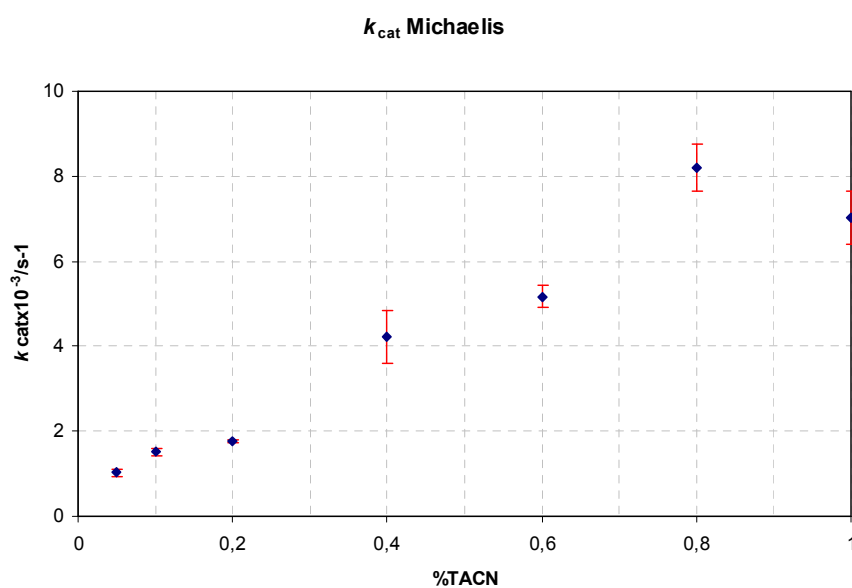
Con una prima analisi dei dati riportati in tabella, si può già evidenziare che tutti i sistemi catalitici sintetizzati sono decisamente attivi, i valori riportati di  $k_{cat}$  sono ben superiori agli analoghi calcolati per sistemi dendrimerici sintetizzati nei nostri laboratori<sup>43</sup> ( $k_{cat}=4.9 \times 10^{-4}\ s^{-1}$  per il dendrimero con maggior grado di funzionalizzazione con TACN).

Si vuole mettere ora in evidenza la relazione tra le costanti calcolate e la percentuale di TACN presente nel monolayer. A tale scopo si costruiscono i grafici 3.18, 3.19 e 3.20.



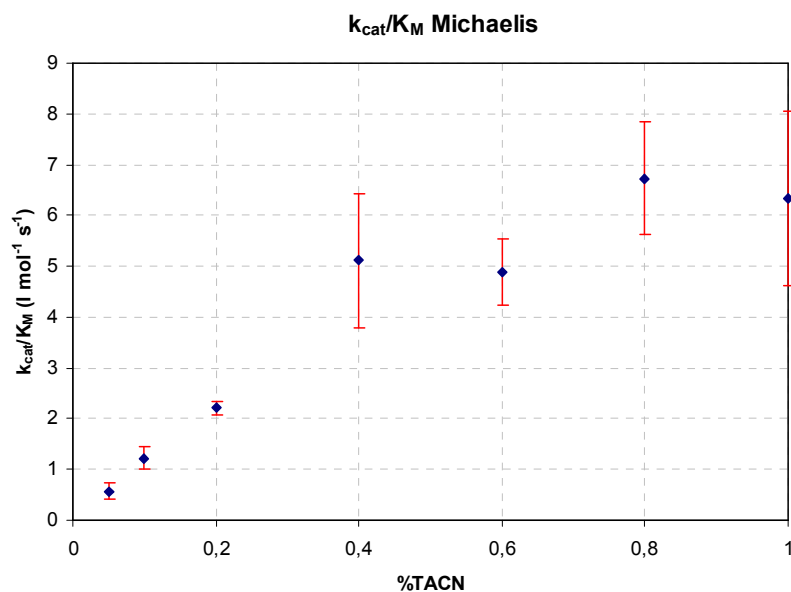
**Figura 3.18** Andamento della costante  $K_M$  in funzione della percentuale di TACN nel monolayer.

**$K_M$ :** Per quanto riguarda i casi analizzati, si assiste ad una diminuzione di  $K_M$  fino a che la percentuale di TACN nel monolayer non raggiunge il 20%, dopodichè la costante rimane pressochè la medesima per tutti gli altri batch. Ciò significa che l'affinità tra substrato ed enzima raggiunge valore massimo già ad una bassa percentuale di presenza di tiolo attivo nel SAM.



**Figura 3.19** Andamento della costante  $k_{cat}$  in funzione della percentuale di TACN nel monolayer.

$k_{\text{cat}}$ : Il grafico mette bene in evidenza l'andamento crescente della  $k_{\text{cat}}$  all'aumentare della percentuale di TACN sulle nanoparticelle, benché gli esperimenti si siano condotti ad una concentrazione costante di sistema catalitico. In più, si deve sottolineare che, anche a basse percentuali di TACN nel SAM (5-10%), non si assiste ad un crollo dell'attività catalitica, ma anzi la  $k_{\text{cat}}$  si mantiene su valori relativamente elevati.



**Figura 3.20** Andamento della costante  $k_{\text{cat}}/K_M$  in funzione della percentuale di TACN nel monolayer

$k_{\text{cat}}/K_M$ : Nel nostro caso, come conseguenza dell'andamento delle costanti precedenti, tale rapporto va aumentando all'aumentare della percentuale di TACN nella matrice organica. Tuttavia, l'aumento risulta relativamente modesto e il valore del rapporto si può dire pressoché costante, una volta che la percentuale di TACN sia pari al 50%.

Sulla base di tali dati, due sono le ipotesi che si possono avanzare per razionalizzare le evidenze sperimentali riscontrate:

1. Tioli della stessa natura chimica formano sulla superficie della nanoparticella dei cluster: la loro distribuzione sul colloide di Au non è uniforme, ma si individuano dei domini di un tiolo, confinanti con domini dell'altro tiolo<sup>34</sup>;
2. L'evento catalitico segue un meccanismo diverso, rispetto a quello presentato per i dendrimeri: si può ipotizzare che la matrice organica

idrofobica e la catena TEG giocano un ruolo nella promozione dell'idrolisi. Si può infatti pensare che, in assenza di due unità metalliche vicine, l'idrolisi si possa realizzare comunque tramite un processo cooperativo tra un'unità  $Zn^{2+}$ -TACN e il monolayer, che svolge ora il ruolo precedentemente attribuito al secondo  $Zn^{2+}$ .

Gli andamenti delle costanti cinetiche appena presentati, purtroppo, non riescono ad avvalorare una delle due ipotesi a scapito dell'altra, poiché possono essere ugualmente ben compresi, sia nel caso in cui si ammetta come valida la prima teoria, sia nel caso in cui si sostenga la seconda.

Infatti, se la prima ipotesi (sostenuta anche da altri gruppi di ricerca, vedi introduzione) fosse vera, le evidenze sperimentali da noi mostrate troverebbero una giustificazione che le comprenda tutte. Si spiegherebbe così l'evidente efficacia delle nanoparticelle: la presenza di domini consente, a parità di unità di TACN presenti, di avere un numero maggiore di siti catalitici bimetallici.

Inoltre, il fatto che  $K_M$  sia costante, al di sopra di una percentuale di TACN del 20%, significa che la concentrazione effettiva di siti di binding rimane costante<sup>iii</sup>. Se si avesse una distribuzione statistica, i siti di binding aumenterebbero all'aumentare della percentuale di TACN e quindi la  $K_M$  diminuirebbe; se viceversa si ammette che tutte le molecole attive di tiolo si concentrano in un'unica zona, a parità di concentrazione complessiva di TACN si dispone di un numero di siti bimetallici uguale per tutti i batch, di qui il valore costante di  $K_M$ .

Inoltre, un'ulteriore conferma dell'ipotesi viene dai valori raccolti per la  $k_{cat}$ : già al 5% le NP presentano attività elevata. Se la distribuzione dei tioli fosse statistica, per bassi valori di TACN nel monolayer, la probabilità di generare una coppia bimetallica sarebbe molto bassa e quindi l'attività del catalizzatore sarebbe altrettanto ridotta. Se, invece, si formano dei cluster, già ad una percentuale di TACN così piccola, si può avere una concentrazione relativamente elevata di siti attivi. Nell'ipotesi di formazione di domini, ci si

---

<sup>iii</sup> Si deve ricordare che, nel condurre l'esperimento, si impone una concentrazione di TACN costante nei diversi casi: ciò significa che per i sistemi a bassa percentuale di TACN sulla superficie, si deve aggiungere nel sito di analisi una maggiore quantità di NP.

aspetterebbe, d'altro canto, un'attività e quindi una  $k_{\text{cat}}$  costante per i diversi batch; tuttavia, si deve considerare l'effetto del confine: minore è la percentuale di TACN presente nel monolayer, più piccola è l'estensione del dominio e quindi più grande è il contributo dei tioli sul confine rispetto a quello dei tioli interni. Ne segue che, mentre i tioli all'interno del dominio sono contornati di tioli dello stesso tipo e quindi formano molteplici coppie catalitiche potenziali, i tioli sul confine hanno minori possibilità di interazione e quindi contribuiscono molto meno al processo catalitico: di qui la minore attività delle NP a basso contenuto di TACN.

L'ipotesi appena descritta non dipana completamente i dubbi riguardo il comportamento di tali sistemi catalitici; soprattutto, non risulta chiaro il motivo per cui tioli dalla struttura simile si dovrebbero disporre in domini, al momento della formazione dei colloidi di Au. Ci si può chiedere quindi se questa sia l'unica spiegazione ragionevole o se altre possano essere le ipotesi plausibili.

In effetti, i dati sperimentali possono essere altrettanto ben interpretati anche se si ammette che, come è più facile immaginare, la distribuzione dei tioli sia statistica.

Il valore costante della  $K_M$  si spiega avanzando l'ipotesi che il tiolo TEG o la matrice organica, pur essendo inattivi ai fini della catalisi, possano aiutare l'attacco dell'unità attiva al substrato e che la catalisi possa essere in tal caso avviata anche in presenza di una sola unità  $\text{Zn}^{2+}$ -TACN isolata. In questa ipotesi, la matrice organica assumerebbe un ruolo essenziale nel determinare un aumento notevole della concentrazione locale di substrato. Infatti, come un precedente studio svolto per il gruppo di Scrimin ha dimostrato<sup>44</sup>, il substrato viene stabilizzato e concentrato nel monolayer di copertura: la componente idrofoba dell'HPNP interagisce infatti con la catena  $\text{C}_8$  dei tioli, mentre il gruppo OH e gli altri costituenti polari vengono molto ben stabilizzati dalla presenza del TEG. Di conseguenza, si assiste ad un rapido aumento della concentrazione locale di substrato nel monolayer: l'HPNP risulta quindi molto più disponibile e vulnerabile nei confronti dell'attacco idrolitico.

Inoltre, si può eventualmente pensare che il TEG sia capace di svolgere uno dei ruoli ipotizzati per il secondo ione metallico, là dove esso sia assente: vista la sua capacità di coordinare  $\text{H}_2\text{O}$ , esso potrebbe favorire l'attacco del nucleofilo all'HPNP o causare opportune variazioni del pH. A questo punto, l'aver una distribuzione statistica dei due tioli non sarebbe uno svantaggio, ma permetterebbe a tutti i tipi di NP di ben complessare il substrato (di qui  $K_M$  costante).

L'ipotesi viene rafforzata anche dall'analisi del comportamento del batch D rispetto al batch E: l'attività del secondo è, contrariamente a quanto ci si aspetterebbe, inferiore a quella del primo; poiché la sola differenza tra i due è la presenza o meno del tiolo TEG nel monolayer, si può avanzare come spiegazione che quest'ultimo abbia un ruolo nel meccanismo di catalisi. (D'altra parte, è doveroso ricordare che esiste un'altra ragionevole spiegazione della diminuzione di attività del batch E rispetto al batch D: in condizioni di grande affollamento di TACN, come nel caso del primo batch, si formano facilmente specie, cataliticamente inattive, costituite dalla coordinazione di due  $\text{Zn}^{2+}$  ad una sola molecola di acqua).

L'andamento crescente delle  $k_{\text{cat}}$  si spiega comunque, pur ammettendo una distribuzione statistica: all'aumentare della percentuale di TACN nel SAM, risulta molto più probabile, anche in tale distribuzione, che due tioli si trovino l'uno vicino all'altro e che quindi l'attività catalitica sia più elevata. Il fatto che tale attività non cali drasticamente quando la percentuale di TACN è pari al 5 o al 10%, ossia quando in una distribuzione statistica non ci sono altro che TACN isolati sulla superficie metallica, fa presupporre che anche l'unità monometallica abbia potere catalitico. In tale caso, il ruolo ipotizzato per il secondo  $\text{Zn}^{2+}$ , viene svolto o dal TEG o dal monolayer idrofobo, come precedentemente descritto.

I soli dati finora raccolti non sono sufficienti a far preferire una tesi piuttosto che l'altra, per cui si procede con gli esperimenti cinetici.

### 3.3.3 Cinetiche di NP 100% TACN al variare del rapporto $Zn^{2+}$ -NP

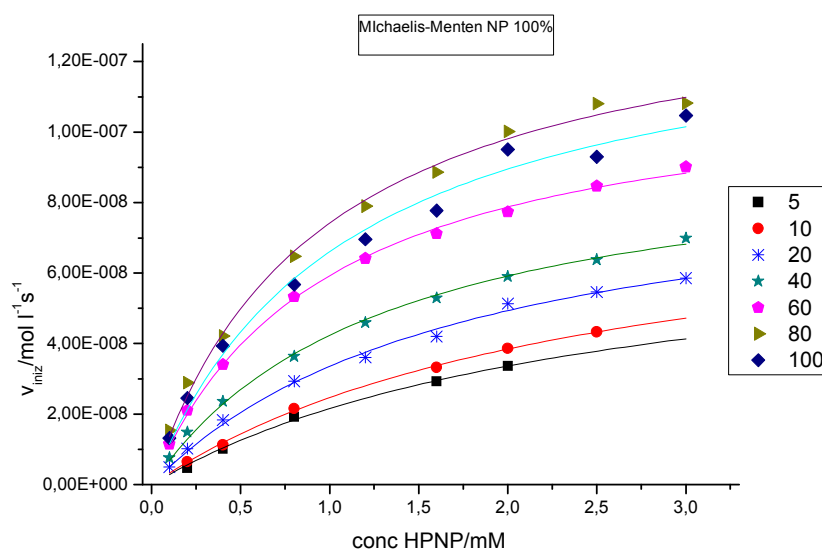
Si vogliono realizzare gli stessi gradi di funzionalizzazione visti nell'esperimento precedente, ma in maniera differente: non si sfruttano più nanoparticelle diverse, bensì si produce lo stesso effetto, utilizzando solo le NP 100% TACN e realizzando di volta in volta un diverso rapporto tra  $Zn^{2+}$  e NP. Si esegue un esperimento di Michaelis-Menten per ogni rapporto  $Zn^{2+}$ -NP desiderato (5-10-20-40-60-80-100%).

Si può ragionevolmente ipotizzare che la distribuzione dello  $Zn^{2+}$  nella NP sia statistica. Quindi il confronto tra i risultati ottenuti in questo esperimento e quelli dell'esperimento precedente dovrebbe fornire indicazioni sulla modalità con cui i due diversi tioli si distribuiscono sulla NP.

L'esperimento è condotto nelle seguenti condizioni:

- HEPES pH 7.5: 10 mM;
- HPNP: da 0.1 a 3 mM per ogni rapporto  $Zn^{2+}$ -NP;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Catalizzatore: da  $2 \times 10^{-5}$  M (rapporto  $Zn^{2+}$ -NP=1) a 0.4 mM (rapporto  $Zn^{2+}$ -NP =0.05).

Si riporta in grafico, per ciascun rapporto  $Zn^{2+}$ -NP realizzato, l'andamento delle velocità iniziali rispetto alla concentrazione di HPNP.



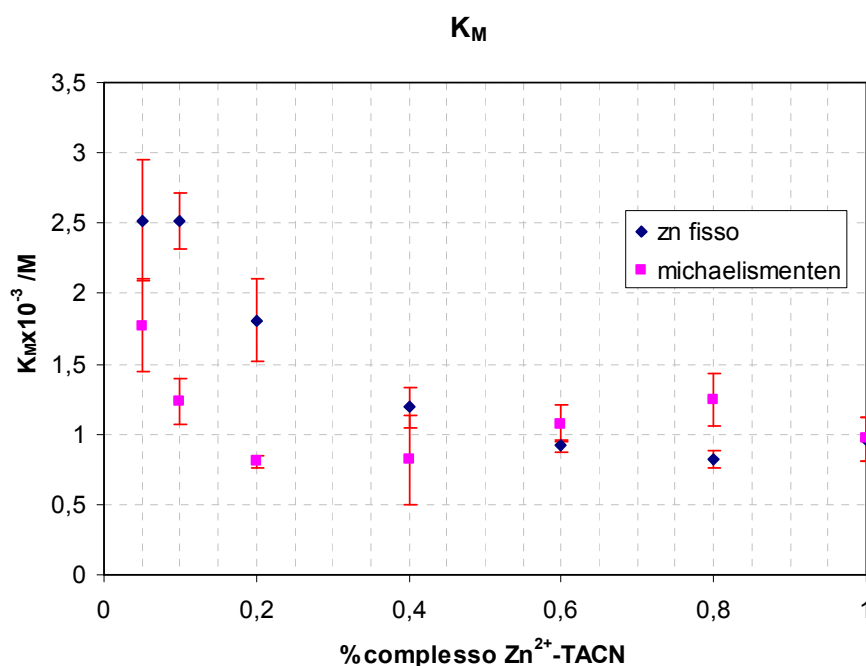
**Figura 3.21** Curve cinetiche relative a tutti i rapporti  $Zn^{2+}$ -NP 100% realizzati: andamento della velocità iniziale della reazione catalizzata in funzione della concentrazione di HPNP a pH=7.5,  $[Zn^{2+}] = 2 \times 10^{-5}$  M. ■: dati sperimentali —: fitting.

I dati vengono come prima fittati da una curva, la cui equazione rappresentativa è quella di Michaelis-Menten e si ricavano, per ciascun rapporto  $Zn^{2+}$ -NP realizzato, i valori di  $k_{cat}$  e  $K_M$  (tabella 3.22).

**Tabella 3.22** Parametri di Michaelis-Menten per i diversi rapporti Zn NP.

| Rapporto $Zn^{2+}$ -NP | $k_{cat}$ ( $\times 10^{-3}/s^{-1}$ ) | $K_M(\times 10^{-3}/mol\ l^{-1})$ | $k_{cat}/K_M$<br>( $l\ mol^{-1}\ s^{-1}$ ) | $k_{cat}/k_{uncat}^a$ |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------|
| 0.05                   | $3.8 \pm 0.4$                         | $2.5 \pm 0.4$                     | $1.5 \pm 0.4$                              | 19029                 |
| 0.1                    | $4.3 \pm 0.2$                         | $2.5 \pm 0.2$                     | $1.7 \pm 0.2$                              | 21729                 |
| 0.2                    | $4.7 \pm 0.3$                         | $1.8 \pm 0.3$                     | $2.6 \pm 0.4$                              | 23375                 |
| 0.4                    | $4.9 \pm 0.2$                         | $1.2 \pm 0.1$                     | $4.1 \pm 0.7$                              | 24500                 |
| 0.6                    | $6.4 \pm 0.1$                         | $0.92 \pm 0.05$                   | $6.9 \pm 0.4$                              | 31938                 |
| 0.8                    | $6.6 \pm 0.2$                         | $0.83 \pm 0.06$                   | $8.0 \pm 0.7$                              | 33000                 |
| 1                      | $7.0 \pm 0.6$                         | $0.96 \pm 0.16$                   | $7.3 \pm 0.9$                              | 35037                 |

Come prima, si costruiscono dei grafici che chiariscano quale sia l'andamento delle costanti in funzione del rapporto  $Zn^{2+}$ -NP. Poiché, grazie a questo esperimento, si sono create le medesime condizioni dell'esperimento precedente, per una migliore discussione, si riporta in grafico il confronto tra le due serie di dati raccolti.



**Figura 3.23** Andamento della costante  $K_M$  in funzione della percentuale di TACN complessato presente.



**K<sub>M</sub>**: In quest'ultimo caso, l'andamento della costante di binding è decrescente: la diminuzione è leggermente più pronunciata rispetto al caso precedente.

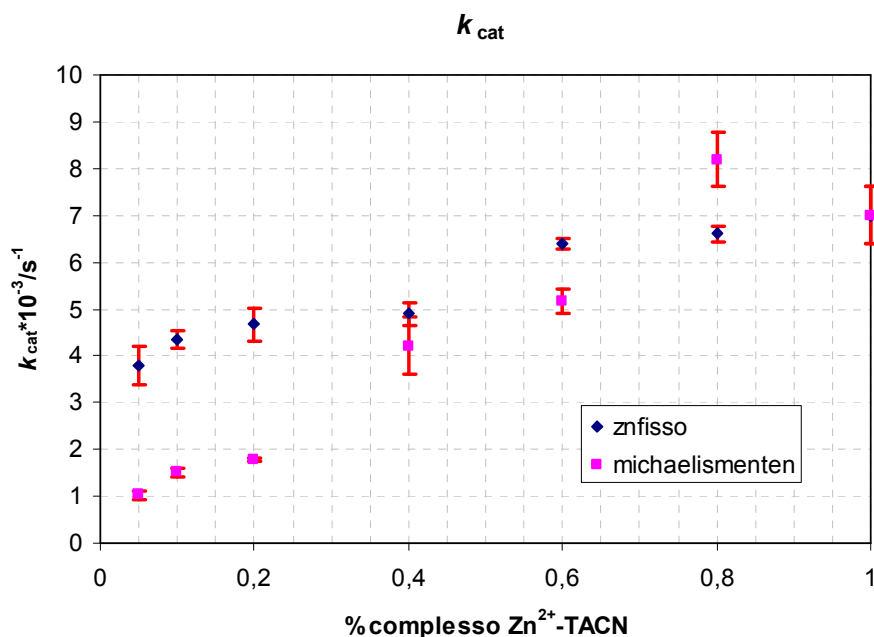


Figura 3.24 Andamento della costante  $k_{cat}$  in funzione della percentuale di TACN complessato presente.

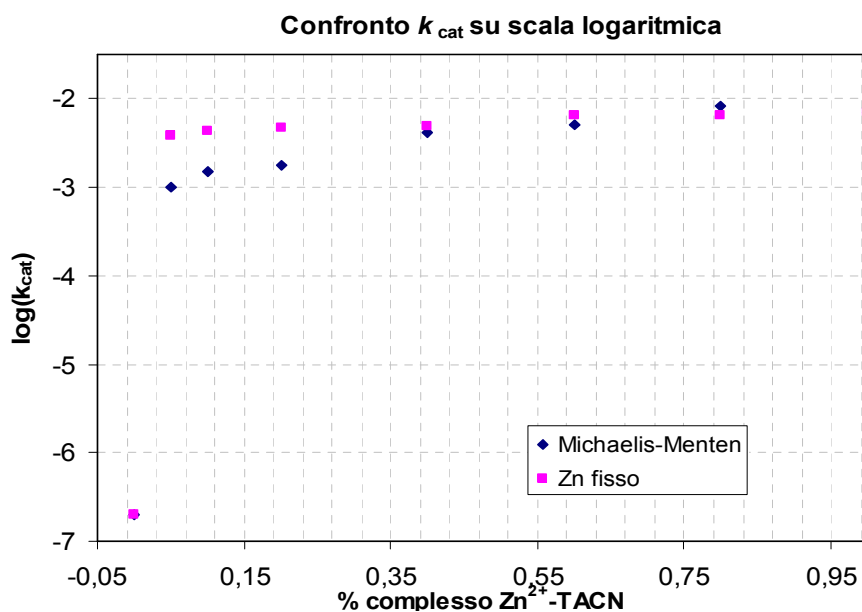


Figura 3.25 Confronto su scala logaritmica delle  $k_{cat}$  relative alle due serie di dati

**k<sub>cat</sub>**: Rispetto al caso precedente, si presentano ora valori più elevati (eccezion fatta per il rapporto 0,8). L'andamento delle costanti cinetiche calcolate in quest'ultimo esperimento può essere definito costante.

Dall'analisi del grafico in scala logaritmica risulta molto evidente che già a percentuali basse di TACN la velocità della reazione è circa 4 ordini di

grandezza più elevata rispetto al caso in cui il catalizzatore sia assente; inoltre, in entrambi i casi, l'aumento della concentrazione di complesso  $Zn^{2+}$ -TACN comporta un guadagno catalitico non importante rispetto a quello già raggiunto con il 5% di TACN.

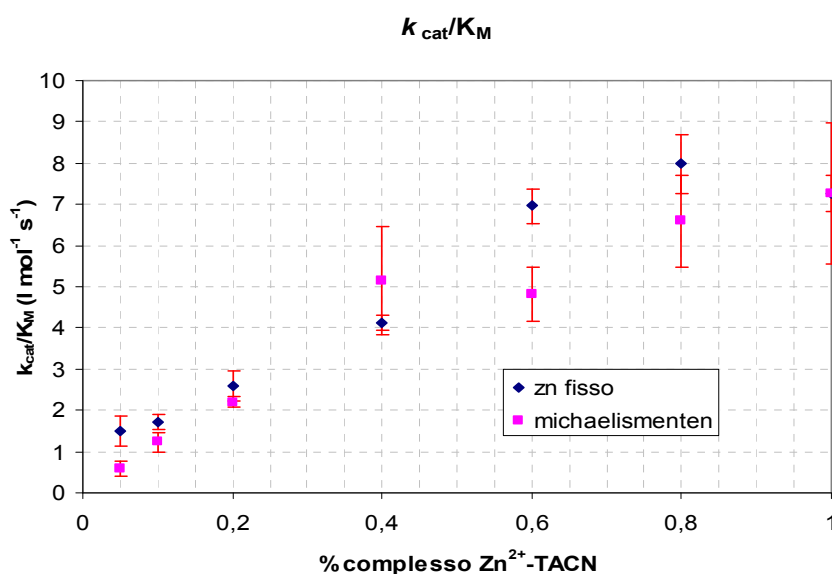


Figura 3.26 Andamento della costante  $k_{cat}/K_M$  in funzione della percentuale di TACN complessato presente.

**$k_{cat}/K_M$ :** Come conseguenza dell'andamento delle due costanti precedenti, il rapporto calcolato cresce, benché tale aumento sia modesto.

I dati raccolti consentono di fare più considerazioni:

Negli esperimenti cinetici condotti sui diversi batch di NP, si era riscontrato un andamento pressoché costante della  $K_M$ ; ora, invece, con una distribuzione statistica dei siti catalitici sulla superficie della NP, la costante in questione presenta un leggero andamento decrescente. Ciò potrebbe portare a proporre per le NP una distribuzione dei tioli diversa da quella puramente randomizzata, sebbene la differenza degli andamenti non sia particolarmente spiccata.

Tuttavia, quando si vanno ad analizzare le  $k_{cat}$ , ci si rende conto che, per poter sostenere la tesi della formazione di domini di tioli in superficie, si deve chiamare in causa un altro fenomeno. Infatti, se fosse vera la teoria della formazione di cluster, per l'ultimo esperimento (distribuzione statistica) ci saremmo aspettati delle  $k_{cat}$  più basse di quelle precedenti: i domini infatti consentono di sviluppare il massimo numero possibile di coppie catalitiche

sulla superficie e quindi la massima attività possibile, descritta da  $k_{\text{cat}}$  di certo ben più elevate di quelle raccolte per una distribuzione random; viceversa, i risultati sperimentali dimostrano che l'attività delle NP a distribuzione statistica è superiore rispetto a quella delle NP oggetto di analisi. Tuttavia, si può spiegare tale evidenza sperimentale senza negare che nel primo caso siano presenti dei domini; nell'ultimo esperimento eseguito, infatti, prende piede un nuovo interessante fenomeno: si è di fatto proceduto a diluire il complesso  $\text{Zn}^{2+}$ -TACN con del TACN non complessato, che quindi presenta delle cariche positive. Già più studi<sup>45</sup> hanno dimostrato come sia possibile che l'HPNP venga idrolizzato dall'azione concertata di un'unità monometallica  $\text{Zn}^{2+}$ -TACN e di un ammonio quaternario o di un'ammina protonata. Nel nostro caso allora, anche al 5%-10% di TACN, benché in una distribuzione statistica siano molto poche, se non assenti, le coppie bimetalliche presenti, l'attività idrolitica viene mantenuta alta grazie alla presenza di siti TACN carichi positivamente prossimi all'unità monometallica. Quindi, a differenza del caso di formazione di domini, in quest'ultima situazione non si verifica l'effetto del confine: un'unità  $\text{Zn}^{2+}$ -TACN non è mai cataliticamente isolata ed è attiva sia nel caso sia confinante con un'altra unità dello stesso tipo, sia nel caso in cui sia vicina ad un TACN protonato non complessato; ciò spiega la più elevata attività rilevata in questa sede. Ciò nonostante, è comunque da evidenziare che la differenza tra le due serie di dati raccolti diviene non significativa, nel momento in cui si consideri il guadagno catalitico realizzato in entrambi i casi rispetto alla reazione non catalizzata.

Sembra comunque molto difficile da immaginare che al 5% di TACN nel SAM si possa già avere la formazione di cluster; inoltre, mentre si può comprendere che a percentuali elevate di TACN l'attività sia elevata a causa dei domini, ci si aspettava che a percentuali basse di TACN l'attività calasse drasticamente, come conseguenza dell'impossibilità di formare domini in queste condizioni. Viceversa, i dati mostrano  $k_{\text{cat}}$  di fatto costanti e sempre alte, per cui non si può escludere l'ipotesi che la distribuzione dei due tioli nel monolayer sia statistica.

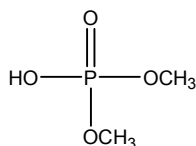
Quindi, l'andamento non atteso delle costanti si spiega ammettendo un meccanismo di idrolisi differente rispetto a quello normalmente accettato per i dendrimeri. Infatti, poiché anche in questo caso le nanoparticelle conservano attività ancora elevata a rapporti  $Zn^{2+}$ -TACN molto bassi (5-10%), viene avvalorata l'ipotesi secondo cui l'unità monometallica sia attiva, se l'azione del secondo  $Zn^{2+}$  venga svolta, come nel caso sopra riportato, da un'altra entità presente nel sistema. Tuttavia, non si può confermare che sia il TEG a compiere il ruolo che dovrebbe essere svolto dalla seconda unità di  $Zn^{2+}$ : infatti, a differenza dell'esperimento precedente, le prove sono state condotte sfruttando solo le NP funzionalizzate al 100% con TACN, mancanti quindi di TEG. Si può piuttosto sostenere che sia il monolayer idrofobo che circonda l'unità monometallica a sequestrare e concentrare il substrato, rendendolo più disponibile al processo d'idrolisi.

Le ipotesi finora presentate si basano sull'assunto che in queste condizioni sperimentali la distribuzione dello  $Zn^{2+}$  sulla NP sia statistica; tuttavia, benché questa sia l'ipotesi maggiormente accreditata, non è l'unica: un'altra ipotesi, seppur minore, afferma che la presenza del substrato complessato da un'unità  $Zn^{2+}$ -TACN renda maggiormente favorevole l'occupazione da parte di altri ioni metallici dei siti a fianco, di modo tale che la distribuzione finale di tutti gli ioni metallici non sia casuale, ma siano presenti delle zone a concentrazione maggiore. Se così fosse, la discussione dei dati e le conclusioni a cui si è giunti perderebbero di senso e le evidenze sperimentali dovrebbero trovare un'altra spiegazione.

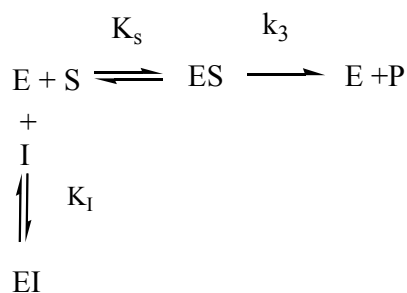
Perciò, per confermare e avvalorare ulteriormente le considerazioni a cui si è giunti e per tentare di dipanare i dubbi riguardo la corretta interpretazione dei dati sperimentali, si svolge un esperimento che possa confermare che il monolayer organico abbia un ruolo nel binding del substrato.

### 3.3.4 Cinetiche in presenza di inibitore

L'inibitore scelto è il DMP (dimetilfosfato), la cui formula è a seguente:



La molecola DMP può essere definita un inibitore reversibile del catalizzatore in questione; lo schema di reazione diventa quindi:



Di conseguenza, se si ammette che la concentrazione delle specie EI ed ES sia quella di equilibrio, l'equazione che descrive la velocità di reazione diviene la seguente:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_s \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

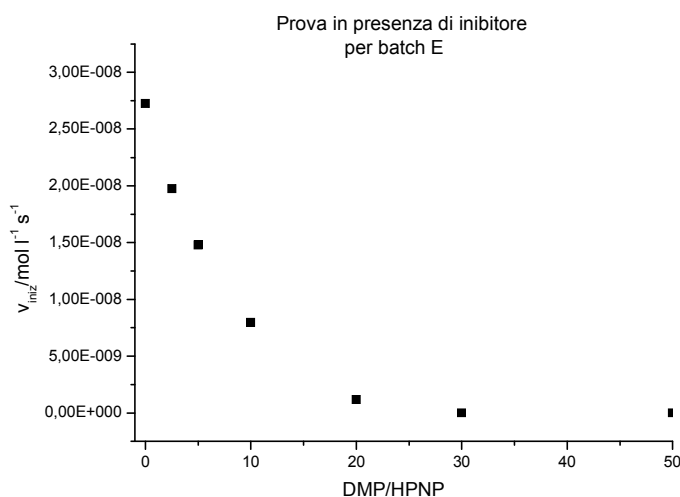
Per condurre tale esperimento cinetico si utilizzano solo le NP funzionalizzate al 100% con TACN, ipotizzando che il comportamento degli altri campioni sia del tutto analogo.

Dopo aver fissato una data concentrazione di catalizzatore e di HPNP, si introduce nei diversi pozzetti una quantità variabile di inibitore DMP: esso compete con l'HPNP per l'occupazione del sito attivo e, se idrolizzato, non comporta la formazione di alcun prodotto che assorba nella regione d'analisi. Di conseguenza, aumentando la concentrazione di inibitore, si realizza una progressiva perdita di attività del catalizzatore nei confronti dell'HPNP.

Le condizioni nelle quali l'esperimento viene condotto sono:

- Tampone: 10 mM;
- HPNP: 0,2 mM;
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Inibitore: da 0 a 10 mM;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M.

Come per tutte le altre analisi, si calcolano le velocità iniziali per ciascun caso e si riportano in un grafico in ordinata i valori ottenuti e in ascissa il rapporto DMP/HPNP realizzato.



**Figura 3.27** Andamento delle velocità iniziali in presenza di inibitore per  $[\text{HPNP}] = 2 \times 10^{-4}$  M e  $[\text{catalizzatore}] = 2 \times 10^{-5}$  M

Se la forza d'interazione del substrato con il sito catalitico dipendesse solo dal gruppo fosfato, si dovrebbe riscontrare la medesima affinità per le due strutture utilizzate e quindi l'inibizione completa dovrebbe essere raggiunta per una concentrazione di DMP pari a quella di HPNP.

Nel nostro caso, invece, si ha inibizione completa solo in corrispondenza di una quantità di DMP di 20 volte superiore a quella di HPNP. Ciò significa che l'affinità per l'HPNP è ben superiore rispetto a quella per il DMP: dato che la sola differenza tra le due strutture consiste nella presenza nella prima di un'unità idrofobica di fenile, si deve avvalorare l'ipotesi, descritta nel

paragrafo precedente, che il monostrato idrofobo abbia un ruolo nel meccanismo catalitico, consentendo per interazione idrofobica di concentrare localmente il substrato e facilitare l'attacco idrolitico. Tale consapevolezza non aiuta però a scegliere una delle due teorie proposte per la corretta interpretazione dei dati sperimentali: il fatto che il monolayer abbia un ruolo nel binding del substrato non consente né di escludere totalmente la teoria della formazione di domini, né di rendere certa e unica l'interpretazione dei dati basata sulla tesi di distribuzione statistica.

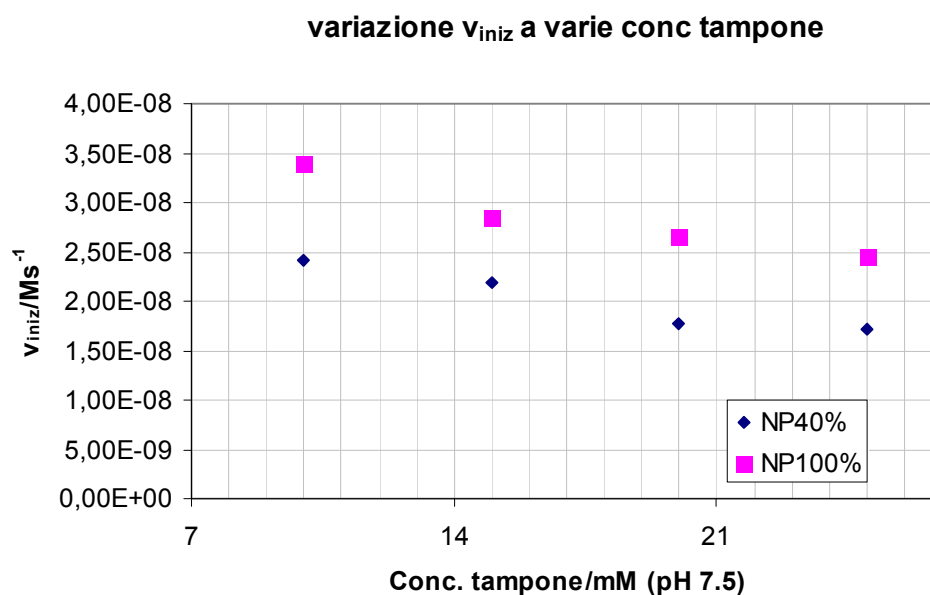
### 3.3.5 Cinetiche al variare della concentrazione di Tampone HEPES

Si vuole verificare quale sia l'influenza della concentrazione di tampone sull'efficacia del catalizzatore. L'analisi viene eseguita nei confronti delle NP del batch E e del batch B, supponendo che il comportamento di tutte le altre sia del tutto simile.

L'esperimento è condotto nelle seguenti condizioni:

- HEPES pH 7.5: da 10 mM a 25 mM;
- HPNP: 0.2 mM;
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M

Si riporta nel grafico 3.28 l'andamento delle velocità iniziali calcolate in funzione delle concentrazioni di tampone realizzate.



**Figura 3.28** Andamento delle velocità iniziali in funzione della concentrazione di tampone HEPES (pH 7.5), per una concentrazione di HPNP pari a 0.2 mM

All' aumentare della concentrazione di tampone si ha una diminuzione delle velocità iniziali. Con la concentrazione di tampone aumenta la forza ionica del sistema: i sali presenti in soluzione competono con il substrato per l'occupazione dei siti attivi e di fatto causano una diminuzione dell'attività catalitica del sistema. Quindi, anche il tampone può essere definito un inibitore, benché il calo di attività ottenuto sia molto più ridotto rispetto al caso precedente.

La consapevolezza che l'attività delle NP varia al variare della concentrazione di tampone è utile nel momento in cui si confrontino i dati ricavati con quelli di letteratura, che possono essere stati ottenuti in condizioni sperimentali differenti.

### 3.3.6 Prospettive future

Al fine di ottenere delle informazioni certe sul meccanismo d'idrolisi e sulla distribuzione dei tioli nel monolayer si dovrebbero condurre altri esperimenti:

- Si potrebbe condurre un'analisi  $^{31}P$ -NMR per valutare come varia il segnale del substrato al variare della percentuale di TEG nel monolayer: si verificherebbe così se questo tiolo interagisce o meno con il substrato.



- 
- Si dovrebbe costruire un modello matematico, che simuli la distribuzione dei due tioli nel caso in cui si formino cluster o nel caso in cui la disposizione sia random: ciò permetterebbe di dar vita a due esperimenti cinetici simulati e di calcolare le costanti cinetiche e il loro andamento in funzione della percentuale di TACN, nei due casi. Dal confronto dei dati ricavati sperimentalmente con quelli forniti dalle simulazioni, si potrebbe capire quale sia la reale distribuzione delle molecole sul colloide di Au.
  - Si potrebbero inoltre eseguire prove di cinetiche a diversi pH, in modo da verificare se il TACN protonato non complessato sia effettivamente attivo ai fini della catalisi e possa sostituire il secondo ione metallico nell'azione idrolitica. Se così fosse, andando a pH basici, si dovrebbe notare una forte diminuzione dell'attività catalitica: infatti, il TACN non sarebbe più in grado di cooperare attivamente con un'unità  $Zn^{2+}$ -TACN nel processo idrolitico, poiché ad alti valori di pH si verifica la deprotonazione degli azoti sul macrociclo.
  - Si dovrebbe eseguire un esperimento con  $Cu^{2+}$  per verificare se a basse percentuali di TACN si abbiano effettivamente cluster di tioli. Si è a conoscenza, infatti, che per tale ione l'unità monometallica è attiva, mentre il dimero no; quindi eseguendo sulle NP con bassa percentuale di TACN gli stessi esperimenti visti, ma usando ora Cu(II), si potrebbe capire quale delle due teorie proposte sia valida: se si formassero dei domini, si dovrebbero ritrovare delle attività molto minori rispetto a quelle registrate con Zn(II); viceversa, se si avessero solo TACN isolati, l'attività dovrebbe persistere ad alti valori.

### 3.4 Studi cinetici realizzati con substrati multivalenti

#### 3.4.1 Cinetiche in presenza di cT-DNA e di defibrotide

Come già descritto nell'introduzione, l'idrolisi della catena del DNA da parte di enzimi è un processo assai più arduo rispetto all'analoga reazione condotta nei confronti dell'RNA. Il DNA, infatti, manca del gruppo 2'-OH, nucleofilo che nel caso dell'RNA consente il verificarsi di un attacco intramolecolare, responsabile dell'esterolisi.

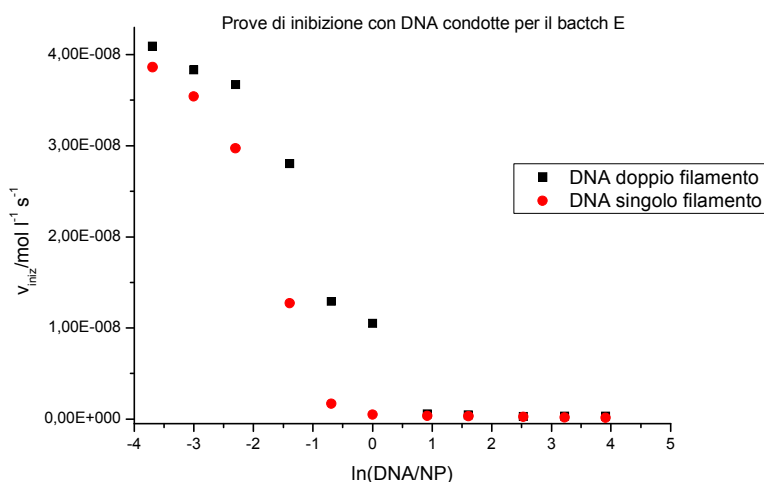
Si è pensato allora di sfruttare il DNA come inibitore multivalente dei sistemi catalitici da noi posseduti: si ipotizza infatti che esso si legherà alla nanoparticella, rendendola incapace sia di avviare una scissione della sua catena, sia di promuovere l'idrolisi di HPNP. Si vuole allora verificare la validità di tale ipotesi e valutare quale concentrazione di DNA sia necessaria per vedere la completa inibizione del catalizzatore. L'intuizione che si vuole confermare è che il DNA, essendo un sistema multivalente, possa essere un inibitore più efficace e quindi possa far ottenere gli stessi risultati visti con DMP, ma a concentrazioni ben più ridotte.

Inoltre, si vuole verificare un'altra ipotesi: il DNA ha una struttura a doppia elica, quindi rigida, che può rendere difficoltoso il binding tra esso e la NP. Invece, il singolo filamento di DNA, pur presentando la stessa inerzia all'idrolisi del doppio filamento, è caratterizzato da una più elevata flessibilità. Si ipotizza allora che, a parità di concentrazione, il binding del singolo filamento sarà molto più forte rispetto a quello del doppio filamento e che quindi la prima struttura risulterà un inibitore più efficace. Con questi esperimenti, si vuole fare luce sulle eventuali prospettive future di utilizzo delle NP, per cui si conducono delle prove di base che possano essere sfruttate da guida per altri lavori.

In un primo esperimento, si realizzano le seguenti condizioni di reazione:

- Tampone: 10 mM;
- HPNP: 1 mM;
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- DNA o defibrotide: da 0 a  $5 \times 10^{-4}$  M<sup>iv</sup>;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M.

L'esperimento viene condotto sfruttando il batch E. Si costruisce un grafico che analizzi il confronto tra DNA a doppio filamento e DNA a singolo filamento, riportando in ordinata i valori calcolati delle velocità iniziali e in ascissa il logaritmo naturale del rapporto tra DNA e NP.



**Figura 3.29** Prove di inibizione condotte per il batch E per  $[\text{HPNP}] = 1 \times 10^{-3}$  M e  $[\text{catalizzatore}] = 2 \times 10^{-5}$  M

Si verifica ciò che si era intuito: il binding del DNA è ben più forte di quello per l'HPNP, l'attività delle nanoparticelle nei confronti del substrato monovalente è di fatto nulla già ad una concentrazione di DNA (espressa in basi) pari a  $2 \times 10^{-5}$  M, ossia ad una concentrazione di ben 50 volte più piccola rispetto alla concentrazione di HPNP. Tuttavia, i dati ricavati vengono invalidati dal fatto che all'interno dei pozzetti di analisi dove la concentrazione di DNA è pari o

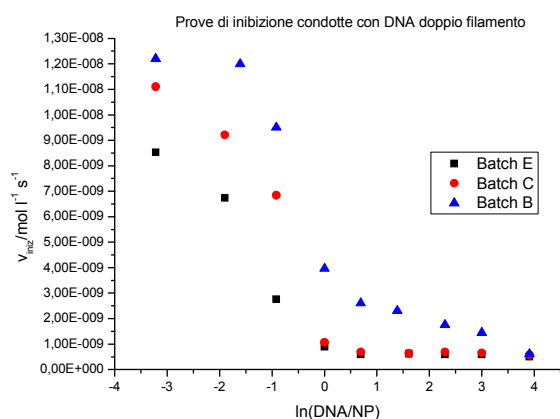
<sup>iv</sup> La concentrazione deve essere intesa in basi.

superiore a quella delle NP, si nota la formazione di un precipitato: la saturazione delle cariche positive del catalizzatore da parte del polianione genera un sistema non più solubile in acqua e nemmeno attivo ai fini catalitici. Ciò significa che un equivalente di basi satura le cariche di un equivalente di TACN, inibendo completamente il sistema, là dove ci si sarebbe aspettato la conservazione di un certo potere catalitico. Per poter verificare tale risultato, si conduce il medesimo esperimento, variando l'intervallo di concentrazione sfruttato.

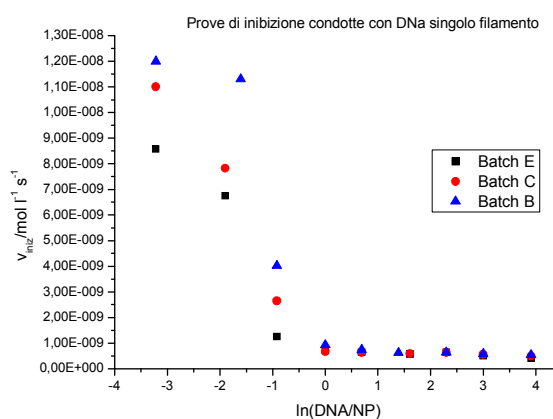
Le nuove condizioni imposte sono:

- Tampone: 10 mM;
- HPNP: 2.5 mM;
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ :  $5 \times 10^{-6}$  M;
- DNA o defibrotide: da 0 a  $2.5 \times 10^{-4}$  M;
- Catalizzatore:  $5 \times 10^{-6}$  M.

Si sfruttano ora le NP del batch E, C e B. Si costruiscono i medesimi grafici visti in precedenza, confrontando le due serie di dati ottenuti per i diversi batch:



**Figura 3.30** Prove di inibizione condotte con DNA doppio filamento,  $[\text{HPNP}] = 2.5 \times 10^{-3}$  M e  $[\text{catalizzatore}] = 5 \times 10^{-6}$  M



**Figura 3.31** Prove di inibizione condotte con DNA singolo filamento,  $[\text{HPNP}] = 2.5 \times 10^{-3}$  M e  $[\text{catalizzatore}] = 5 \times 10^{-6}$  M

Le analisi effettuate permettono di confermare quanto visto precedentemente: l'inibizione è completa per un equivalente di DNA o defibrotide introdotto, verificandosi anche in questo caso precipitazione. Tuttavia, nel caso del batch B, si registra una ridotta precipitazione e l'attività del sistema sebbene notevolmente ridotta non viene annullata.

### 3.4.2 Prospettive future

Per poter avere un quadro completo di analisi del sistema, si dovrebbero condurre nuovi esperimenti cinetici, in cui:

- a) la lunghezza in basi di DNA e di defibrotide sia la medesima, in modo tale da poter comparare efficacemente il loro binding alle nanoparticelle;
- b) si sfruttino nanoparticelle dal diametro più elevato e DNA dalla lunghezza più ridotta, per ovviare al problema della precipitazione;
- c) si utilizzi un analogo di substrato che, a differenza dell'HPNP, possa realmente competere con il DNA nel processo di binding.

In ogni caso, già con le poche analisi effettuate, si può mettere in evidenza la maggiore efficacia di inibizione offerta da un inibitore multivalente rispetto a quella promossa da un analogo monovalente: l'inattività viene raggiunta per rapporti inibitore/NP ben più bassi nel caso del DNA rispetto a quelli necessari nel caso di DMP.

Entrambe le considerazioni portano a avanzare l'ipotesi che le potenzialità del nostro sistema catalitico multivalente possano essere sfruttate appieno solo nel caso in cui esso venga posto ad interagire con un substrato altresì multivalente. Inoltre, in tali condizioni, si potrebbero meglio evidenziare le eventuali differenze di attività tra i batch analizzati e raccogliere interessanti informazioni sulla distribuzione dei tioli nel monostrato.

Per questo, si è deciso di avviare una collaborazione con il gruppo del professor Gobel dell'Università di Francoforte per testare l'attività delle NP su oligoRNA.



#### 4. CONCLUSIONI

Questo lavoro di Tesi ha permesso di confermare le pregresse conoscenze acquisite nei nostri Laboratori sulle nanoparticelle d'oro e ha consentito di raccogliere sia nuove informazioni riguardo il meccanismo catalitico da esse promosso, sia interessanti spunti per eventuali future applicazioni.

In primo luogo, la sintesi dei diversi batch di cluster di Au ha permesso di dimostrare la validità della procedura sintetica proposta dal gruppo di Scrimin. L'analisi TEM ha confermato che la distribuzione delle dimensioni delle NP ottenute è ristretta, come desiderato; tuttavia, tramite analisi TEM e TGA, si è potuto valutare che le NP hanno diametro più ridotto di quanto ci si sarebbe aspettato sulla base della quantità di diottilammina sfruttata in sede di sintesi; benché tale risultato sia inatteso, esso non costituisce comunque un problema per l'utilizzo dei sistemi in questione. Inoltre, come dimostrano le analisi  $^1\text{H-NMR}$ , si è raggiunto con successo lo scopo prefissato: ottenere nella matrice organica di copertura un rapporto tra i due tioli che riflettesse quello presente in soluzione in sede di preparazione delle NP.

Le analisi UV-Vis condotte hanno consentito di qualificare le nanoparticelle sintetizzate come buoni catalizzatori biomimetici: la cinetica enzimatica da esse promossa nei confronti dell'HPNP è stata efficacemente descritta dal modello di Michaelis-Menten. Tramite il fitting dei risultati ottenuti con l'equazione di Michaelis-Menten, si sono ricavate le costanti cinetiche caratteristiche di tali sistemi. Tutti i batch vedono valori elevati della  $k_{\text{cat}}$ : l'attività delle NP sintetizzate per questo lavoro di Tesi è ben più elevata di quella dei dendrimeri precedentemente sintetizzati nei nostri laboratori e poco più alta rispetto a quella di altre NP già sintetizzate dal gruppo di Scrimin. Le nanoparticelle possono allora essere considerate degli efficaci sistemi di catalisi idrolitica: l'ancoraggio delle molecole attive alla superficie metallica consente loro di disporsi nel modo più opportuno per avviare il processo catalitico.

Dall'analisi delle costanti cinetiche ottenute per tutti i batch di NP sintetizzati, si è potuto valutare l'andamento delle grandezze  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$  e  $k_{\text{cat}}/K_M$  in funzione

della composizione della matrice organica. Si è potuto così evidenziare, un andamento pressoché costante della  $K_M$  per una percentuale di TACN nel monolayer pari o maggiore al 20%, a dimostrare che l'affinità tra substrato ed enzima raggiunge valore massimo già ad una bassa percentuale di presenza di tiolo attivo nel SAM. Si è registrato poi un andamento crescente della  $k_{cat}$  all'aumentare della percentuale di TACN sulle nanoparticelle, benché gli esperimenti siano stati condotti ad una concentrazione costante di sistema catalitico. In più, è stato possibile notare che, anche a basse percentuali di TACN nel SAM (5-10%), non si è avuto un crollo dell'attività catalitica, ma anzi la  $k_{cat}$  si è mantenuta su valori relativamente elevati.

L'analisi di questi dati e di quelli ottenuti grazie ad altri esperimenti cinetici ha consentito di avanzare due ipotesi riguardo la disposizione dei due tioli sulla superficie metallica. Le conclusioni a cui si è giunti non sono definitive e si dovrebbero condurre ulteriori esperimenti per poter avvalorare una delle due teorie proposte. Infatti, si è potuto ben interpretare i dati sia ammettendo la formazione di domini di tioli sulla superficie metallica, sia ipotizzando una distribuzione statistica delle due molecole e un nuovo meccanismo catalitico.

Basandosi su studi già effettuati e sulla conoscenza che l'azione idrolitica si fonda sulla cooperazione tra due ioni metallici, si è dapprima avanzata l'ipotesi della formazione di domini di tioli dello stesso tipo: veniva così ben giustificato l'andamento costante delle  $k_{cat}$ . Si è pensato che la driving-force della formazione di cluster di tioli potesse essere il tentativo da parte degli stessi di sviluppare il massimo numero possibile di legami idrogeno tra le loro catene e di aumentare il più possibile la loro attività catalitica. Tuttavia tale ipotesi non giustificava appieno il fatto che non si avesse, nemmeno ad una percentuale di TACN del 5%, un calo drastico della  $k_{cat}$ , né chiariva il motivo di una così più elevata attività delle NP rispetto ai dendrimeri.

Quindi, si è pensato che i tioli si potessero disporre in modo random nel monolayer e, per ammettere una tale distribuzione, si è dovuto supporre un nuovo meccanismo catalitico e giustificare così l'andamento riscontrato per le costanti cinetiche. Si è quindi ipotizzato che le proprietà strutturali peculiari delle NP consentano anche all'unità monometallica di assumere un ruolo



---

catalitico e che l'eventuale ruolo prima attribuito alla seconda unità di  $Zn^{2+}$  possa essere ora assunto dal monolayer organico, o da ioni ammonio e ammine terziarie presenti sul TACN non complessato. Notevoli sono ancora però i dubbi da dipanare e si dovrebbero svolgere altri esperimenti per poter confermare con certezza una delle ipotesi avanzate.

Infine, grazie agli ultimi esperimenti svolti, si sono messe in luce nuove interessanti proprietà delle NP: i lavori effettuati hanno dimostrato che il binding tra due sistemi multivalenti è sicuramente più forte di quello tra un sistema multivalente ed uno monovalente: ciò fa presupporre che anche l'attività catalitica possa seguire lo stesso andamento e che le NP possano cioè dimostrarsi dei potenti catalizzatori d'idrolisi nei confronti di oligoanioni ( ad esempio ATP, siRNA). Si è quindi avviata una collaborazione con il laboratorio del professor Gobel dell'Università di Francoforte, per testare l'attività idrolitica delle NP su catene di oligoRNA.



## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 Materiali

#### Reagenti e solventi

I reagenti disponibili in commercio (Sigma-Aldrich, Fluka, Across) e i solventi sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione, dove non diversamente specificato. I solventi ed i reagenti anidri commercialmente disponibili sono stati utilizzati tal quali senza ulteriore purificazione (diclorometano (Fluka), acetonitrile (Fluka), diisopropil-etilammina (Aldrich), metanolo (Fluka), piridina (Fluka).

Per la registrazione degli spettri NMR si sono utilizzati i solventi deuterati reperibili in commercio.

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

#### Materiale per cromatografia

Le purificazioni mediante cromatografia flash sono state condotte utilizzando gel di silice Macherey-Nagel 60 con granulometria 230-400 mesh. Per la cromatografia su strato sottile (TLC) si sono utilizzate lastre Macherey-Nagel 40x80 mm poligram SIL G/UV<sub>254</sub> e poligram ALOX N/UV<sub>254</sub>.

#### Soluzioni tampone.

I tamponi utilizzati negli esperimenti cinetici e spettrofotometrici sono prodotti commerciali e non sono stati ulteriormente purificati.

|       |  |
|-------|--|
| MES   | -acido 2-(N-morfolino)etansolfonico, $pK_a = 6.1$                      |
| HEPES | -acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-2-etansolfonico), $pK_a = 7.2$   |
| EPDS  | -acido (N-(2 idrosietil)-piperazin-N'-3-propansolfonico), $pK_a = 8.0$ |
| CHES  | -acido 2-(N-cicloesilammino)etansolfonico), $pK_a = 9.5$               |

Per la preparazione delle soluzioni madre al pH desiderato, si è pesata la quantità di acido calcolata, la si è sciolta in un volume di acqua milli-Q che fosse il 90% del volume finale previsto. Si è poi regolato il pH per aggiunte successive di NaOH al 10% e/o HCl 6 M; infine, si è portato a volume con acqua milli-Q in matraccio tarato.

## 5.2 Strumentazione

### Spettri NMR

Per la registrazione degli spettri NMR sono stati utilizzati gli spettrometri Bruker Avance 300 ( $^1\text{H}$ : 300.13 MHz) e Bruker AC 250 ( $^1\text{H}$ : 250.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 62.9 MHz). Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR sono stati registrati a 25°C, i chemical shift ( $\delta$ ) dei segnali sono riportati in ppm rispetto al segnale del solvente non deuterato presente come impurezza nel solvente deuterato [per gli spettri protonici:  $\text{CDCl}_3$ : 7.26 ppm;  $\text{D}_2\text{O}$ : 4.68 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ : 3.31 ppm; il riferimento per la calibrazione degli spettri di  $^{13}\text{C}$  è  $\text{CDCl}_3$ : 77.0 ppm]. Le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz, la molteplicità dei segnali è stata indicata in accordo a quanto segue:

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

#### Spettri con gradiente di campo:

Per la registrazione degli spettri con gradiente di campo si è utilizzato lo strumento Bruker Avance 300 ( $^1\text{H}$ : 300.13 MHz), imponendo un gradiente di campo (pulse program: 1edbgp2s1d). Il confronto tra gli spettri NMR senza gradiente e quelli raccolti imponendo il gradiente di campo ha permesso di verificare quali molecole fossero effettivamente legate alle nanoparticelle.

#### Spettri NMR dopo l'aggiunta di $\text{I}_2$ :

Si è proceduto ad aggiungere una punta di spatola di  $\text{I}_2$  nei tubi NMR usati per le analisi precedenti: dopo 24 ore, tramite lo strumento Bruker Avance 300, ( $^1\text{H}$ : 300.13 MHz), si sono acquisiti gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR tradizionali, senza gradiente, relativi a tali prodotti, come ulteriore metodo di caratterizzazione

delle NP sintetizzate. Questa metodica consente, infatti, di distruggere le nanoparticelle e di calcolare via integrale il rapporto tra i due tioli, precedentemente presenti nel SAM (dopo l'azione dello I<sub>2</sub> essi saranno in realtà disolfuri).

### **Spettri di massa**

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

### **Spettrofotometria IR**

Si sono effettuate le analisi IR utilizzando gli spettrofotometri Perkin Elmer 1720X e Perkin Elmer 1600. I campioni sono stati depositati su pastiglie di KBr. Gli spettri sono stati registrati con finestra spettrale 4000-400 cm<sup>-1</sup> e risoluzione nominale di 4 cm<sup>-1</sup>. La posizione delle bande di assorbimento è espressa in cm<sup>-1</sup>.

### **Spettrofotometria UV/VIS**

Per la registrazione degli spettri UV/VIS si sono utilizzati gli spettrofotometri Perkin Elmer lambda 5, Perkin Elmer lambda 16 e Perkin Elmer lambda 45, equipaggiati con portacelle termostatati a circolazione d'acqua. Per le misure si sono usate celle di quarzo HELIMA con cammino ottico di 10 mm. Gli spettri si intendono registrati a 25°C, se non diversamente indicato.

Le cinetiche sono state realizzate con strumento multiplate reader TECAN-infinite F200, dotato di filtri ottici per la selezione della lunghezza d'onda, di cui è stato utilizzato quello centrato a 405 (± 10) nm. I campioni analizzati sono stati depositati su piastre Greiner trasparenti a 96 pozzetti con fondo piatto; l'analisi viene condotta a 40°C.

## **Analisi TEM**

Gli spettri TEM ad alta risoluzione sono stati acquisiti dal prof. Stefano Polizzi dell'Università di Venezia, presso il dipartimento di Chimica Industriale per mezzo di uno strumento Jeol 3010 operante a 300 kV, dotato di detector CCD slow scan Gatan 794.

## **Analisi Termogravimetrica**

L'analisi termogravimetrica è stata condotta mediante strumento SDT, modello 2960. Il campione è stato sottoposto ad un riscaldamento da 30 a 800°C, la temperatura è stata fatta variare ad una velocità di 20°C al minuto.

## **Misura pH**

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

## **5.3 Metodi**

### **Misura concentrazione tioli (Test di Ellman)**

La concentrazione dei tioli in soluzione acquosa viene determinata tramite utilizzo del reagente di Ellman (DTNB 5,5'-ditiobis (acido 2-nitrobenzoico)). In una cuvetta di quarzo da 800  $\mu\text{l}$ , si introducono 40  $\mu\text{l}$  di una soluzione di DTNB (2mM, contenente acetato di sodio 0.05 M), 8  $\mu\text{l}$  della soluzione di tiolo a concentrazione incognita, 352  $\mu\text{l}$  di una soluzione 0.1 M di tampone fosfato (pH 7) e si porta infine a volume con 400  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ mq. La concentrazione di tiolo libero viene determinata misurando l'assorbanza a 412 nm; il dato viene quindi convertito in concentrazione sapendo che la  $\epsilon_{412\text{nm}}$  è pari a 13470  $\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (calcolata sulla base della retta di taratura della cisteina).

### **Soluzione madre di nanoparticelle**

In un matraccio da 1 ml viene introdotta una quantità pesata di nanoparticelle variabile tra 1 e 5 mg e si porta a volume usando acqua milli-Q. La solubilizzazione dei cluster di Au non risulta istantanea: è necessario sottoporre le diverse soluzioni ad agitazione meccanica per circa 48 ore. Poiché, in alcuni casi, nemmeno questo provvedimento è risolutivo, si deve provvedere a filtrare le soluzioni (con filtro Syr. TFE 15mm, pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ), affinché esse non presentino nulla in sospensione e siano limpide.

Si conservano le soluzioni a 4°C. La concentrazione in nanoparticelle si determina misurando la loro assorbanza a 264 nm.

### **Analisi UV/Vis e titolazioni spettrofotometriche con Cu(II).**

In due cuvette da 800  $\mu\text{l}$  si introducono 80  $\mu\text{l}$  di una soluzione 0.1 M di tampone MES a pH 6.5, 48  $\mu\text{l}$  della soluzione madre di nanoparticelle la cui concentrazione deve essere determinata e si porta a volume con 672  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ mq.

Si prepara la soluzione titolante in modo che sia formata da tampone MES a concentrazione 10 mM e  $\text{CuCl}_2$  a concentrazione  $6 \times 10^{-4}$  M (da soluzione madre  $4 \times 10^{-3}$  M). Infine, si prepara una soluzione acquosa di tampone 10 mM per la correzione del bianco.

Un primo metodo di caratterizzazione qualitativo permette di raccogliere delle informazioni relative alla concentrazione di NP nella cuvetta di misura. Si registra lo spettro di assorbimento del campione da 600 a 200 nm, contro un bianco, costituito dalla soluzione acquosa di tampone e si valuta l'assorbanza a 264 nm.

Per avere invece la misura quantitativa della concentrazione di TACN nella cuvetta di misura, si procede come descritto di seguito. L'assorbanza della soluzione contenente le NP risulta già di per sé particolarmente elevata (la soluzione è marrone); di conseguenza, l'aumento di assorbanza dovuto alla formazione del complesso  $\text{Cu}^{2+}$ -TACN è percentualmente poco significativo e

quindi poco visibile. Per eliminare il contributo delle NP e rendere possibile la titolazione, si acquisisce perciò l'autozero utilizzando, come bianco e come unità di misura, le due cuvette identiche contenenti la soluzione di NP. Dopo aver acquisito l'autozero, si procede con la titolazione: ogni misura prevede l'aggiunta di un volume noto di soluzione titolante alla cuvetta di misura e l'aggiunta di un equivalente volume di soluzione tampone al bianco, in modo tale da correggere la diluizione. Dopo l'aggiunta, si attende qualche istante e si registra lo spettro nell'intervallo da 600 a 200 nm.

Si individua il massimo della banda di assorbimento del complesso  $\text{Cu}^{2+}$ -TACN a 264 nm; una volta corretti i dati per il fattore di diluizione, si costruisce un grafico riportando in ascissa l'assorbanza corretta e in ordinata il volume di  $\text{Cu(II)}$  aggiunto.

Trattamento dei dati: Si realizza una regressione lineare dei dati sulla prima parte della curva e si esegue la stessa operazione per gli ultimi punti. Le due rette hanno per intersezione il punto di viraggio della titolazione: l'ascissa di tale punto corrisponde agli equivalenti di  $\text{Cu(II)}$  necessari per titolare tutto il TACN presente. Noto tale dato, sapendo che la stechiometria del complesso  $\text{Cu}^{2+}/\text{TACN}$  è 1:1, si ricavano le moli di TACN presenti e quindi la sua concentrazione in ciascun batch.

### **Soluzioni madre dei substrati**

Per gli studi cinetici si utilizza come substrato HPNP, la cui sintesi<sup>46</sup> è stata effettuata nel nostro laboratorio. Il prodotto viene ottenuto come sale di  $\text{Ba}^{2+}$ , con un peso molecolare di 344.84 g/mol.

Le soluzioni madre vengono preparate in  $\text{H}_2\text{O}$ mq per pesata, realizzando concentrazioni nell'intervallo 2-10 mM.

### **Condizioni per gli esperimenti cinetici realizzati con HPNP**

La reazione d'idrolisi di HPNP viene seguita per via spettrofotometrica, misurando nel tempo l'aumento di assorbanza a 405 nm, dovuto al rilascio e



conseguente accumulo del p-nitrofenolato come prodotto di reazione. Le cinetiche vengono condotte a 40°C e seguite per circa 3 ore. I dati vengono raccolti ad intervalli di tempo (da 30 secondi a 1 minuto).

Le soluzioni analizzate vengono preparate aggiungendo l'opportuno volume di substrato alla soluzione acquosa di catalizzatore e tampone. I tamponi utilizzati sono: CHES 0.1 M (pH = 9.00 e 10); EPPS 0.1 M (pH = 8.00); HEPES 0.5 M (pH = 7.00 e 7.50); MES 0.2 M (pH = 6.50 e 6.00).

### Trattamento dei dati

Si esegue una regressione lineare dei punti che costituiscono il tratto iniziale delle curve di assorbanza verso tempo, là dove cioè la percentuale di conversione è inferiore al 10%. Quindi, i dati vengono opportunamente confrontati con una retta di taratura, al fine di convertire le pendenze calcolate in velocità iniziali di idrolisi. La retta di taratura è ottenuta misurando l'assorbanza a 405 nm di più soluzioni a concentrazione nota di p-nitrofenolato (prodotto d'idrolisi di HPNP a pH 7.5); si riportano il grafico e l'equazione della retta data dalla regressione lineare dei punti:

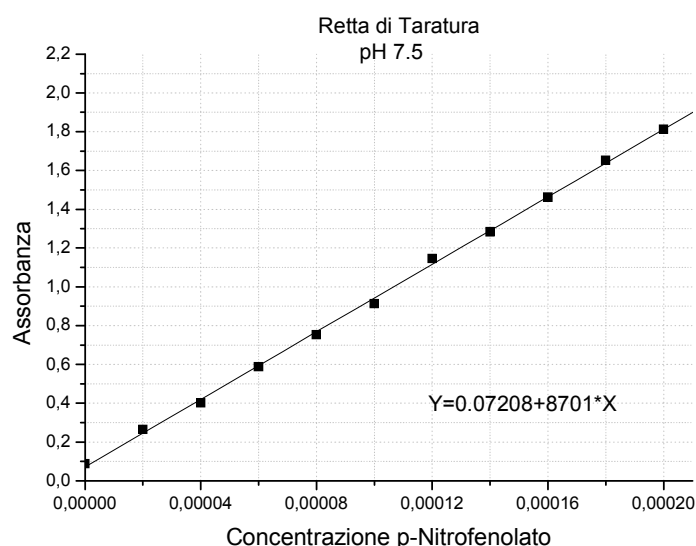


Figura 5.1 Retta di taratura per l'idrolisi di HPNP.

## Soluzioni madre

- HEPES pH 7.5: 0.5M;
- HPNP: 5 mM in H<sub>2</sub>O mq;
- Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 0.2 mM in H<sub>2</sub>O mq.
- Catalizzatore: concentrazioni riportate in tabella 3.12.

## Cinetiche al variare della concentrazione di Zn<sup>2+</sup>.

Per ogni batch di nanoparticelle, si preparano 11 pozzetti (volume per pozzetto =250 µl) aumentando progressivamente il rapporto Zn<sup>2+</sup>-NP. Le soluzioni vengono preparate a partire dalle madri, realizzando dapprima il complesso NP-Zn<sup>2+</sup> in tampone HEPES 7.5 e aggiungendo solo infine il substrato (se necessario si porta a volume con H<sub>2</sub>Omq). All'interno dei pozzetti si realizzano le seguenti concentrazioni:

- HEPES pH 7.5: 10 mM;
- HPNP: 0.2 mM;
- Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: da 0 a 6x10<sup>-5</sup> M;
- Catalizzatore: 2x10<sup>-5</sup> M.

Al termine della raccolta dati e dell'elaborazione, per ogni batch di NP si costruisce un grafico in cui in ordinata si riportano le velocità iniziali e in ascissa il rapporto Zn<sup>2+</sup>-NP realizzato in ogni pozzetto.

## Cinetiche al variare della concentrazione di HPNP (Michaelis-Menten)

Per ogni batch di nanoparticelle si preparano 9 pozzetti da 250 µl, aumentando progressivamente la concentrazione di HPNP. Le soluzioni analizzate vengono preparate a partire dalle madri, realizzando dapprima il complesso NP-Zn<sup>2+</sup> in tampone HEPES pH 7.5 e aggiungendo solo infine il substrato (se necessario si

porta a volume con  $H_2O$ mq). All'interno dei pozzetti si realizzano le seguenti concentrazioni:

- HEPES pH 7.5: 10 mM;
- HPNP: da 0.1 a 3 mM;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M.

Al termine della raccolta dei dati e della loro elaborazione, si costruisce un grafico riportando per ogni batch di NP, in ordinata, le velocità iniziali relative a ciascun pozzetto e, in ascissa, la concentrazione di HPNP corrispondente. Si opera un fitting dei punti mediante l'equazione di Michaelis-Menten, per ricavare  $k_{cat}$  e  $K_M$ .

### **Cinetiche di NP funzionalizzate con 100% TACN, al variare del rapporto $Zn^{2+}$ -NP**

Per tale studio si fa uso solo delle NP funzionalizzate totalmente con TACN. Si esegue un esperimento di Michaelis-Menten per ogni rapporti  $Zn^{2+}$ -NP desiderato (5-10-20-40-60-80-100%).

All'interno dei pozzetti si realizzano le seguenti concentrazioni:

- HEPES pH 7.5: 10 mM;
- HPNP: da 0.1 a 3 mM per ogni rapporto  $Zn^{2+}$ -NP;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Catalizzatore: da  $2 \times 10^{-5}$  M (rapporto  $Zn^{2+}$ -NP=1) a 0.4 mM (rapporto  $Zn^{2+}$ -NP =0.05).

Al termine della raccolta dei dati e della loro elaborazione, si costruisce un grafico riportando, per ogni rapporto  $Zn^{2+}$ -NP realizzato, in ordinata le velocità iniziali relative a ciascun pozzetto e in ascissa la concentrazione di HPNP corrispondente. Per ciascun grafico ottenuto, si opera un fitting dei punti

mediante l'equazione di Michaelis-Menten, per ricavare le  $k_{cat}$  e  $K_M$  relative ai diversi rapporti  $Zn^{2+}$ -NP realizzati.

### **Cinetiche al variare della concentrazione di Tampone HEPES 7.5.**

Si eseguono le prove solo per le nanoparticelle funzionalizzate con 40% e 100% di TACN. Si impongono una data concentrazione di substrato HPNP e un dato valore del rapporto  $Zn^{2+}$ -NP; l'unico parametro variabile è la concentrazione di tampone. Nei diversi pozzetti vengono realizzate le seguenti concentrazioni:

- HEPES pH 7.5: da 10 mM a 25 mM;
- HPNP: 0.2 mM;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M.

I dati vengono trattati come descritto sopra; per entrambi i catalizzatori si costruisce un grafico, riportando in ordinata le velocità iniziali calcolate e in ascissa la concentrazione di tampone del relativo pozzetto.

### **Cinetiche al variare del pH.**

Si esegue l'esperimento solo sul catalizzatore funzionalizzato con 100% di TACN, ipotizzando che il comportamento delle altre nanoparticelle sia del tutto simile. Le concentrazioni realizzate nei diversi pozzetti sono:

- Tampone: 10 mM;
- HPNP: 0.2 mM;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M.

Fissate tali condizioni, si varia in ogni pozzetto la qualità di tampone, in modo da realizzare i seguenti pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 8 e 9.

Seguita la cinetica allo spettrofotometro per il tempo necessario, si elaborano i dati e le  $v_{iniz}$  calcolate vengono riportate in grafico contro il valore di pH.

### **Cinetiche in presenza di inibitore.**

Per tale esperimento si fa uso solo delle NP funzionalizzate al 100%. Si preparano 7 pozzetti da 250  $\mu$ l, mantenendo costante la concentrazione di HPNP e di catalizzatore, mentre si aumenta progressivamente la quantità di inibitore, DMP. All'interno dei pozzetti si realizzano le seguenti condizioni:

- Tampone: 10 mM;
- HPNP: 1.2 mM;
- $Zn(NO_3)_2$ :  $2 \times 10^{-5}$  M;
- Inibitore: da 0 a 10 mM;
- Catalizzatore:  $2 \times 10^{-5}$  M.

Al termine della raccolta dati, si effettua l'elaborazione come consueto e si riportano in grafico le velocità iniziali per ciascun caso, in rapporto agli equivalenti di inibitore presenti. I dati vengono fittati da una curva la cui equazione consente di ottenere conferma della costante di binding  $K_M$ , precedentemente calcolata.

### **Cinetiche in presenza di cT-DNA e di defibrotide.**

Si sfruttano per tale esperimento solo le nanoparticelle funzionalizzate al 40, al 60 e al 100% con TACN. Si segue la cinetica su due serie di 9 pozzetti in cui, scelta una data concentrazione di catalizzatore e di HPNP, si fa variare la concentrazione di DNA in un caso e di defibrotide nell'altro.

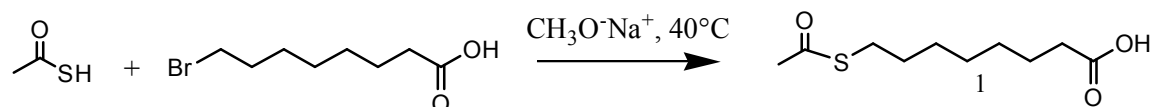
All'interno dei pozzetti, si realizzano le seguenti condizioni:

- Tampone: 10 mM;
- HPNP: 2.5 mM;
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ :  $5 \times 10^{-6}$  M;
- DNA o defibrotide: da 0 a  $2,5 \times 10^{-4}$  M;
- Catalizzatore:  $5 \times 10^{-6}$  M.

Raccolti ed elaborati i dati, si costruiscono due grafici che riportino le velocità iniziali contro il rapporto DNA(o defibrotide)/NP realizzato in ciascun caso.

## 5.4 Procedure di Sintesi

### 5.4.1 Sintesi Acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (1)



In un pallone da 250 ml si introducono 100 ml di metanolo anidro e 2 g (87.2 mmol, 3.9 eq) di sodio metallico, precedentemente trattato con etanolo e lavato con etere etilico, per rimuovere la patina ossidata in superficie. Si mantiene la miscela in agitazione in atmosfera di azoto fino al termine dello sviluppo di idrogeno. Si aggiungono quindi alla soluzione 6.6 ml (90.7 mmol, 4 eq) di acido tioacetico e successivamente 4.99 g (22.4 mmol, 1 eq) di acido 8-bromoottanoico. Si porta la miscela a 40°C e si lascia reagire sotto flusso di azoto per 18 ore (il decorso della reazione è stato seguito mediante TLC: silice, EtOAc/EP 1:2, v:v). Si rimuove quindi il solvente per distillazione, si riprende il residuo (soluzione viscosa gialla) con toluene e si distilla nuovamente. Al residuo si aggiungono 50 ml di una soluzione di KHSO<sub>4</sub> al 10%, e 50 ml di diclorometano. Si trasferisce la miscela in un imbuto separatore e si recupera la fase organica. La fase acquosa viene estratta con diclorometano (4 x 20 ml). Le fasi organiche riunite sono anidificate con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dopo filtrazione e rimozione del solvente per evaporazione a pressione ridotta, si ottengono 4 g di acido S-acetil-8-mercaptoottanoico come solido giallo (resa 81%).

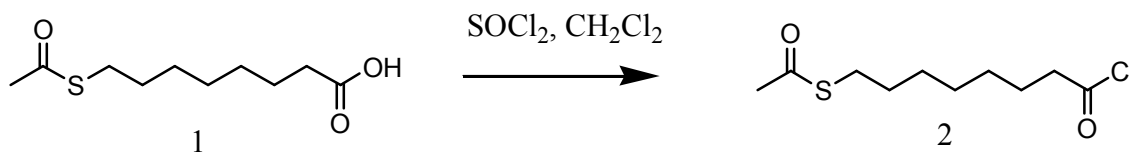
R<sub>f</sub> (Silice, EtOAc/EP 1:2,v:v; UV;Blue Shift) = 0.66.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.86 (t, 2H, 8-CH<sub>2</sub>COOH); 2.35 (t, 2H, 2-CH<sub>2</sub>SC); 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.60 (m, 4H, 3- CH<sub>2</sub> e 7- CH<sub>2</sub>); 1.30 (mbr, 6H, 4,5,6- CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ: 196.38, 180.16, 34,19, 30.84, 29.59, 29.25; 29.03, 28.90, 28.72, 24.74.

IR(KBr)/ cm<sup>-1</sup>: 2929, 2854, 1696, 1471, 1429, 1410, 1289, 1253, 1217, 1136, 1105, 630.

### 5.4.2 Sintesi S-acetil-8-mercaptoottanoil cloruro (2)

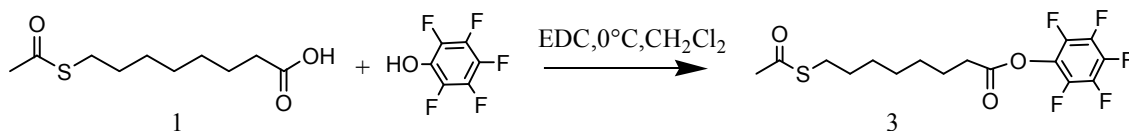


In un pallone da 100 ml si introducono 0.51 g (2.3 mmol, 1 eq) di acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (1), li si scioglie in 15 ml di diclorometano anidro e si aggiungono alla soluzione 350  $\mu$ l (4.8 mmol, 2.1 eq) di SOCl<sub>2</sub> distillato di fresco. Si mantiene in agitazione la miscela in atmosfera di azoto per 5 ore (la soluzione acquista progressivamente colore arancio scuro). Si rimuove il solvente per distillazione a pressione ridotta. Si riprende più volte il residuo con toluene e si evapora nuovamente sotto vuoto.

Si ottengono 520 mg (2.2 mmol) di S-acetil-8-mercaptoottanoil cloruro, come olio marrone scuro (resa quantitativa).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.90-2.82 (m, 4H, 2,8.- CH<sub>2</sub>); 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.69-1.50 (m, 4H, 3,7-CH<sub>2</sub>); 1.33 (mbr, 6H, 4,5,6-CH<sub>2</sub>).

### 5.4.3 Sintesi Pentafluorofenil S-acetil-8-mercaptoottanoato (3)



Si sciolgono 500 mg (2.29 mmoli, 1 eq) di acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (1) in 10 ml di diclorometano anidro e si aggiungono sotto flusso di azoto 500 mg (2.74 mmoli, 1.2 eq) di pentafluorofenolo. Si porta il pallone di reazione a 0°C e si aggiungono 520 mg (2.74 mmoli, 1.2 eq) di EDC. Si lascia decorrere la reazione per tutta la notte a temperatura ambiente. Dopo essersi assicurati tramite TLC (Silice, EtOAc/EP 1:2) che la reazione sia decorsa completamente, si diluisce la soluzione con 30 ml di diclorometano. La soluzione organica viene lavata con una miscela di KHSO<sub>4</sub> 10% e Brine 1:1 (2x15 ml), anidrificata con MgSO<sub>4</sub> anidro e il solvente allontanato mediante evaporazione a pressione



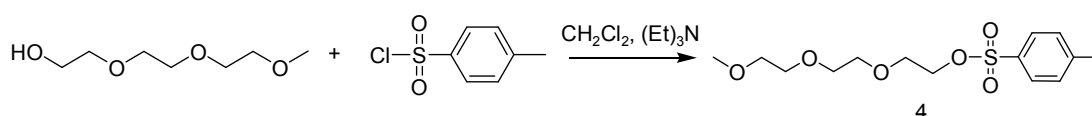
ridotta. Si ottengono 900 mg (2.24 mmoli) del prodotto voluto, come olio giallo intenso (resa=98%).

R<sub>f</sub> (Silice, EtOAc/EP 1:2,v:v; UV;Blue Shift) = 0.74.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.87(t, 2H, 2-CH<sub>2</sub>); 2.65 (t, 2H, 8-CH<sub>2</sub>); 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.76-1.58 (br, 4H, 3,7- CH<sub>2</sub>); 1,38 (mbr, 6H, 4,5,6-CH<sub>2</sub>).

IR (KBr)/ cm<sup>-1</sup>: 2935, 2929, 1790, 1686, 1521, 1004, 904, 734.

#### 5.4.4 Sintesi 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-1-etil-p-toluensolfonato (4)



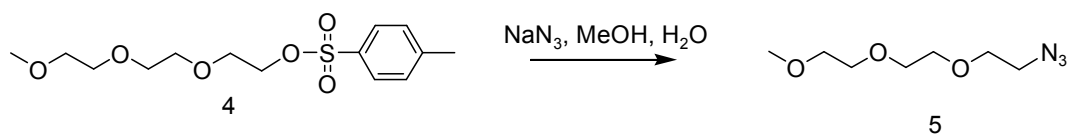
Ad una soluzione preparata sciogliendo 12.03 g di tosilcloruro (63.1 mmol, 1 eq) in 20 ml di diclorometano anidro, si aggiunge goccia a goccia una soluzione di 10 ml (62.5 mmol, 1eq) di trietilenglicole monometilere in 20 ml di trietilammina. Si pone la miscela di reazione in agitazione sotto flusso di azoto e si lascia reagire per 18 ore circa (il decorso della reazione è seguito mediante TLC: silice, EtOAc/EP 1:1, v:v). Dopo aver diluito la soluzione con 15 ml di diclorometano, la stessa viene lavata con HCl 6 M (2 x 20 ml), successivamente con una soluzione al 5% di NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 ml) ed infine con acqua distillata (2 x 10 ml). Si anidrifca la fase organica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e si rimuove il solvente per evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 14.84 g di tosilato come olio giallo pallido. Resa 74%.

R<sub>f</sub> (Silice, EtOAc/EP 1:1,v:v; UV;Blue Shift) = 0.3.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.82-7.34 (m, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 4.16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>); 3.68 (t, 2H, O- CH<sub>2</sub>); 3.62-3.51 (m, 8H, O- CH<sub>2</sub>); 3.37 (s, 3H, O- CH<sub>3</sub>); 2.45 (s, 3H, Ph- CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ: (ppm): 143.86, 131.92, 128.86, 126.95, 70.87, 69.53, 68.32, 67.62, 58.01, 20.64.

IR (KBr)/ cm<sup>-1</sup>: 2878, 1598, 1453, 1356, 1292, 1247, 1190, 1177, 1098, 1019, 923, 818, 776, 664, 584, 555.

**5.4.5 Sintesi 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-etilazide (5)**

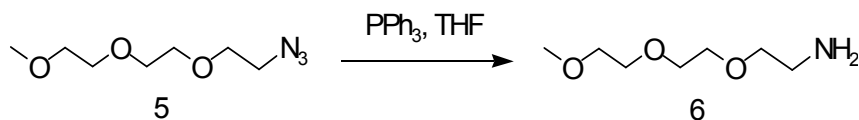
In un pallone da 100 ml si uniscono due soluzioni, la prima ottenuta sciogliendo 5.02 g di tosilato, **4**, (15.7 mmol, 1 eq) in 20 ml di metanolo, la seconda preparata con 12.17 g di sodio azide (200 mmol, 12 eq) in 10 ml di acqua distillata. Si porta la miscela di reazione a 50°C e si lascia reagire per 17 ore. Il decorso della reazione è seguito mediante TLC (Silice, EtOAc/EP 1:1, v:v). Si evapora quindi il metanolo all'evaporatore rotante; la fase acquosa rimasta viene estratta con diclorometano (5 x 20 ml). La fase organica ottenuta è anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e il solvente allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto è ottenuto come olio giallo (2.69 g, resa 93%).

Rf (Silice, EtOAc/EP 1:1,v:v; UV;Blue Shift) = 0.4

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.59-3.29 (m, 15H).

$^{13}\text{C-NMR}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.9 MHz)  $\delta$  (ppm): 71.77, 70.53, 70.50, 70.44, 69.90, 58.84, 50.51.

IR (KBr)/  $\text{cm}^{-1}$ : 2875, 2106, 1453, 1347, 1302, 1287, 1250, 1200, 1110, 1030, 937, 853.

**5.4.6 Sintesi 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-etilammina (6)**

Ad una soluzione ottenuta sciogliendo 2 g (10.8 mmol, 1eq) di azide **5** in 30 ml di THF anidro, si aggiungono a 0°C 3.2 g (12.1 mmol, 1.1eq) di trifenilfosfina. La miscela è lasciata a temperatura ambiente in agitazione per 15 ore fino a scomparsa del reagente, verificata mediante TLC (silice; miscela di EtOAc/EP 1:1, v:v). Si aggiungono alla miscela di reazione 9 ml di acqua distillata e si

protrae l'agitazione per un'ulteriore ora. Si evapora quindi il solvente all'evaporatore rotante. Il residuo viene ripreso con acqua (35 ml); la soluzione acquosa viene lavata con toluene (2 x 15 ml) per allontanare la trifenilfosfina ed il trifenilfosfinossido presenti come precipitati. Si rimuove il solvente mediante liofilizzazione; il residuo ottenuto è ripreso con diclorometano, la soluzione organica è anidrificata con MgSO<sub>4</sub> e il solvente allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 1.25 g di prodotto come olio giallo pallido (resa=71%).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3.60-3.44 (m, 10H, O-CH<sub>2</sub>); 3.33 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 2.81 (t, 2H, J =5.4, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2.05 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

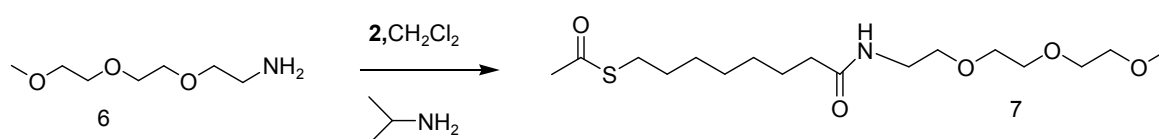
<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ (ppm): 72.30, 71.48, 70.35, 70.09, 58.86, 41.61.

IR (KBr)/ cm<sup>-1</sup>: 3370, 3304, 2874, 1594, 1457, 1351, 1303, 1248, 1200, 1107, 1028, 937, 851.

ESI-MS, (m/z): 164.1 (100, (M+H)<sup>+</sup>); 186 (M+Na)<sup>+</sup>; (massa calcolata 163.1)

#### 5.4.7 Sintesi di

##### 7-({2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}carbammoil)eptiletantiolato(7)



Per la sintesi di tale composto si sono messe a punto due metodiche ugualmente valide, che verranno qui di seguito descritte.

##### Procedura 1:

In un pallone da 50 ml si sciolgono 500 mg (2.11 mmol, 1.43 eq) di S-acetil-8-tioottanoilcloruro (**2**) in 5 ml di diclorometano anidro, unitamente ad 1 ml di diisopropilammina (4.89 mmol, 3.3 eq). Dopo aver portato la temperatura a 0°C, si unisce alla miscela di reazione una seconda soluzione formata da 240 mg (1.47 mmol, 1 eq) di 2-[2-(2-metossietossi)-etossi]-etilammina (**6**) in 8 ml di diclorometano anidro. Si lascia reagire in atmosfera inerte per circa 6 ore, seguendo la reazione tramite TLC (Silice, EtOAc/EP 2:1, v:v). Si evapora il solvente all'evaporatore rotante, si riprende il residuo con 50 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e si

lava la soluzione organica con HCl 1 N (3x20 ml). Dopo aver anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtrato, si allontana il solvente per evaporazione a pressione ridotta. L'olio marrone ottenuto viene purificato per cromatografia flash (silice, EtOAc/EP 2:1, v:v, fino all'eluizione delle impurità, per raccogliere il prodotto si aumenta progressivamente la polarità dell'eluente, usando al termine solo EtOAc). Dopo purificazione il prodotto si presenta come olio chiaro (210 mg, resa=40%).

#### Procedura 2:

Si sciolgono 800 mg (3.67 mmol, 1.2 eq) di Acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (**1**) in 10 ml di diclorometano anidro; si porta la temperatura a 0°C e si aggiungono 620 mg (4.59mmol, 1.5 eq) di HOBT, unitamente a 879 mg (4.59 mmol, 1.5 eq) di EDC. Per facilitare la solubilizzazione dei componenti, si aggiungono alcuni ml di DMF anidra. Si lascia reagire per 30 minuti e si procede poi all'aggiunta di 500 mg (3.06 mmol, 1 eq) di 2-[2-(2-metossietossi)-etossi]-etilammina (**6**), sciolti in 2 ml di diclorometano anidro, unitamente a 1.05 ml (6.12 mol, 2 eq) di DIPEA. La reazione viene seguita tramite TLC (silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, v:v). Dopo aver fatto procedere la reazione per una notte, la miscela viene lavata con una soluzione al 5% di NaHCO<sub>3</sub> (2x10ml), con una soluzione di KHSO<sub>4</sub> al 10% (1x10ml), con Brine (1x10ml) e con acqua distillata (1x10ml). Si anidrifica quindi con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, si filtra e si allontana il solvente per evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto viene purificato per cromatografia flash (silice, EtOAc/EP 2:1, v:v, fino all'eluizione delle impurità, per raccogliere il prodotto si aumenta progressivamente la polarità dell'eluente, fino a EtOAc 100%). Si ottengono 694 mg di prodotto (resa 62%).

Rf (Silice, EtOAc/EP 2:1,v:v; UV;Blue Shift) = 0.15.

Rf (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%,v:v; UV;Blue Shift) = 0.32.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6.13 (s,1H, NH); 3.62-3.53 (m, 10H, O-CH<sub>2</sub>); 3.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 2.83 (t, 2H, J =7.27, CH<sub>2</sub>-S); 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) 2.15 (t, 2H, J = 8.0, CH<sub>2</sub>CONH); 1.62-1.51 (m, 4H CH<sub>2</sub>); 1,29 (m, 6H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ (ppm): 196.25, 173.34, 72.08, 70.65, 70.30, 70.10, 59.19, 39.24, 36.75, 30.81, 29.59, 29.22, 28.99, 28.76, 25.78.

IR (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 3315, 2929, 2859, 1691, 1650, 1547, 1462, 1354, 1132, 1108, 1028, 627.

ESI-MS (m/z): 364,2 (100, (M+H)<sup>+</sup>); 386,2 (M+Na)<sup>+</sup>, 402,1 (M+K)<sup>+</sup>; (massa calcolata 363.2)

#### 5.4.8 Sintesi di

#### N-({2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}-8-mercapto ottilammide (TEG-TIOLO, 8)



Al fine di ottenere tale prodotto puro, senza la formazione di disolfuri, due sono state le procedure tentate, di cui la seconda risulta nettamente migliore, data l'assenza di dimero nel prodotto finale.

#### Procedura 1:

Si scioglie il prodotto precedente, **7**, (100 mg, 0.27 mmol, 1 eq) in 10 ml di metanolo degasato. Si aggiungono quindi 374  $\mu$ l di una soluzione 1.02 M di Na in MeOH (0.348 mmol, 1.2 eq). La miscela di reazione viene mantenuta a temperatura ambiente sotto agitazione ed in atmosfera di azoto per 30 minuti. Trascorso tale intervallo di tempo, si aggiunge goccia a goccia HCl 1.25 M in metanolo, fino a portare il pH della soluzione a 5. Il solvente viene quindi allontanato per evaporazione a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con diclorometano. I sali precipitati vengono filtrati e il solvente viene nuovamente allontanato.

Il prodotto ottenuto si presenta come olio debolmente giallo (80.8 mg, resa=91%)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 6.13 (s, 1H, NH); 3.54-3.45 (m, 10H, O-CH<sub>2</sub>); 3.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 3.27 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 2.42-2.20 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-S + 2H, CH<sub>2</sub>CONH); 1.58-1.23 (m, 10H CH<sub>2</sub>).

Basandosi sull'analisi NMR si può già rivelare la presenza di disolfuro: i segnali sono molto più allargati e risuonano a campi differenti rispetto a

quanto atteso. Si effettua quindi un Test di Ellman per confermare ed eventualmente quantificare la presenza di tiolo libero; dall'analisi si evince che tutto il tiolo è dimerizzato (la soluzione non diviene gialla).

IR (KBr)/  $\text{cm}^{-1}$  : la presenza di un solo picco nella regione dei carbonili ( $1653 \text{ cm}^{-1}$ ) conferma l'avvenuta deacetilazione.

#### Procedura 2:

In un pallone da 50 ml si sciolgono 43.9 mg (0.121 mmol) del tiolo acetilato (7) in poche gocce di MeOH e si aggiungono quindi 10 ml di HCl 1.25 M in MeOH. Si porta la temperatura a  $60^\circ\text{C}$  e si lascia reagire a refluxo per tre ore. Dopo aver confermato con TLC che la reazione è giunta a completezza, si allontana il solvente all'evaporatore rotante.

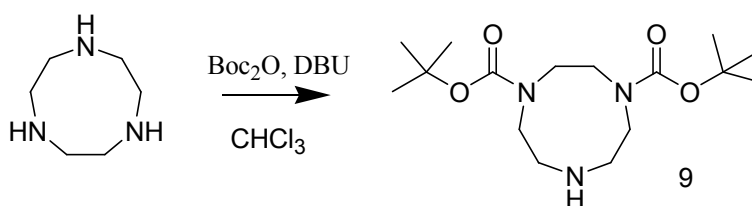
Rf (Silice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5%, v:v; UV;Blue Shift) = 0.4

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 3.57-3.47 (m, 10H, O- $\text{CH}_2$ ); 3.20 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ); 3.32 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ); 2.63 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ); 2.15 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 1.67-1.26 (m, 10H  $\text{CH}_2$ ).

ESI-MS (m/z): 322.2 (100, (M+H) $^+$ ), 344.2 (M+Na) $^+$ ; (massa calcolata 321.2).

Si esegue test di Ellman a confermare che la concentrazione di tiolo è quella attesa e che non si è avuta formazione di disolfuro.

#### 5.4.9 Sintesi 1,4-Bis(t-butilossicarbonil)-1,4,7-triazaciclononano (9)



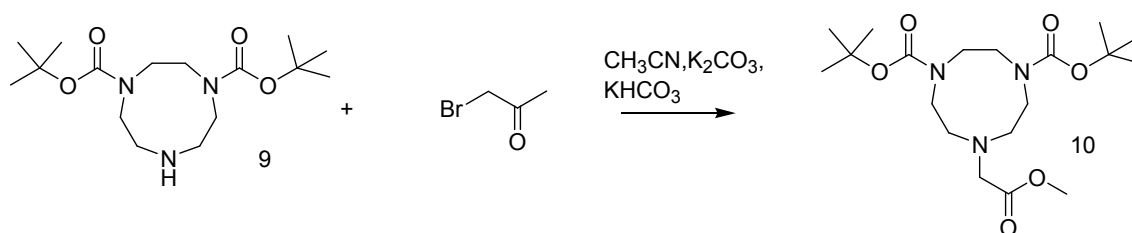
Si scioglie il di-tert-butyl-dicarbonato (0.989 g, 4.53 mmoli) in 9.5 ml di  $\text{CHCl}_3$  anidro; si aggiunge lentamente tale soluzione mediante pompa a siringa (velocità 0.5 ml/h), ad una soluzione di DBU (1.88 g, 12.3 mmoli) e TACN (0.601 g, 2.52 mmoli) sciolti in 12.5 ml di  $\text{CHCl}_3$  anidro. La miscela di reazione viene agitata per circa 18 h, sotto flusso di  $\text{N}_2$ .

Successivamente, si diluisce la soluzione fino a 150 ml con  $\text{CHCl}_3$  e si eseguono lavaggi con una soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$  (3x25 ml). Il solvente viene poi evaporato a pressione ridotta. Si purifica il prodotto tramite colonna cromatografica (silice,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  3%). Si ottengono 0.722 g di prodotto oleoso e di colore giallino (2.21 mmoli, Resa= 88%).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 1.43 (s, 18H, t-Bu), 2.91 (br, 4H,  $\text{CH}_2\text{NHCH}_2$ ), 3.25 (m br, 4H, 2  $\text{N}^*\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}$ ), 3.45 (m br, 4H,  $\text{N}^*\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{N}^*$ ), \*=(t-Boc).

$^{13}\text{C-NMR}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.9 MHz)  $\delta$ (ppm): 155.2, 79.1, 79.0, 52.5, 51.9, 51.8, 51.0, 49.8, 49.2, 48.9, 47.7, 47.6, 47.2, 27.9.

#### 5.4.10 Sintesi Metil {1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclonoan]}-acetato (10)



Si dissolvono 800 mg (2.43 mmoli, 1 eq) di  $(\text{Boc})_2\text{Tacn}$  (**9**) in 50 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$  anidro, si aggiungono  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e  $\text{KHCO}_3$ , in quantità sufficiente a rendere basico il pH (circa 8) e si introducono poi 2.20 ml (2.40 mmol, 1 eq) di bromo acetato.

La miscela di reazione viene posta in agitazione e sotto flusso di  $\text{N}_2$  per tutta la notte. Dopo aver confermato mediante TLC (Silice, EP/EtOAc 1:3, v:v) che la reazione è giunta a completezza, si filtrano i sali e si evapora il solvente all'evaporatore rotante. Il grezzo di reazione viene purificato mediante flash chromatography (silice, EP /EtOAc, 90:10, v:v fino all'eluizione delle impurezze, quindi per raccogliere il prodotto si utilizza EP/EtOAc 80:20, v:v). Si ottengono 800 mg di prodotto desiderato (1.99 mmoli, Resa=81%) come olio trasparente.

$R_f$  (Silice, EP/EtOAc 1:3 v:v; UV;Blue Shift, ninidrina) = 0.7

$R_f$  (Silice, EP/EtOAc 10%, UV, ninidrina) = 0.1

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.45 (s, 18H, t-Bu), 2.83 (br, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}'\text{CH}_2$ ), 3.23 (m br, 4H, 2  $\text{N}^*\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{N}'$ ), 3.43 (m br, 6H, 2  $\text{N}^*\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{N}^*$ ,  $\text{CH}_2\text{COO CH}_3$ ), 3.67 (m br, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), '(=metilacetato), \*(=t-Boc).

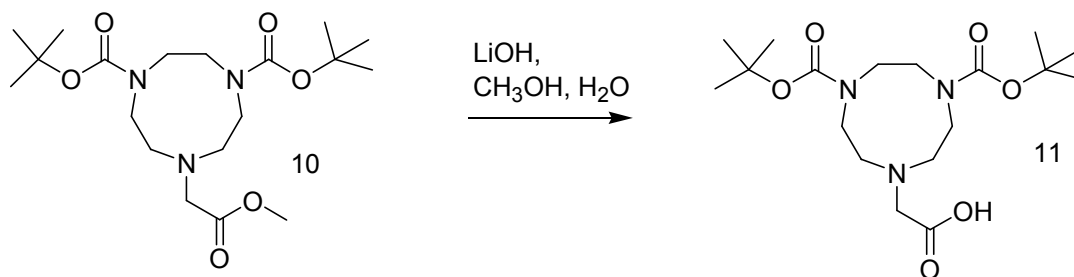
$^{13}\text{C-NMR}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.9 MHz)  $\delta$ (ppm): 172.50, 155.45, 155.39, 79.45, 79.36, 79.31, 55.97, 55.89, 54.18, 53.69, 53.60, 53.49, 51.22, 50.92, 50.75, 50.71, 50.39, 50.31, 50.10, 49.85, 49.46, 28.47.

IR (KBr)/  $\text{cm}^{-1}$ : 2974, 2930, 1744, 1691, 1461, 1365, 1251.

ESI-MS (m/z): 402.2 (100,  $(\text{M}+\text{H})^+$ ); (massa calcolata 401.2).

### 5.4.11 Sintesi Acido

#### 2-{1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclononan]}-acetico (11)



Si sciolgono 800 mg di **10** (1.99 mmoli, 1 eq) in 10 ml di MeOH, si aggiunge quindi una soluzione formata da 350 mg di LiOH monoidrato (8.43 mmoli, 4 eq) in 4 ml di acqua distillata e si facilita la dissoluzione dei reagenti aggiungendo poche gocce di THF, fino a che la miscela non appare limpida. Si lascia reagire per 4 ore, sotto flusso di azoto. Dopo essersi assicurati tramite TLC (Silice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5%) che la reazione è giunta a completezza, si allontana il metanolo mediante evaporazione a pressione ridotta e la soluzione acquosa rimanente viene acidificata con  $\text{KHSO}_4$  al 10% fino a pH 3 (la soluzione diventa torbida per avvenuta precipitazione del prodotto). Si estrae con più porzioni di EtOAc e si anidrifca la fase organica ottenuta con  $\text{MgSO}_4$  anidro. Si allontana il solvente per evaporazione a pressione ridotta e si ottengono 560 mg di prodotto desiderato, come solido bianco (1.44 mmoli, Resa= 73%).

Rf (Silice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5%, UV, ninidrina) = 0.4



$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.49 (s, 18H, t-Bu), 2.74 (br, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}'\text{CH}_2$ ), 3.50-3.34 (m br, 10H, 2  $\text{N}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}'$ ,  $\text{N}^*\text{H}_2\text{CH}_2\text{N}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ ), \*(t-Boc);  
 '= gruppo carbossilico

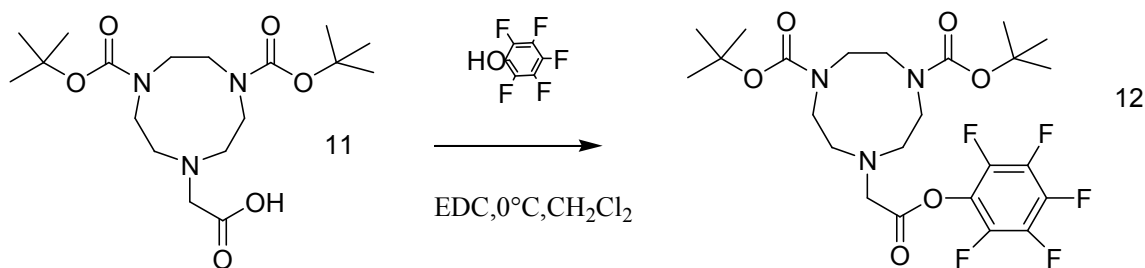
$^{13}\text{C-NMR}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.9 MHz)  $\delta$  (ppm): 172.21, 155.60, 155.39, 81.27, 80.92, 80.79, 60.75, 60.61, 54.73, 53.85, 50.76, 50.34, 49.29, 28.72, 28.67.

IR (KBr)/  $\text{cm}^{-1}$ : 2977, 2932, 1685, 1478, 1464, 1415, 1368, 1251, 1161, 910, 733.

ESI-MS (m/z): 388.2 (100,  $(\text{M}+\text{H})^+$ ); 338  $((\text{M}-\text{Boc}+\text{H})^+)$ , 410.2  $(\text{M}+\text{Na})^+$ ; (massa calcolata 387.2).

#### 5.4.12 Sintesi di

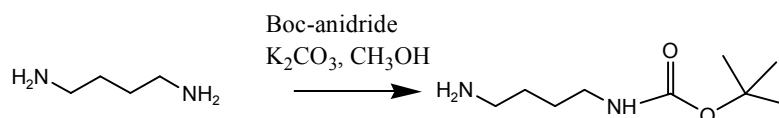
#### pentafluorofenil{1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclononan]}acetato (12)



Si dissolvono 382 mg di **11** (0.99 mmol, 1eq) in 3 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro e si pone il tutto in agitazione e sotto flusso di  $\text{N}_2$ . Si aggiunge alla soluzione il pentafluorofenolo (290 mg, 1.58 mmol, 1.6 eq), si abbassa la temperatura a  $0^\circ\text{C}$  e si unisce alla miscela l'EDC (306.4 mg, 1.6 mmol, 1.6 eq). Si lascia progredire la reazione per tutta la notte e, una volta decorsa completamente (verifica per TLC), si diluisce con qualche ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La soluzione organica viene lavata con una miscela di  $\text{KHSO}_4$  al 10% e Brine 1:1 (2x5 ml). Si anidrifca con  $\text{MgSO}_4$  anidro, si filtra e si allontana il solvente mediante evaporazione a pressione a ridotta. Si ottengono 462 mg di prodotto voluto come olio giallo scuro (0.80 mmol, Resa= 80%).

$R_f$  (Silice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10%, UV, ninidrina) = 0.6

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.48 (s, 18H, t-Bu), 2.93 (br, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}'\text{CH}_2$ ), 3.32 (m br, 4H, 2X  $\text{N}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}'$ ), 3.47 (m br, 4H,  $\text{N}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^*$ ), 3.87 (m br, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOpentafluorenil}$ ), \*(t-Boc), '=pentafluorenil.

**5.4.13 Sintesi N-Boc-diamminobutano (13)**

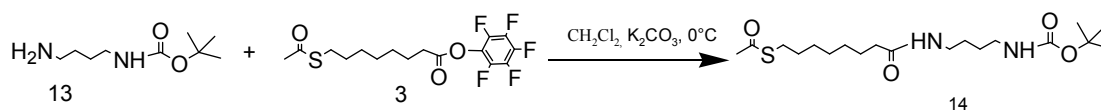
In un pallone a tre colli da 100 ml, si introduce una soluzione ottenuta sciogliendo 1.8 ml (17.8 mmol, 1eq) di 1,4-diamminobutano (PF= 22-24°C) in 40 ml di metanolo. Si aggiungono circa 5 g di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> per rendere basico il pH di reazione; quindi si procede ad aggiungere goccia a goccia una soluzione di Boc-anidride (1.96 g, 9 mmol, 0.5 eq) in 15 ml di metanolo (l'aggiunta dura circa 1 ora). Si protrae l'agitazione per tutta la notte. Dopo essersi assicurati tramite TLC (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, v:v) che la reazione sia giunta a completezza, si filtra e si allontana il solvente all'evaporatore rotante. Si riprende il residuo con 30 ml di diclorometano, si estrae con acido acetico 1 M (3x30ml); si riporta quindi la soluzione a pH basico tramite l'aggiunta di 4 g di NaOH. Si estrae nuovamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4x20ml), si anidrifca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e si allontana il solvente per evaporazione a pressione ridotta. Si ottengono 980 mg di prodotto desiderato, come olio giallo pallido (resa=58%).

Rf (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%; ninidrina) = 0.11.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,09 (s, NHCO), 3,13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 1,43 (m, 13H, Boc + CH<sub>2</sub> interni).

<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ: 156.14, 79.02, 41.6, 40.47, 31.31, 30.90, 28.49, 27,54.

## 5.4.14 Sintesi N-Boc-N'-8-tioacetilottanoil-etilendiammina (14)



Si sciolgono 480 mg (1.2 mmol, 1 eq) del prodotto **3** in 10 ml di diclorometano anidro, si aggiunge poi una quantità di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> che assicuri un pH basico (circa 9) e si mantiene inerte l'atmosfera di reazione flussando N<sub>2</sub>. Portata la temperatura a 0°C, si aggiunge goccia a goccia una soluzione ottenuta sciogliendo 560 mg (2.98 mmol, 2.4 eq) dell'ammina precedentemente ottenuta in 5 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Dopo circa 2 ore, si esegue una TLC di controllo (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%), si filtra la sospensione e si lava il solido con molto diclorometano. Si procede lavando la fase organica con una soluzione di KHSO<sub>4</sub> al 10% (1x10ml) e con Brine (1x10ml); la soluzione ottenuta viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente viene allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto si presenta come solido bianco (360 mg, resa 77%).

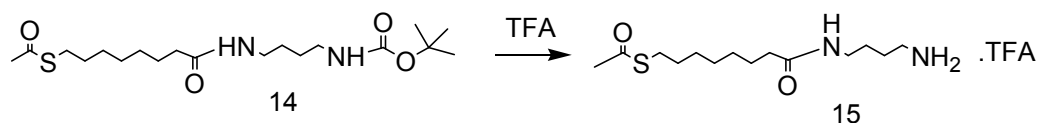
R<sub>f</sub> (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, UV, ninidrina) = 0.5

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.69 + 4.61 (sbr, 2H, 2xNHCO); 3.27 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.14 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NHCO), 2.85 (t, 2H, CH<sub>2</sub>SCO), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.15 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CONH), 1.63-1.31 (br, 23H, CH<sub>2</sub> della catena alifatica).

<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ 196.37, 173.36, 156.33, 79, 39.25, 36.93, 30.85, 29.61, 29.26, 29.23, 28.94, 28.75, 27.82, 26.90, 25.84.

ESI-MS (m/z): 389.2 (100, (M+H)<sup>+</sup>); 411.2 (M+Na)<sup>+</sup>; 289.1 ((M+H-Boc)<sup>+</sup>; (massa calcolata 388.2).

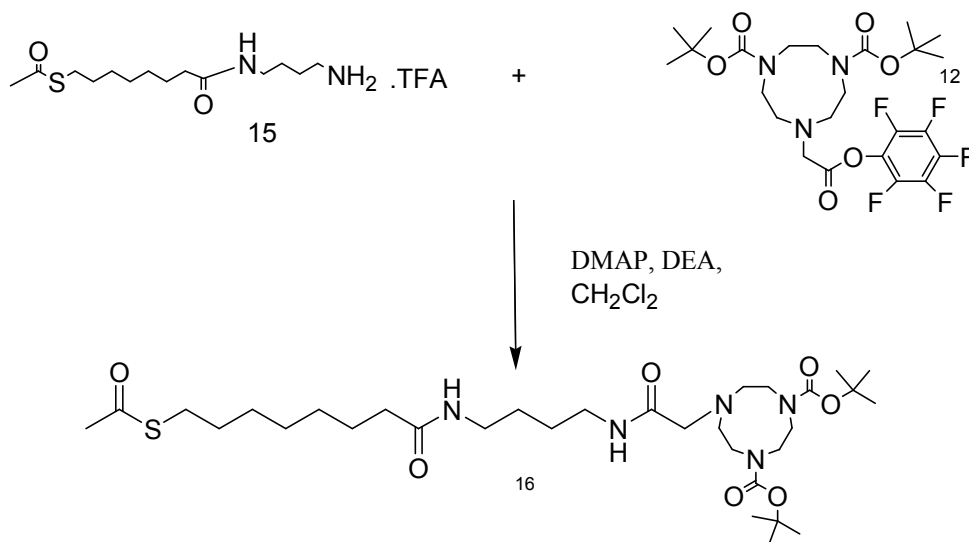
## 5.4.15 Sintesi N-8-tioacetilottanoil-etilendiammina (15)



Si sciolgono 280 mg (0.74 mmol, 1 eq) del composto **14** in 5 ml di diclorometano anidro, si aggiungono poi sotto agitazione 3 ml di TFA. Dopo aver verificato che la reazione sia decorsa completamente tramite TLC, si evapora il solvente a pressione ridotta e si recupera il prodotto come trifluoroacetato (resa quantitativa).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 3.19 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.93 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 2.84 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{SCO}$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.17 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 1.59-1.31 (br, 10H,  $\text{CH}_2$  catena alifatica), 1.33 (br, 4H,  $\text{CH}_2$  catena alifatica).

## 5.4.16 Sintesi diBOC triazaciclnonan derivato (16)



In un pallone da 25 ml si introducono due soluzioni formate la prima dal prodotto della reazione precedente, **15**, (300 mg, 0.74 mmol, 1 eq) in 5 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro, la seconda dal prodotto **12** (560 mg, 0.98 mmol, 1.3 eq) in 5 ml di diclorometano anidro. Alla miscela si aggiungono 12 mg di DMAP (0.098 mmol, 0.13 eq) e 836  $\mu\text{L}$  di DIEA (4.9 mmol, 6.6 eq). Si fa decorrere la reazione

sotto flusso di azoto per 15 ore circa, al termine delle quali si esegue una TLC di controllo (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, v:v). Si eseguono più lavaggi della fase organica: il primo con una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> al 10%, (1x15 ml), quindi con una soluzione di KHSO<sub>4</sub> al 10% (1x 15 ml) ed infine con Brine (1x15 ml). Si anidrifica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, si filtra e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il grezzo di reazione così ottenuto viene purificato per cromatografia flash (silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1%).

Il prodotto finale si presenta come olio trasparente (resa=64%).

R<sub>f</sub>(Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, UV, ninidrina) = 0.65

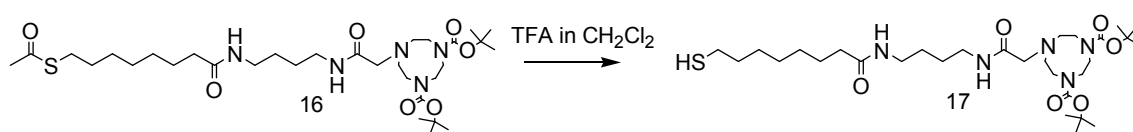
R<sub>f</sub> (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2%, UV, ninidrina) = 0.2

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6.26 (s, 1H, NH) 3.52 (br, 2H, COCH<sub>2</sub>Ntriaz), 3.23 (mbr, 12H, 2xCH<sub>2</sub>NHCO + 2xCH<sub>2</sub>N-Boc + 2xBoc-NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.84 (t, 2H, CH<sub>2</sub>SCO), 2.69 (m, 4H, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>) 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.18 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CONH), 1.57-1.48 (br, 24H, CH<sub>2</sub> della catena alifatica, Boc), 1,30 (br, 8H, catena alifatica).

<sup>13</sup>C-NMR {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ: 196.40, 173.36, 155.91, 80.33, 55.29, 54.28, 51.11, 50.33, 49.18, 39.46, 38.58, 38.82, 36.91, 30.90, 29.67, 29.26, 29.23, 28.94, 28.82, 27.74, 26.47, 25.91.

ESI-MS (m/z): 658.3 (100, (M+H)<sup>+</sup>); (massa calcolata 657.3).

#### 5.4.17 Sintesi triazaciclononan derivato (17)



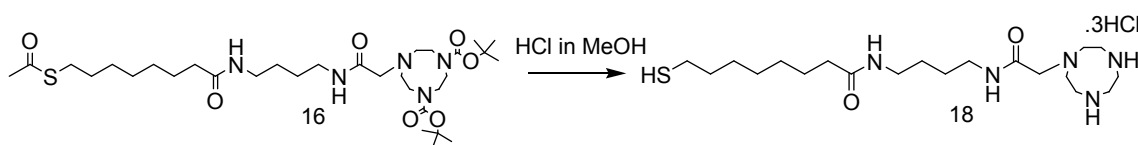
Si sciolgono 52 mg (0.079 mmol) del prodotto **16** in 2 ml di diclorometano anidro, si aggiungono quindi 0.856 ml di TFA, in modo da realizzare una soluzione al 30% in acido. Dopo 2 h, si esegue una TLC (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, v:v) per verificare che la reazione sia completamente decorsa, quindi si rimuove il solvente a pressione ridotta. Si recupera il prodotto come sale trifluoroacetato con resa quantitativa.

R<sub>f</sub> (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, UV, ninidrina) = 0.8

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 3.46 (s, 2H, CO  $\text{CH}_2\text{N}$ triaz), 3.26 (mbr, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.12 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{SCO}$ ), 2.96 (2x  $\text{CH}_2\text{NH}$  (sul triazaciclononano) + NH  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2.80 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ); 2.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2.11 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 1.47 (br, 8H,  $\text{CH}_2$  della catena alifatica); 1,28 (m, 6H, catena alifatica).

$^{13}\text{C-NMR}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 62.9 MHz)  $\delta$ : 196.40, 173.2, 55.96, 49.82, 45.15; 43.94, 38.94, 38.64, 35.88, 29.46, 29.33, 28.87, 28.61, 28.56, 28.40, 26.56, 26.25, 25.76.

#### 5.4.18 Sintesi del triazaciclononan-tiolo (TACN-TIOLO,18)



Al fine di ottenere tale prodotto puro, senza la formazione di disolfuri, due sono state le procedure tentate, di cui la seconda risulta nettamente migliore, data l'assenza di dimero nel prodotto finale.

##### Procedura 1:

Si scioglie il prodotto **16** (28 mg, 0.035 mmol, 1 eq) in 10 ml di metanolo degasato. Si aggiungono quindi 144  $\mu\text{l}$  di una soluzione 1.29 M di Na in MeOH (0.186 mmol, 5 eq). La miscela di reazione viene mantenuta a temperatura ambiente sotto agitazione ed in atmosfera d'azoto per 30 minuti. Trascorso tale intervallo di tempo, si aggiunge goccia a goccia HCl 1.25 M in metanolo, fino a portare il pH della soluzione a 5. Il solvente viene quindi allontanato per evaporazione a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con diclorometano. I sali precipitati vengono filtrati e il solvente viene nuovamente allontanato.

Il prodotto ottenuto si presenta come olio debolmente giallo (resa=80%).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): l'assenza del picco a 2.24 ppm conferma che la deprotezione è avvenuta con successo.

Basandosi sull'analisi NMR, si può già rivelare la presenza di disolfuro: i segnali sono molto più allargati e risuonano a campi differenti rispetto a quanto atteso. Si effettua quindi un Test di Ellman per confermare ed

eventualmente quantificare la presenza di tiolo libero; dall'analisi si evince che tutto il tiolo è dimerizzato (la soluzione non diviene gialla).

#### Procedura 2:

In un pallone da 50 ml si sciolgono 100 mg (0.152 mmol, 1eq) del tiolo acetilato e ancora protetto sull'anello (prodotto numero **16**) in poche gocce di MeOH e si aggiungono quindi 15 ml di HCl 1.25 M in MeOH. Si porta la temperatura a 60°C e si lascia reagire a riflusso per tre ore. Dopo aver confermato con TLC (Silice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5%, v:v) che la reazione è giunta a completezza, si allontana il solvente all'evaporatore rotante.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 3.67 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH); 3.51 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>Ntriaz), 3.27 (mbr, 2xCH<sub>2</sub>NH + 2xCH<sub>2</sub>NH (sul triazaciclononano)), 3.03 (br, 4H, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 2.46 (t, 2H, CH<sub>2</sub>SCO); 2.30 (s, 3H, CH<sub>2</sub>CONH); 1.47 (br, 8H, CH<sub>2</sub> della catena alifatica); 1,28 (m, 6H, catena alifatica).

Si esegue un test di Ellman a confermare che la concentrazione di tiolo è quella attesa e che non si è avuta formazione di disolfuro.

### **5.5 Procedura generale per la preparazione dei colloidi d'oro in toluene**

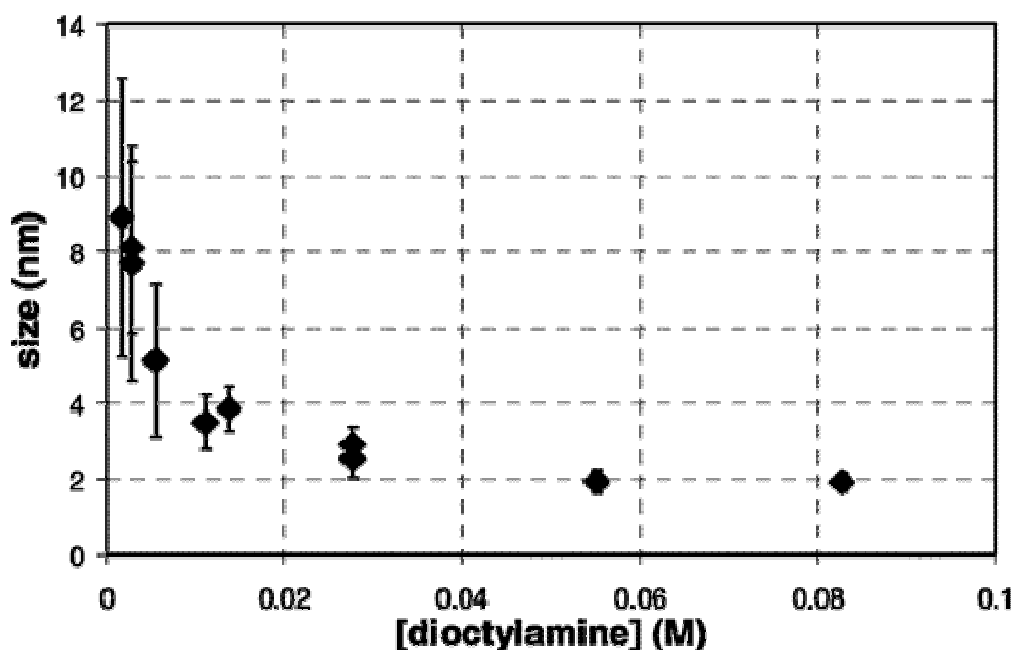
Per la sintesi dei diversi batch di nanoparticelle desiderati si è seguito il protocollo messo a punto nei nostri laboratori<sup>23</sup>, apportando alcune piccole modifiche. Prima di procedere alla descrizione della procedura di sintesi, è necessario fare alcune precisazioni: tutta la vetreria, prima di essere utilizzata, deve essere lavata con acqua regia (miscela di HCl/HNO<sub>3</sub>, 3:1); inoltre, ogni operazione descritta deve essere effettuata in atmosfera inerte.

Si preparano due soluzioni:

- La prima sciogliendo 102.5 mg di HAuCl<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O (0.261 mmol), precedentemente pesati in atmosfera inerte, in 7 ml di H<sub>2</sub>Omq;
- La seconda sciogliendo 5.50 g (3.03 mmol) di TOABr in 250 ml di toluene precedentemente degasato.

Si eseguono tre estrazioni della soluzione acquosa con 3x14 ml della soluzione in toluene, al fine di portare l'acido tetracloroaurico nella fase organica (la soluzione acquosa gialla si decolora e la fase organica diventa rosso-arancio).

Ai 208 ml di soluzione di TOABr rimanente, viene aggiunta una precisa quantità di di-n-ottilammina (4.3 ml), tale da ottenere delle nanoparticelle dal diametro desiderato (pari a 1.5-2nm). L'ammontare di reagente da sfruttare viene calcolato sulla base della relazione, messa in evidenza dal grafico 5.2<sup>23</sup>, tra dimensioni del core e quantità di diottilammina usata in sede di sintesi.



**Figura 5.2** Relazione tra dimensioni delle nanoparticelle ottenute e quantità di diottilammina utilizzata, in riferimento a condizioni di reazione standardizzate (per  $[\text{HAuCl}_4] = 2\text{mM}$ ).

La soluzione appena ottenuta viene aggiunta, sotto vigorosa agitazione, alle fasi organiche riunite, ottenute dalle estrazioni. Dopo un'attesa di 30 minuti, tempo necessario affinché la soluzione si decolori completamente, si introduce nel pallone di reazione, nel minor tempo possibile e mantenendo sempre una sostenuta agitazione, una soluzione di 46.1 mg di  $\text{NaBH}_4$  (1.20 mmol) in 2.05 ml di  $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$ . Si assiste alla subitanea colorazione marrone della soluzione, dovuta alla formazione dei colloidali di  $\text{Au}(0)$  desiderati. Si lascia procedere la reazione per 3 ore, quindi si separano le due fasi; la fase organica ottenuta



deve essere sottoposta a copertura entro le 24 ore successive (le nanoparticelle devono essere conservate in atmosfera inerte, a temperatura ambiente).

### Copertura dei colloid

La copertura dei colloid così ottenuti avviene per semplice aggiunta di una soluzione in MeOH dei due tioli sintetizzati (TACntiolo, **18**, tegtiolo, **8**), nella stessa proporzione che si vuole sia presente sulle nanoparticelle.

Per questo lavoro di tesi, si necessita la sintesi di più batch di nanoparticelle che siano identiche per quanto riguarda la loro costituente inorganica, ma che si differenzino nella matrice organica di copertura. I colloid, sintetizzati secondo la procedura descritta prima, sono quindi divisi in 5 porzioni e funzionalizzati contemporaneamente, realizzando in ciascuno batch un rapporto tioloTACN/tioloTEG diverso. Si garantisce così che le nanoparticelle abbiano lo stesso diametro, essendo preparate insieme, e che non presentino grandi altre differenze, essendo contemporanea la loro sintesi.

Si procede quindi a dividere in 5 porzioni da 50 ml la soluzione organica di colloid, in modo tale che ciascuna contenga  $5.22 \times 10^{-5}$  mol di Au(0). La quantità totale di tioli introdotta in ciascun batch in sede di reazione deve essere il doppio rispetto a quella stechiometricamente richiesta (calcolata sulla base della formula minima  $\text{Au}_{214}\text{RSH}_{92}$ <sup>40</sup>), al fine di garantire che la copertura delle nanoparticelle avvenga in modo completo.

Le moli totali di tioli introdotte in ciascun batch sono quindi pari a:

moli di tiolo =  $(5.22 \times 10^{-5} / 214) \times 92 \times 2 = 4.48 \times 10^{-5}$  mol. La via di sintesi seguita permette di ritrovare sulla matrice organica di copertura lo stesso rapporto tra i tioli realizzato in sede di sintesi. Si sciolgono quindi 0.134 mmol di TACNtiolo (soluzione 1) e 0.121 mmol TEGtiolo (soluzione2) deprotetti (prodotto **18** e **8** rispettivamente) ciascuno in 5 ml di MeOH.

Si procede alla formazione di 5 soluzioni:

- A. Rapporto TACN/TEG=20% → 332  $\mu$ l di soluzione 1 ( $8.90 \times 10^{-6}$  mol di TACN) + 1.48 ml di soluzione 2 ( $3.58 \times 10^{-5}$  mol di TEG);
- B. Rapporto TACN/TEG=40% → 665  $\mu$ l di soluzione 1 ( $1.78 \times 10^{-5}$  mol di TACN) + 1.11 ml di soluzione 2 ( $2.70 \times 10^{-5}$  mol di TEG);
- C. Rapporto TACN/TEG=60% → 1 ml di soluzione 1 ( $2.70 \times 10^{-5}$  mol di TACN)+ 735  $\mu$ l di soluzione 2 ( $1.77 \times 10^{-5}$  mol di TEG);
- D. Rapporto TACN/TEG=80% → 1.34 ml di soluzione 1 ( $3.58 \times 10^{-5}$  mol di TACN)+ 367  $\mu$ l di soluzione 2 ( $8.90 \times 10^{-6}$  mol di TEG);
- E. Batch TACN =100% → 1.7 ml di soluzione 1 ( $4.55 \times 10^{-5}$  mol di TACN).

Sotto vigorosa agitazione, si aggiungono tali soluzioni ai 5 batch di colloidi separati prima; dopo circa 15 minuti, in tutti e 5 i batch si assiste alla formazione di un precipitato nero, con contemporanea decolorazione progressiva della soluzione in toluene. Si protrae l'agitazione per 3 ore, a seguito delle quali si provvede all'aggiunta di 3 ml di acqua milli-Q; quindi, si fa proseguire la reazione per un'ulteriore ora. Durante tale periodo, si verifica il passaggio delle nanoparticelle dalla fase organica alla fase acquosa (la fase organica diviene nuovamente trasparente, mentre la fase acquosa acquista colorazione marrone).

Si separa poi la fase acquosa e si procede ad eseguire i seguenti lavaggi:

- 2x10ml di toluene;
- 3x10ml di etere etilico;
- 5x10 ml di acetato di etile.

Si allontanano gli eventuali solventi organici presenti all'evaporatore rotante, quindi si elimina l'acqua tramite liofilizzazione; è necessario realizzare questo

passaggio con cautela, per non asportare completamente l'acqua di solvatazione dei cluster di Au. In questo modo, si possono ottenere nanoparticelle dall'aspetto ceroso, che mantengono ancora una spiccata solubilità in acqua.

Per la realizzazione degli esperimenti successivi, si è resa necessaria la sintesi di un di batch NP ricoperte esclusivamente dal tiolo TEG e di due batch di NP funzionalizzate con 5 e 10% di TACN, rispettivamente. Si segue esattamente la stessa procedura descritta precedentemente (48.8 mg di  $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.124 mmol, sono stati ricoperti con 0.109 mmol di TEGtiolo nel primo caso. Nel secondo caso, 30 mg di  $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.076 mmol, sono stati funzionalizzati con  $5.84 \times 10^{-6}$  mol di TACN e  $1.11 \times 10^{-4}$  mol di TEG, per avere il 5% di TACN nella matrice organica; mentre, per averne il 10% si sono funzionalizzati 30 mg di  $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  con  $1.17 \times 10^{-5}$  mol di TACN e con  $1.05 \times 10^{-4}$  mol di TEG).



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Mammen, M.; Choi, S.K.; Whitesides, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 2908-2953; *Angew.Chem.Int.Ed* **1998**, 37, 2754-2794.
2. Seok-Ki Choi, *Synthetic Multivalent Molecules, Concepts and Biomedical Applications*. Wiley, 2004.
3. Kitov, P. I.; Bundle, D. R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16271-16284.
4. Come esempi illustrativi: a) Badjic, J.D.; Balzani, V.; Credi, A.; Silvi, S.; Stoddart, J.F. *Science*, **2004**, 303, 1845-1849; b) Rao, J.; Lahiri, J.; Isaacs, L.; Weis, R.M.; Whitesides, G.M., *Science*, **1998**, 280, 708-711; c) Kitov, P.I.; Sadowska, J.M.; Mulvey, G.; Armstrong, G.D.; Ling, H.; Pannu, N.S.; Read, R.J.; Bundle, D.R., *Nature*, **2000**, 403, 669-672.
5. Come esempi illustrativi: a) Prinzen, L.; Miserus, R.J.H.M.; Dirsken, A.; Hackeng, T.M.; Decker, N.; Bitsch, N.J.; Megens, R.T.A.; Douma, K.; Heemskerk, J.W.; Kooi, M.E.; Frederik, P.M.; Slaaf, D.W.; Van Zandvoort, M.A.M.J.; Reutelingsperger, C.P.M, *Nano Lett.* **2007**, 7, 93-100; b) Kostianinen, M.A.; Szilvay, G.R.; Smith, D.K.; Linder, M.B.; Ikkala, O. *Angew. Chem. Int. Ed*, **2006**, 45, 3538-3542; c) Rameshwer, R.; Thomas, T.P.; Peters, J.; Kotlyar, A.; Myc, A.; Baker, J.R.J., *Chem. Comm.* **2005**, 5739-5741; d) Chang, T.; Rozkiewicz, D.I.; Ravoo, B.J.; Meijer, E.W.; Reinhoudt, D.N. *Nano Lett.* **2007**, 7, 978-980.
6. Come esempi illustrativi: a) Renner, C.; Piehler, J.; Schrader, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 620-628; b) Haag, R.; Kratz, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1198-1215.
7. Come esempi illustrativi: a) Dietrich, C.; Schmitt, L.; Tampé, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 9014-9018; b) De Jong, M.R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N.; *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 4164-4170; c) Thibault, R. J., Jr; Galow, T. H.; Turnberg, E. J.; Gray, M.; Hotchkiss, P. J.; Rotello, V.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 15249-15254.
8. Handl, H. L.; Vagner, J.; Han, H.; Mash, E.; Hruby, V. J.; Gillies, R. J. *Exp. Opin. Ther. Targets* **2004**, 8, 565-586.

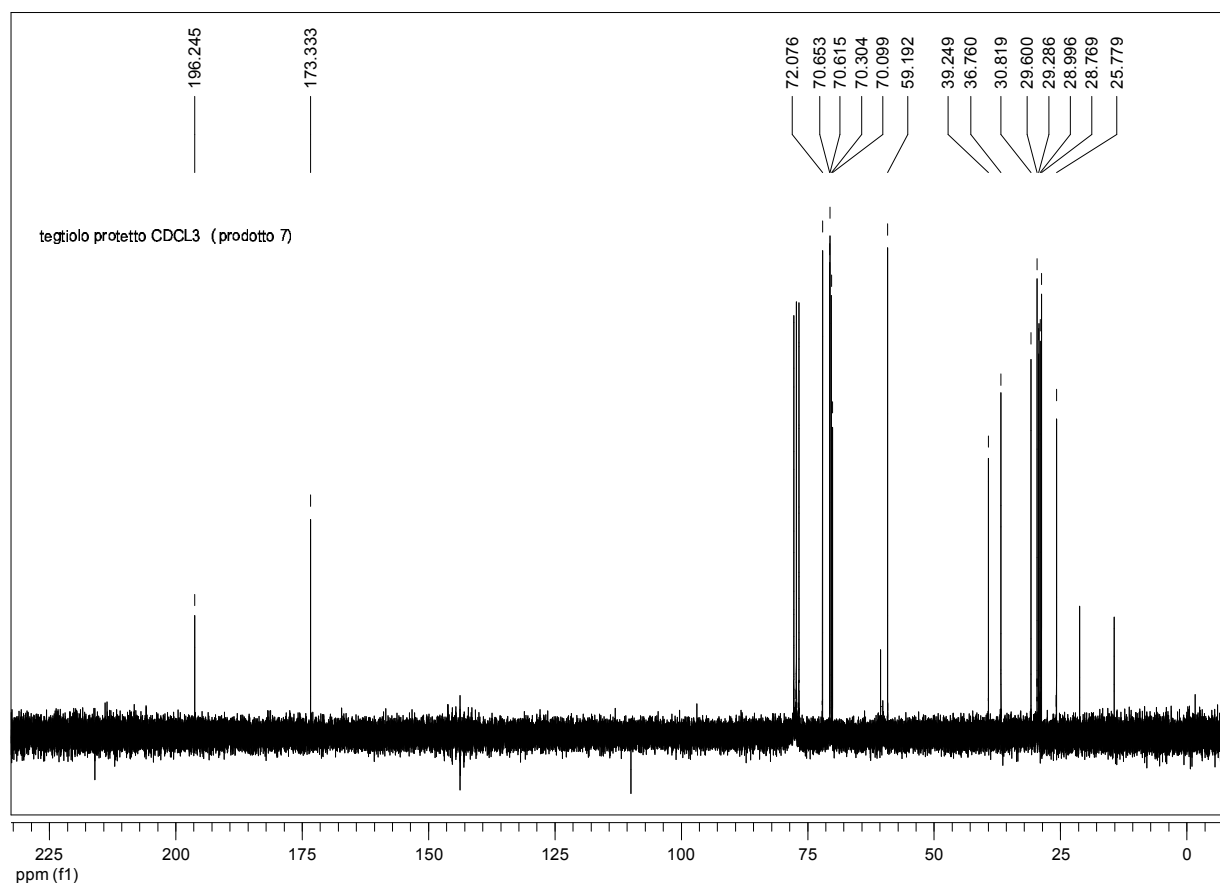
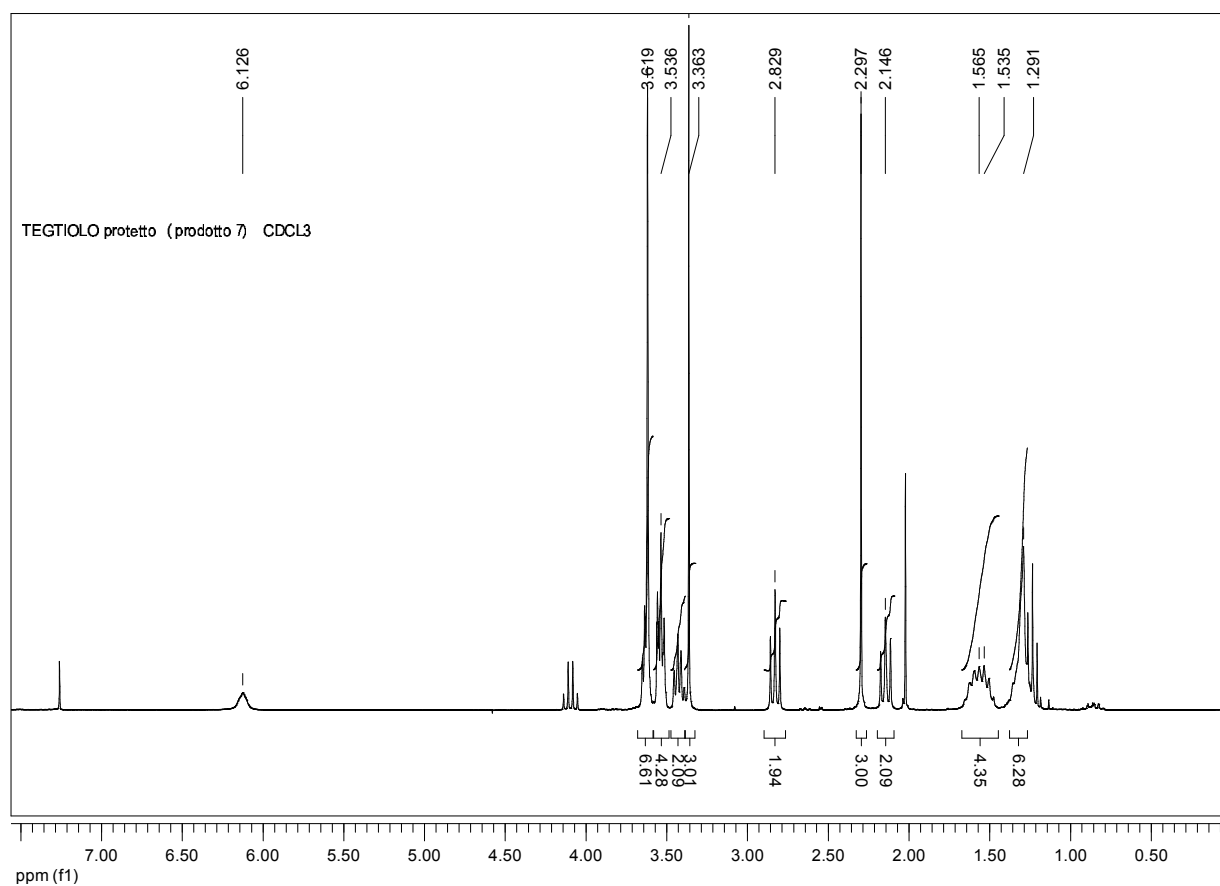
9. Kiessling, L.L.; Gestwicki, J.E.; Strong, L.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2348-2368.
10. Lunquist, J.J.; Toone, E.J. *Chem Rev.* **2002**, 102, 555-578.
11. Kiessling, L.L.; Gestwicki, J.E.; Strong, L.E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 696-703.
12. Dahan, A.; Portnoy, M.J. *Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 235-262.
13. Breslow, R.; Belvedere, S.; Gershell, L.; Leung, D. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 333-342.
14. Badjic, J.D.; Nelson, A.; Cantrill, S.J.; Turnbull, W.B.; Stoddart, J.F. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 723-732.
15. Mulder, A.; Husken, J.; Reinhoudt, D.N. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 3409-3424.
16. Ludden, M.J.W.; Reinhoudt, D.N.; Husken, J. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 1122-1134.
17. a) Martin, M.; Manea, F.; Fiammengo, R.; Prins, L.J.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6982-6983; b) Darbre, T.; Reymond, J. L.; *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 925-934; c) Liang, C.; Frechet, J.M.J. *Progr Polym,Sci.* **2005**, 30, 385-402; d) Oosterom, G.E.; Reek, T.N.H.; Kamer, P.C.J.; Van Leeuwen, P.W.N.N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1828-1848. Gestwicki, J.E.; Cair, C.W.; Strong, L.E.; Oetjen, K.A.; Kiessling, L.L., *J. Am. Chem.Soc.* **2002**, 124, 14922-14933.
18. a) Klotz, I.M.; *Enzyme Mechanisms*; Page, M.I.; Williams, A., Eds; Royal Society of Chemistry: London, 1987; Chapter 2; b) Suh, *J.Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 562-570.
19. Gestwicki, J.E.; Cairo, C.W.; Strong, L.E.; Oetjen, K.A.; Kiessling, L.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922-14933.
20. a) Templeton, A.C.; Wuelfing, M.P.; Murray, R.W. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 27-36; b) Daniel, M.C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 293-346.
21. De la Fuente, J.; Barrientos, A.G.; Rojas T.C.; Rojo, J.; Canada, J.; Fernandez, A.; Penades, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 3052-3055;

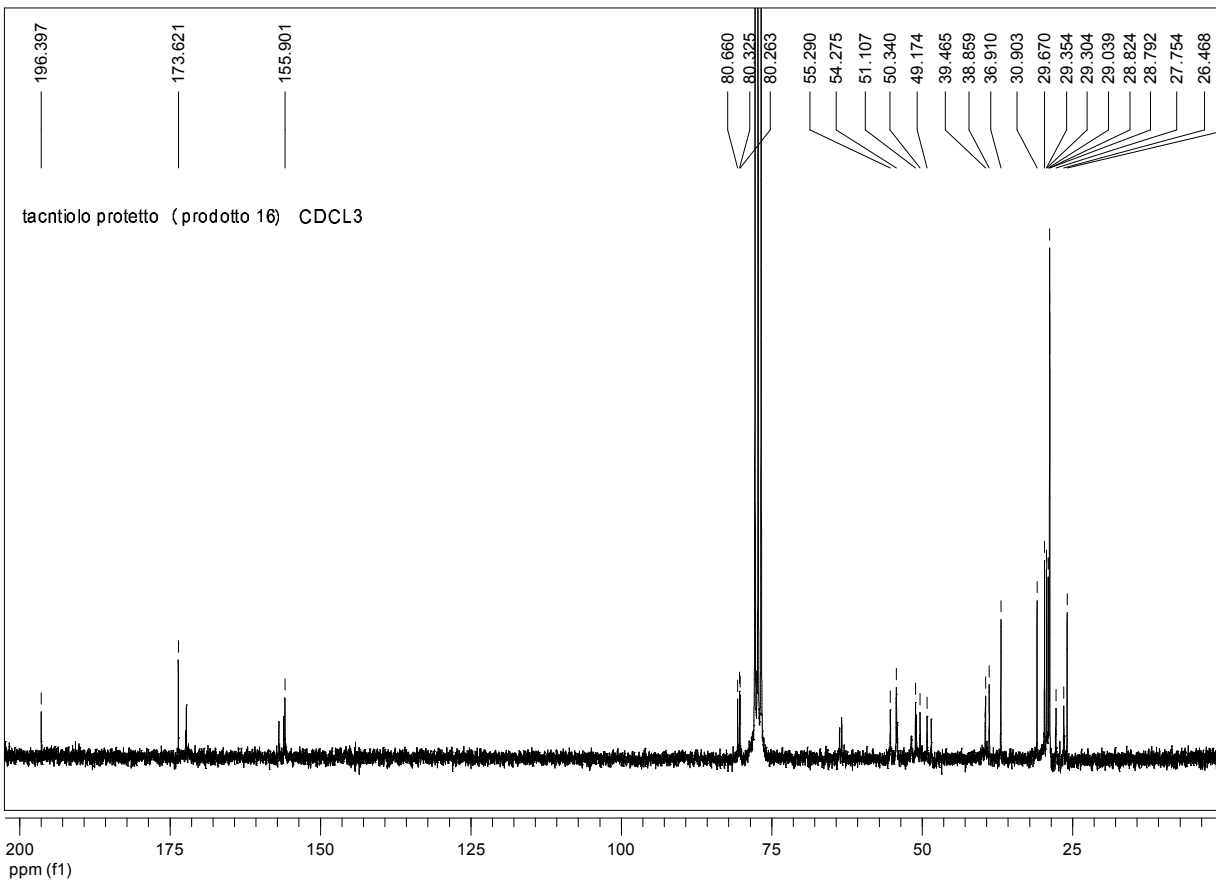
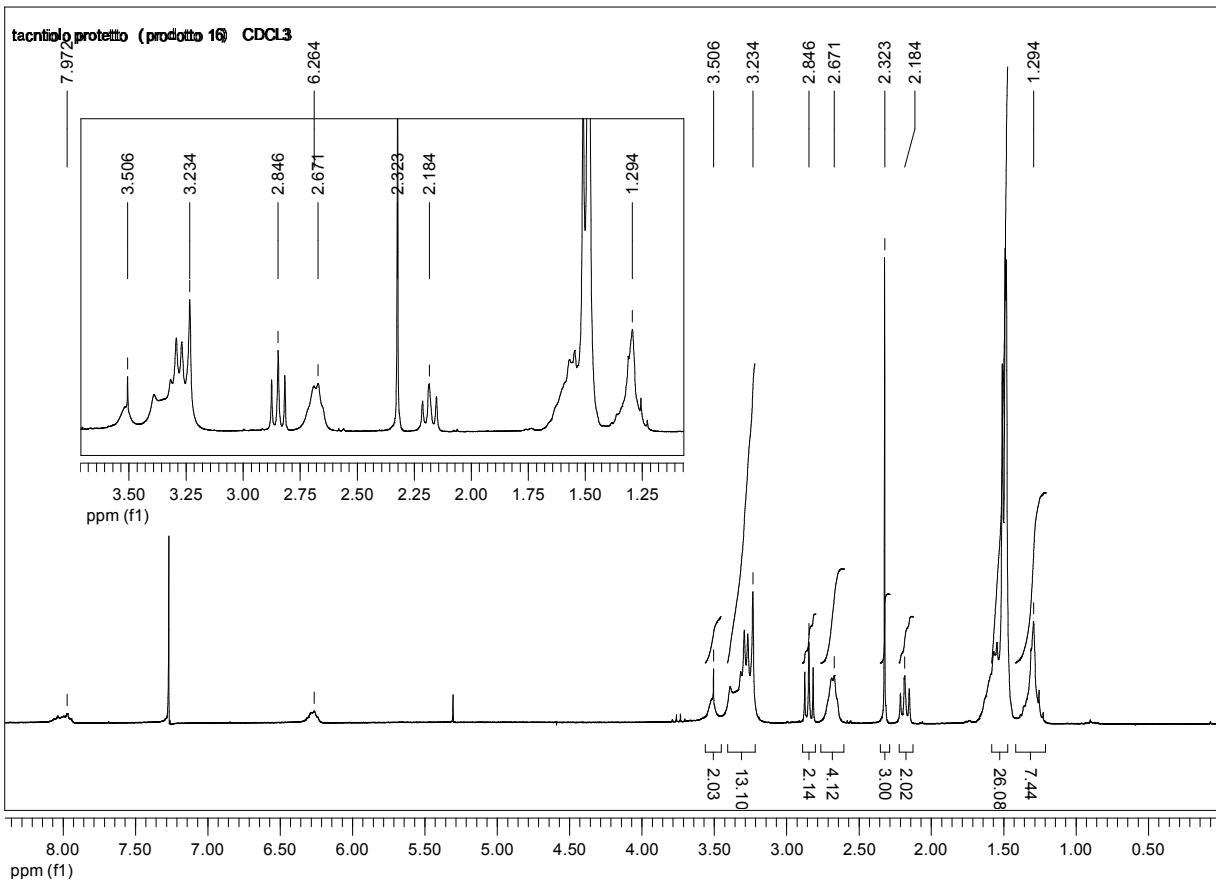
22. a) Manea, F.; Houillon, F.B.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem* **2004**, 43, 6165-6169; b) Pengo, P.; Baltzer, L.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 400-404; c) Pengo, P.; Polizzi, S.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *J. Am Chem. Soc.* **2005**; d) Pasquato, L.; Pengo, P.; Scrimin, P. *Supramol. Chem.* **2005**, 17, 163.
23. Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir*. **2008**, 24, 4120-4124;
24. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D.J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801-802.
25. Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Bunton, C.A. *Colloids Surf. A* **1998**, 144, 71-79.
26. Bunton, C.A.; Nome, F.; Quina, F.H.; Romsted, L.S. *Acc. Chrm. Res.* **1991**, 24, 357-364.
27. Murakami, Y.; Hisaeda, Song, X.M.; Ohno, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 1527-1528; Groves, J.T.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2900-2909.
28. For reviews: (a) Williams, N.H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 485. (b) Morrow, J.R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 192.
29. A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO J.* **1991**, 10, 1607-1618.
30. Adamson, A.W.; Gast, A.P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6<sup>th</sup> Ed; Wiley-Interscience : New York, 1997.
31. Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103-1169.
32. Lévy, R. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1141-1145.
33. Stranick, S.J.; Parikh, A.N.; Tao, Y.T.; Allara, D.L.; Weiss, P.S. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 7637-7646.
34. Ghosh, P.S.; Verma, A., Rotello, V.M. *Chem. Commun.* **2007**, 2796-2798.
35. Duchesne, L.; Wells, G.; Fernig, D.G.; Harris, S.A.; Lévy, R. *ChemBioChem* **2008**, 9, 2127-2134.

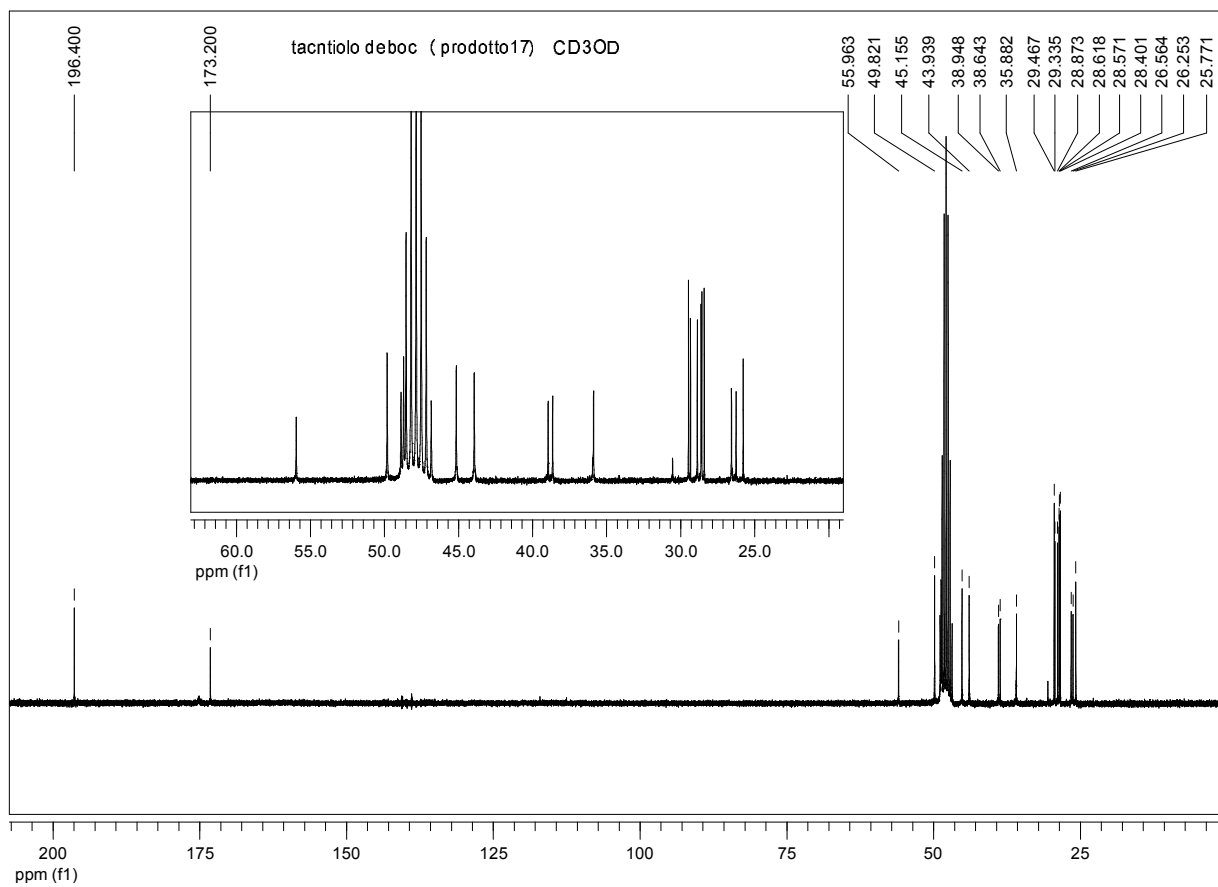
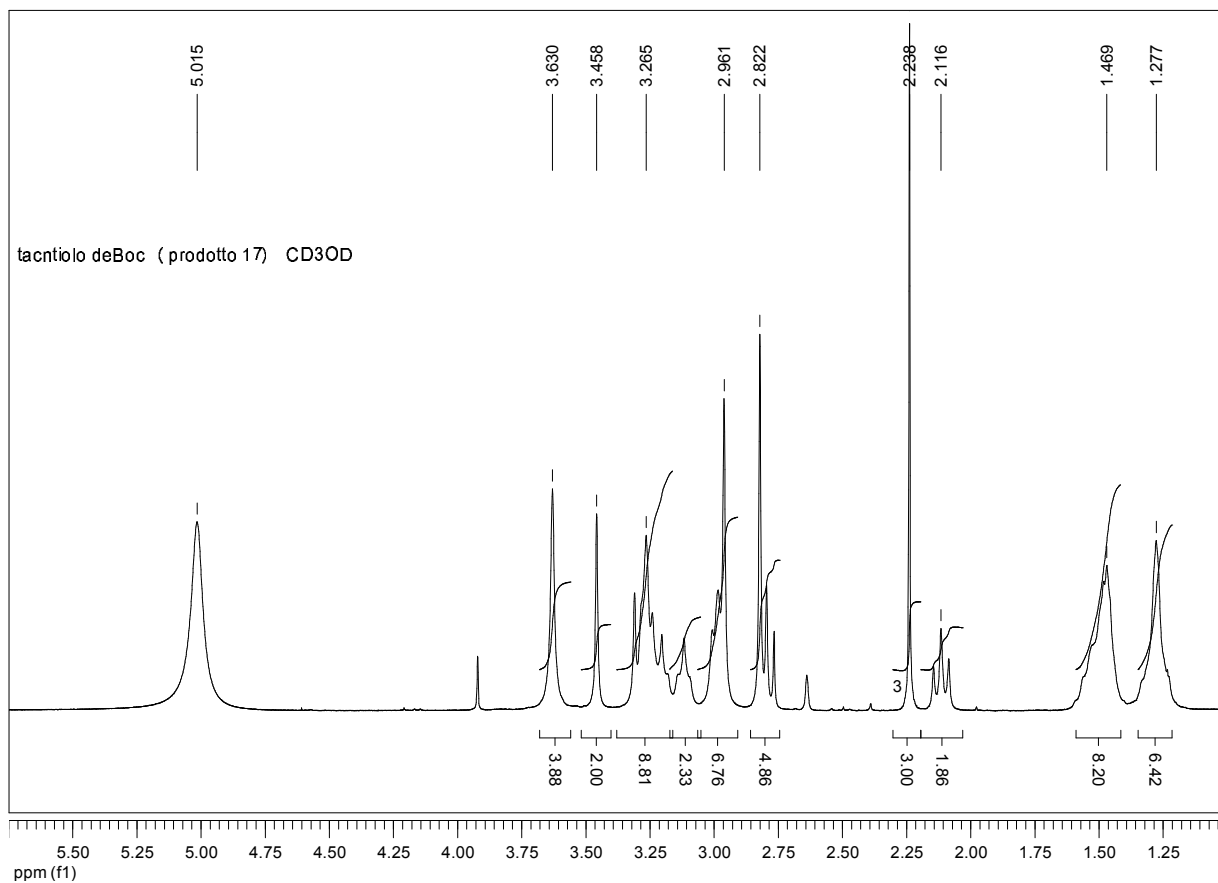
36. a) Devries, G.A.; Brunnbauer, M.; Hu, Y.; Jackson A.M.; Long, B.; Neltner, B.T.; Uzun, O.; Wunsch, B.H.; Stellacci, F. *Science* **2007**, 315, 358.; b) Jackson A.M.; Myerson, J.W.; Stellacci, F. *Nat. Mater.* **2004**, 3, 330.
37. Jadzinsky, P.D.; Calero, G.; Ackerson, C.J.; Bushnell, D.A.; Kornberg, R.D. *Science* **2007**, 430, 318.
38. Manna, L.; Scher, E.; Alivisatos, A.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122-12700.
39. Murray, C.B.; Kagan, C.R.; Bawendi, M.G.; *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, 30, 545.
40. Hostetler, M.; Wingate, J. *Langmuir*, **1998**, 14, 17-30.
41. Templeton, A.C.; Hostetler, M.J.; Kraft, C. T.; Murray, R. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 1906-1911.
42. a) Schreiber, F.; *Prog. Surf. Sci.*, **2000**, 65-151; b) Labinis, P.E.; Fox, M.A.; Folkers, J.P.; Whitesides, G.M.; *Langmuir*, **1997**, 13, 1558.
43. Zaupa, G.; Scrimin, P.; Prins, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5699-5709.
44. Lucarini, M.; Franchi, P.; Pedulli, G.F.; Pengo, P.; Scrimin, P.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 9326-9329.
45. Kovari, E.; Heitker, J.; Kramer, R. *Chem. Comm.*, **1995**, 1205-1206.
46. Brown, D. M. ; Usher, D. A.; *J. Chem. Soc.* **1965**, 6558-6564.

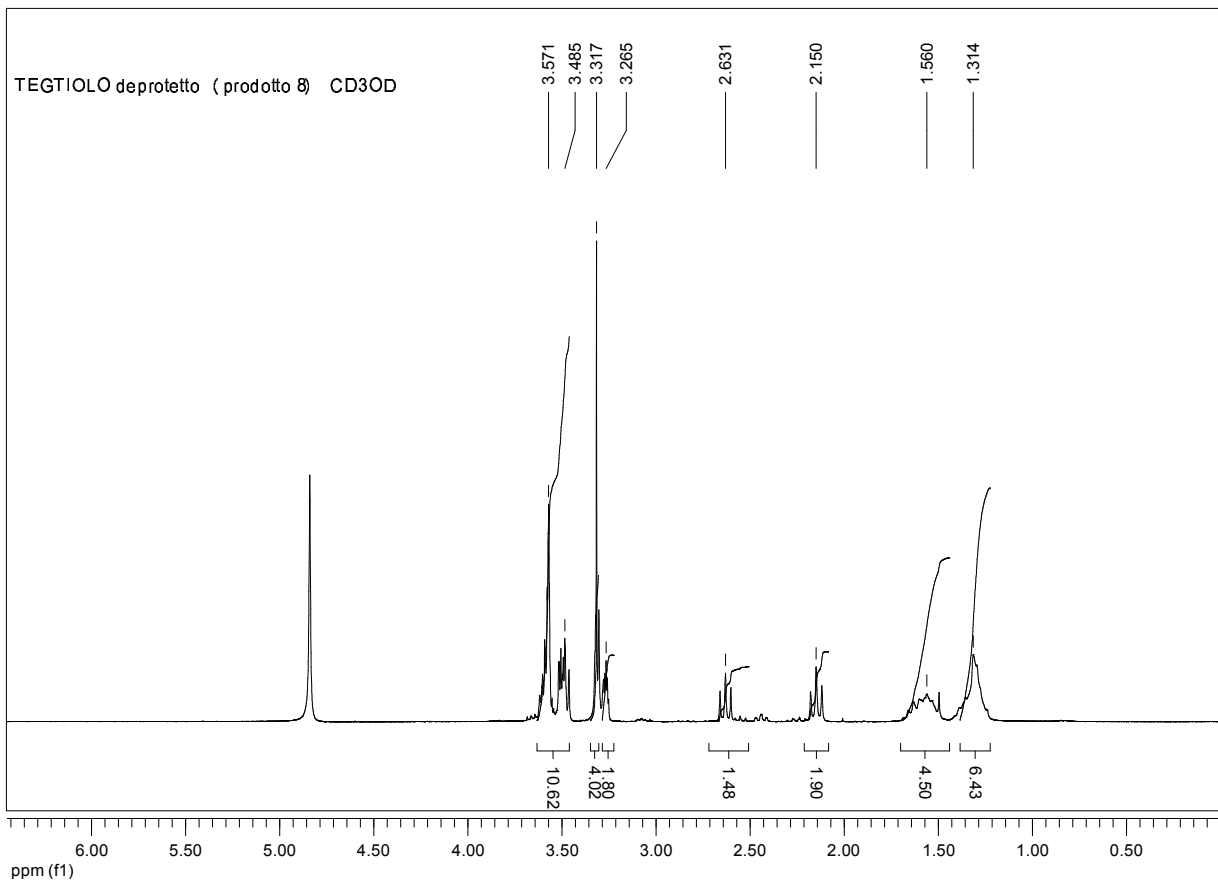
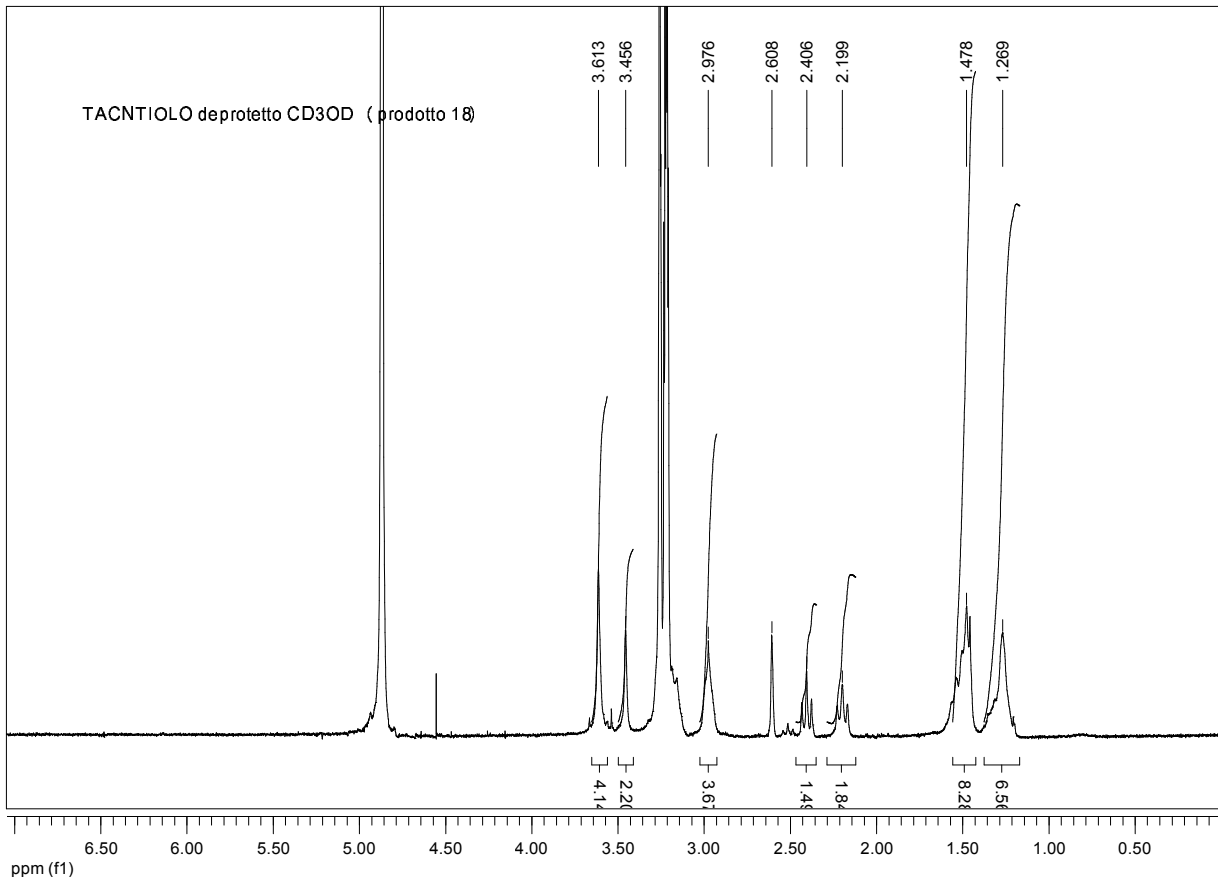


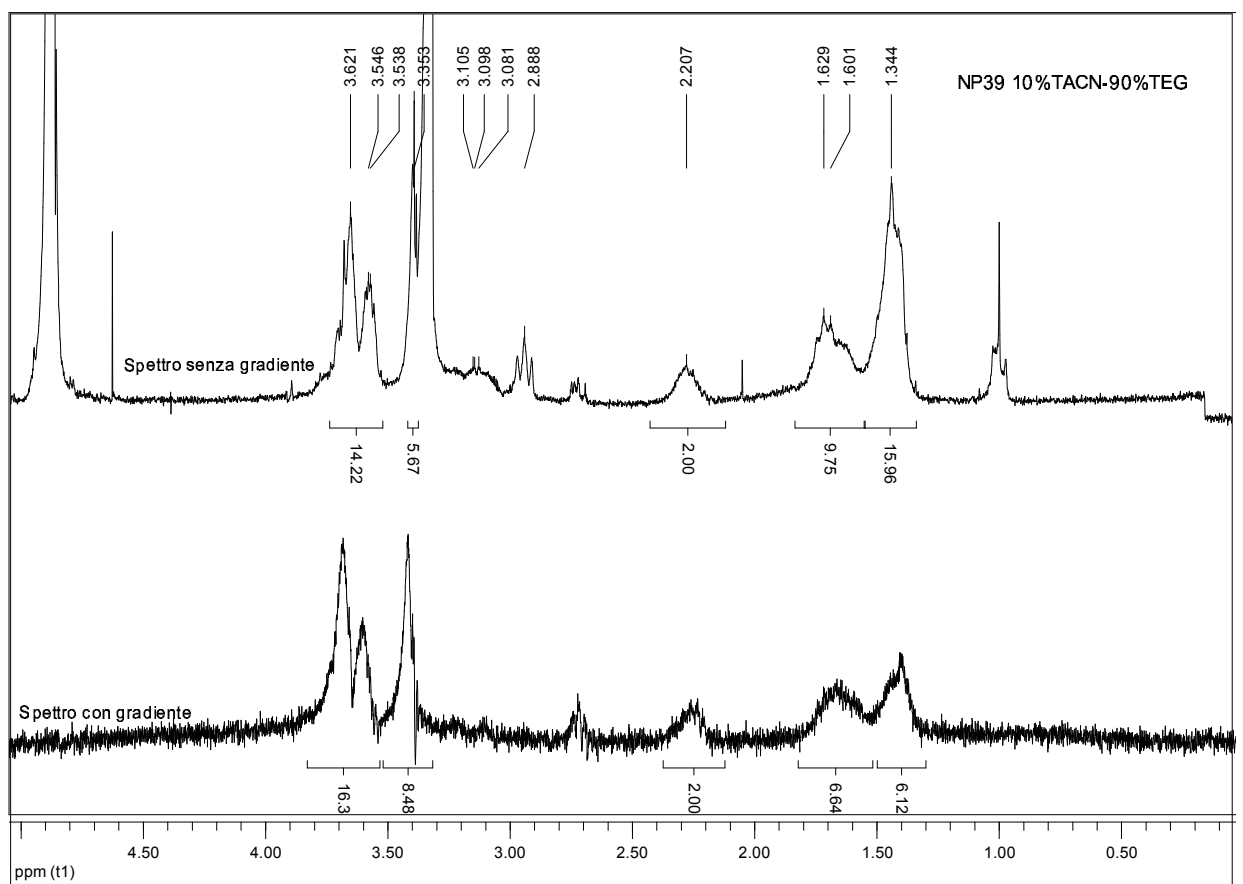
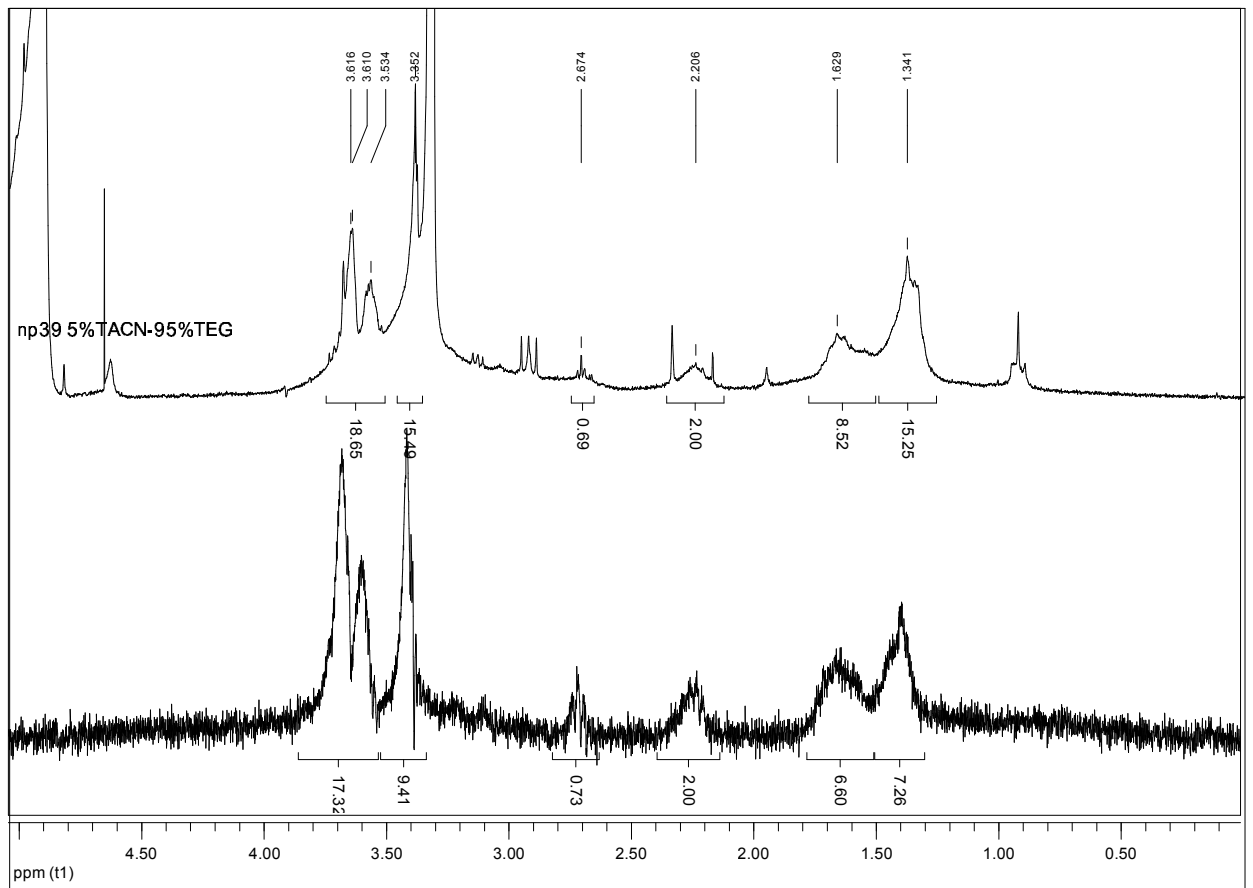
## 7. SPETTRI

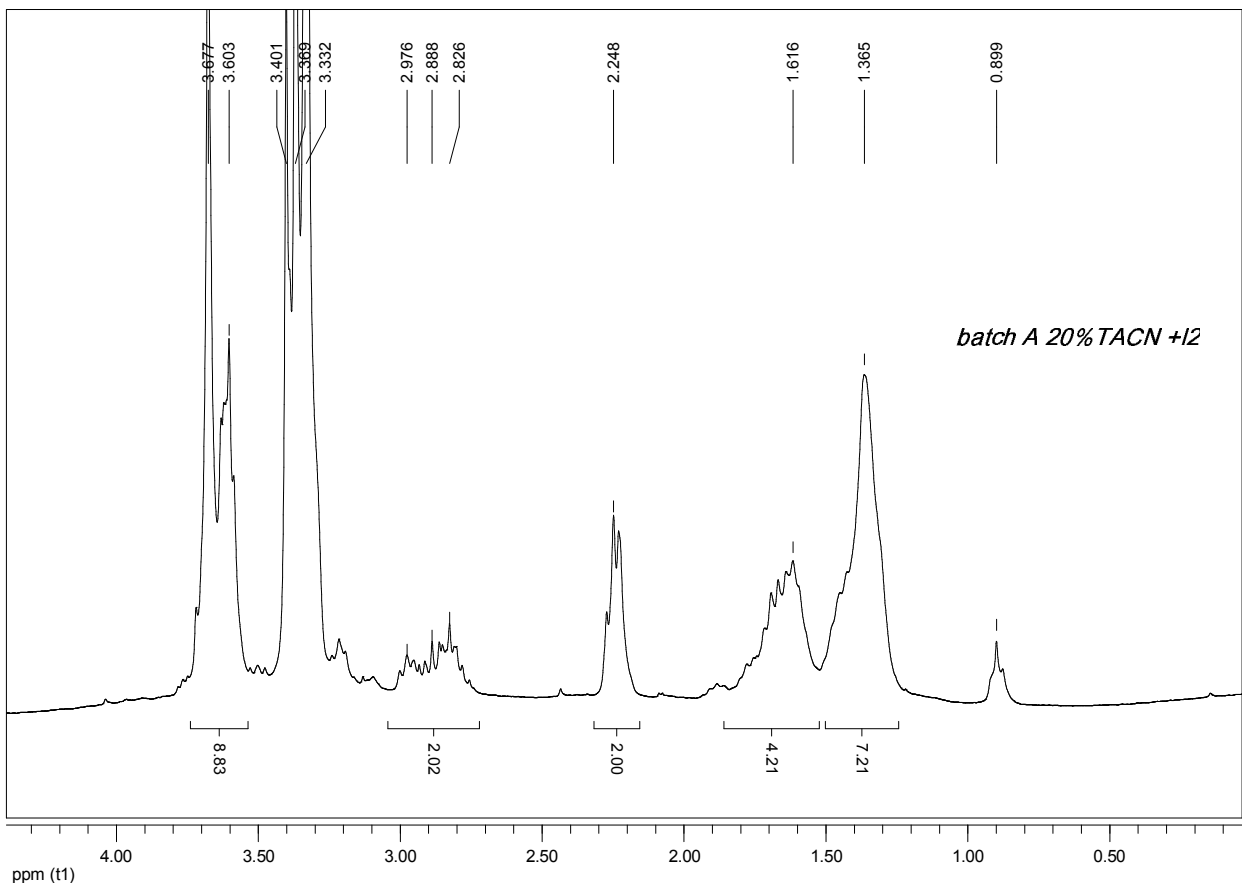
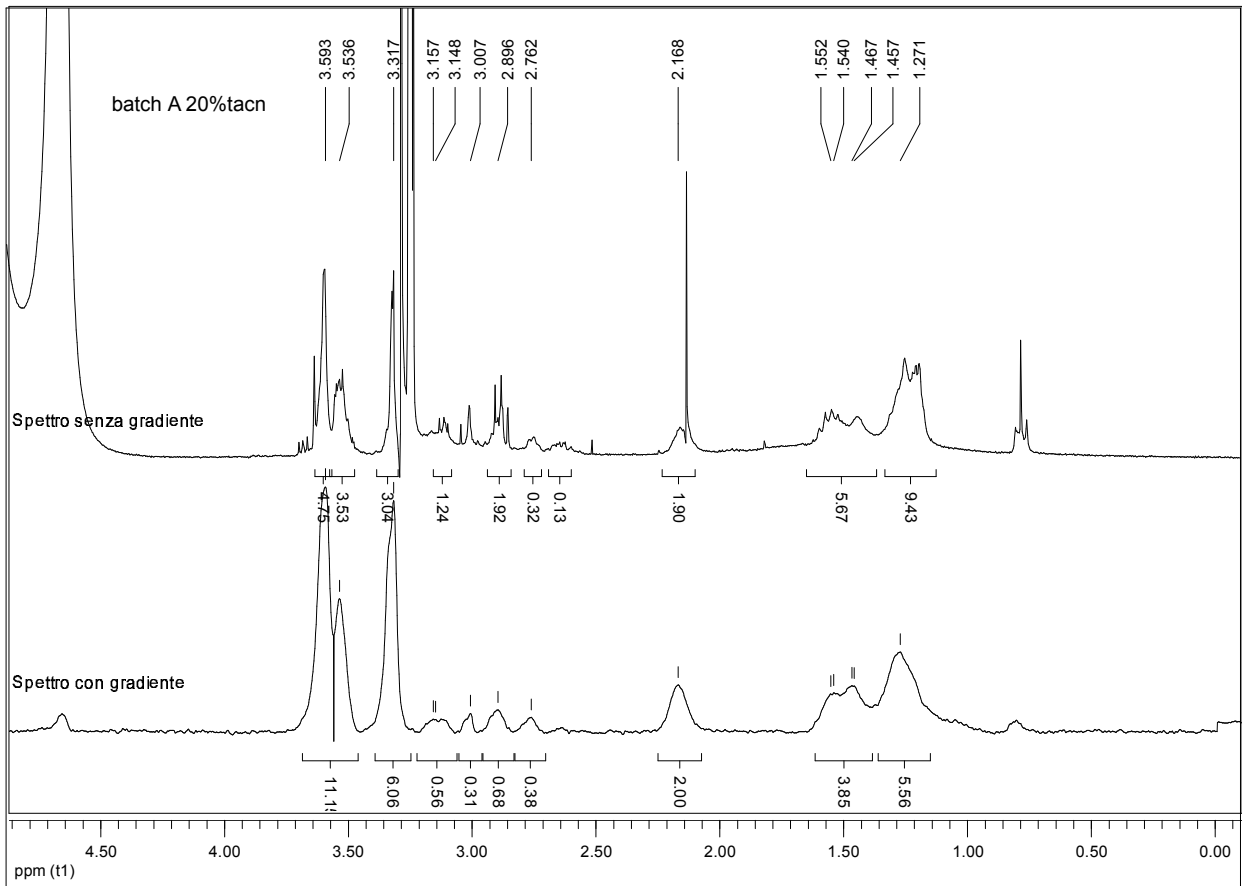


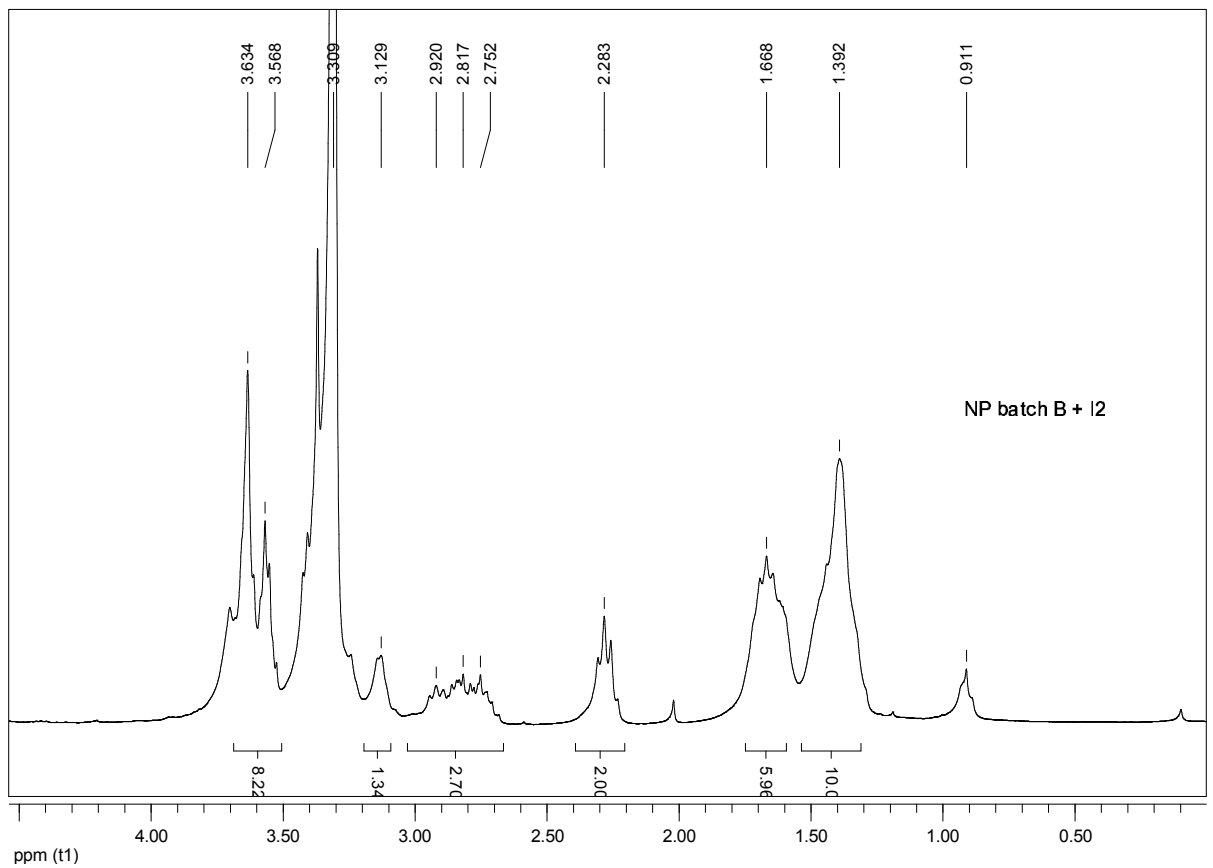
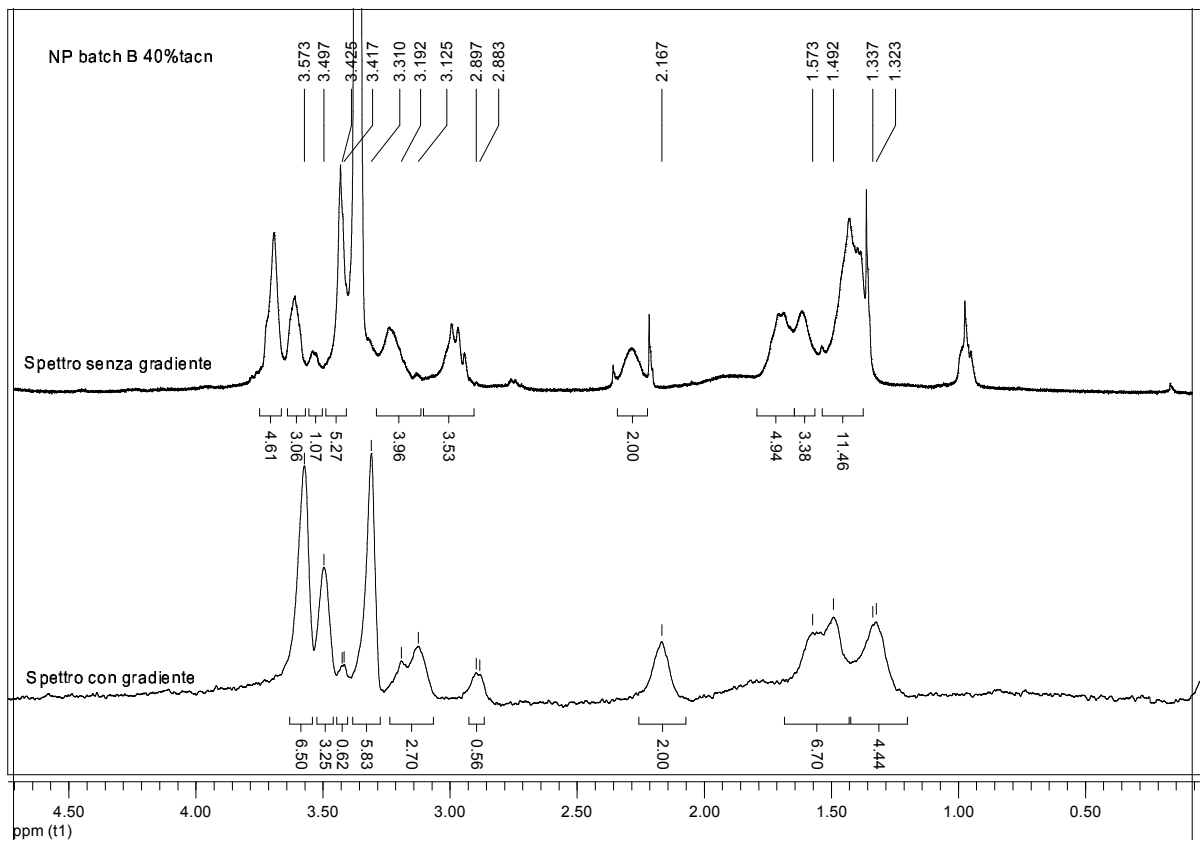


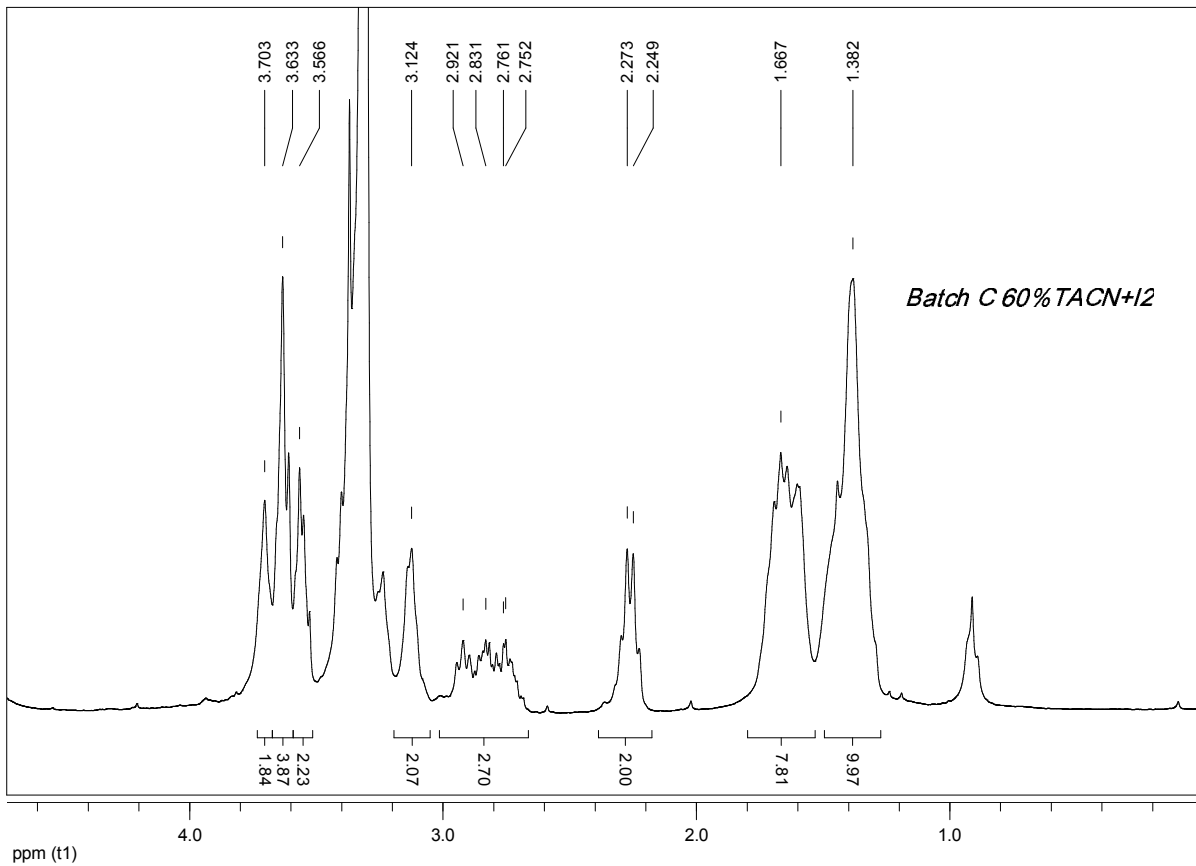
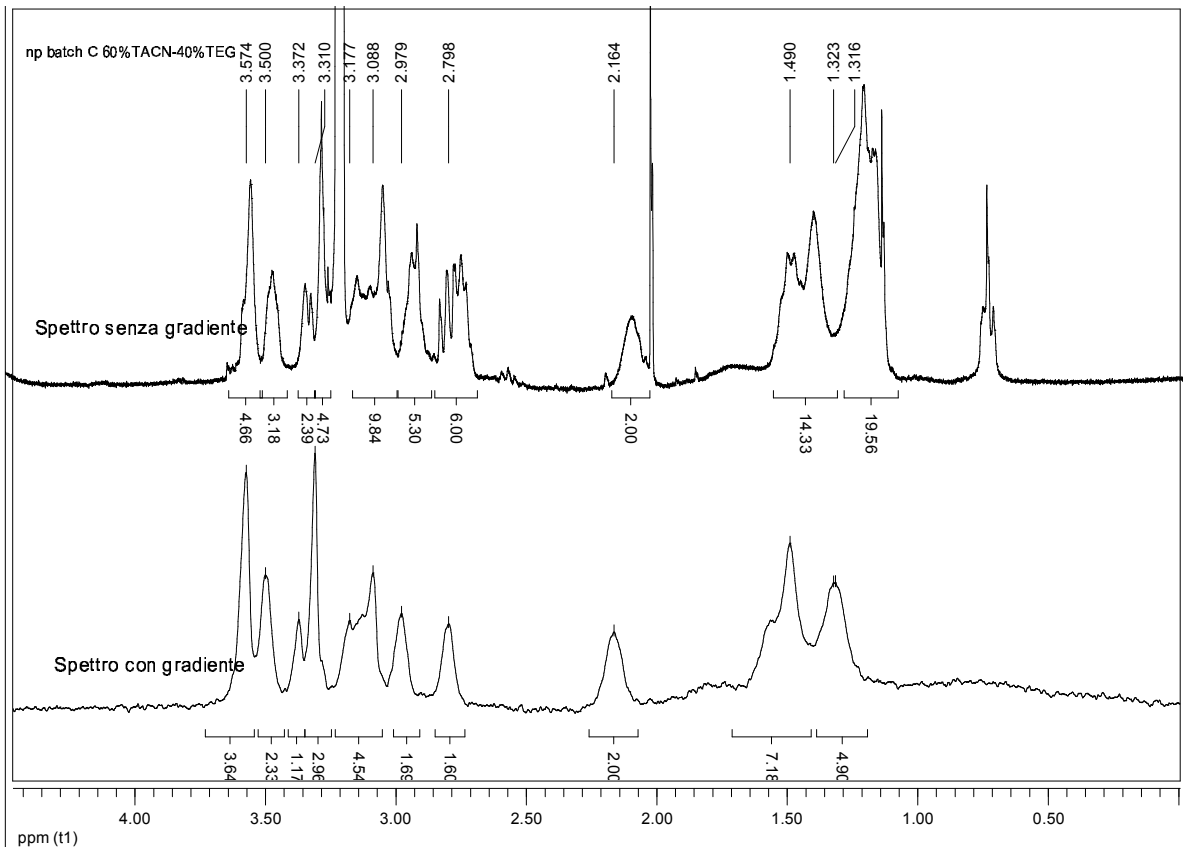




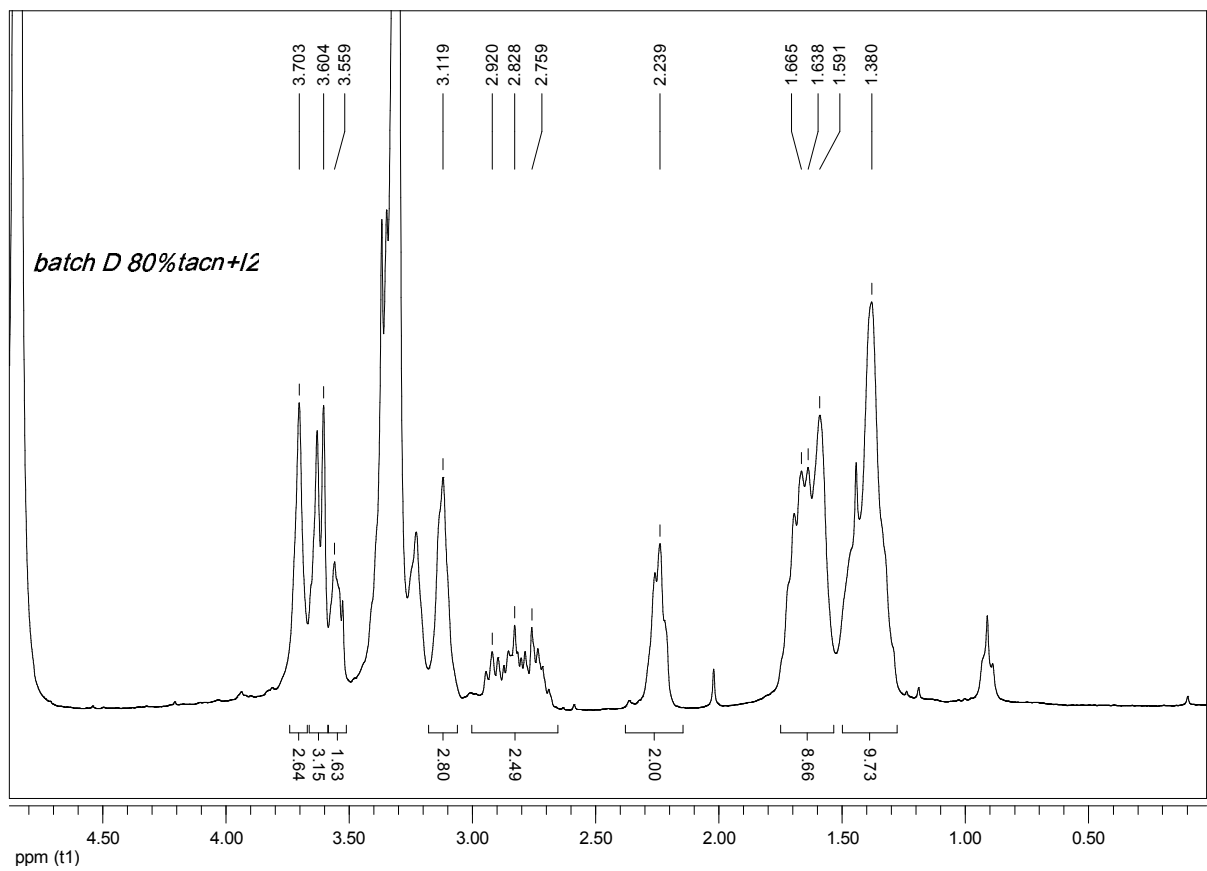
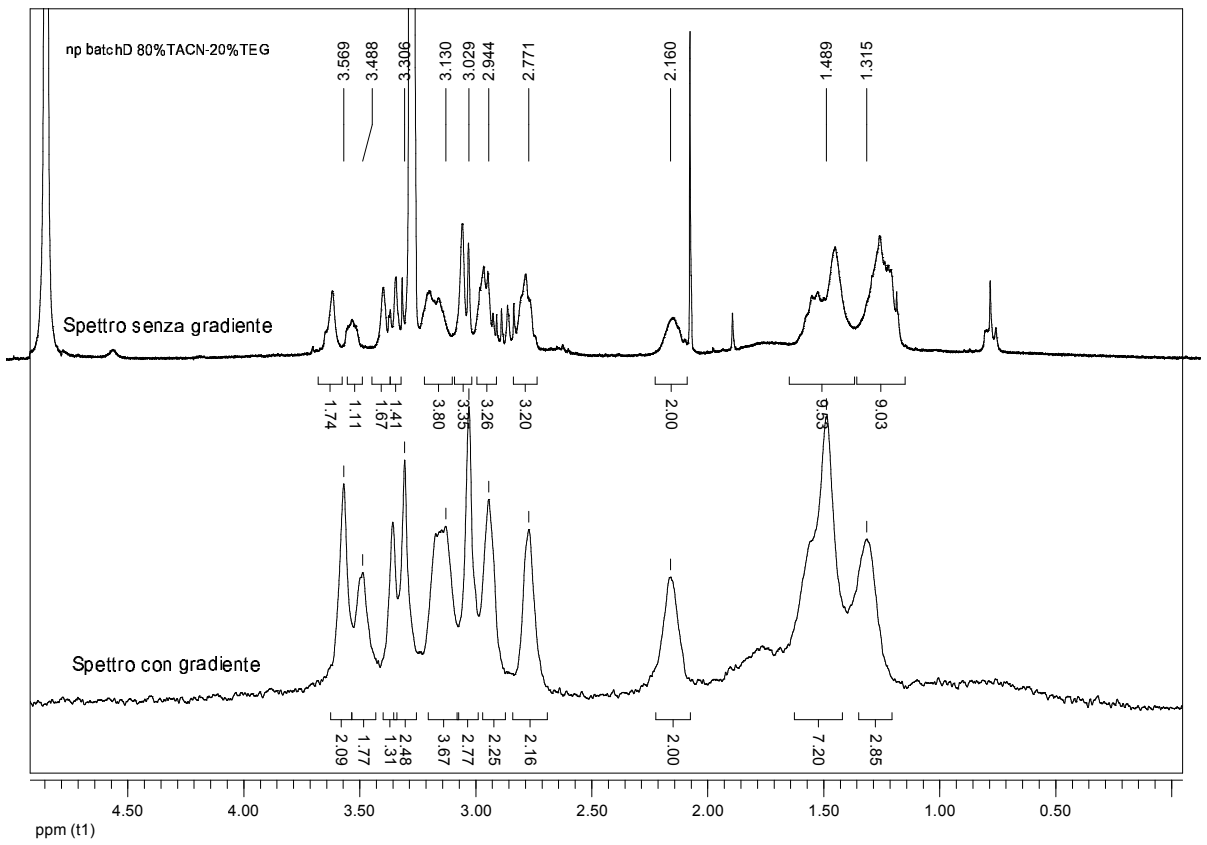


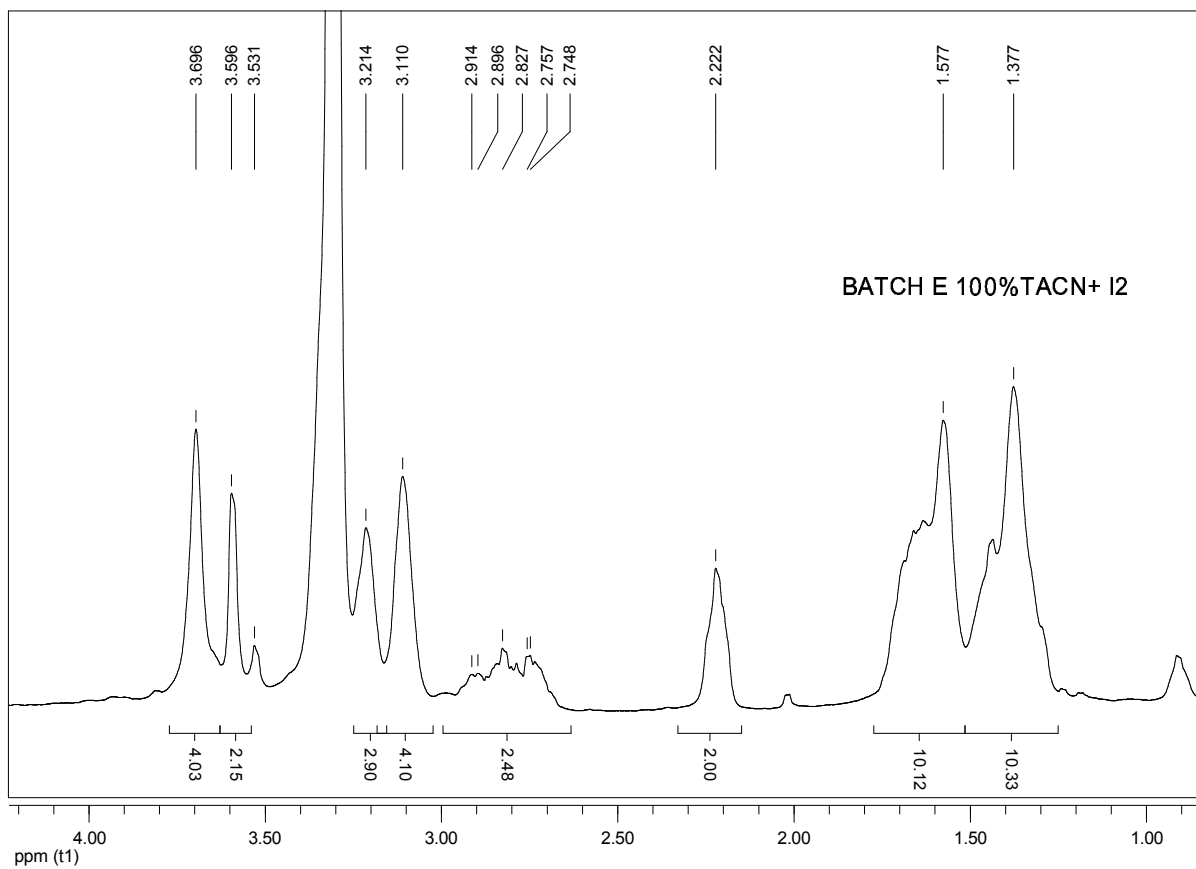
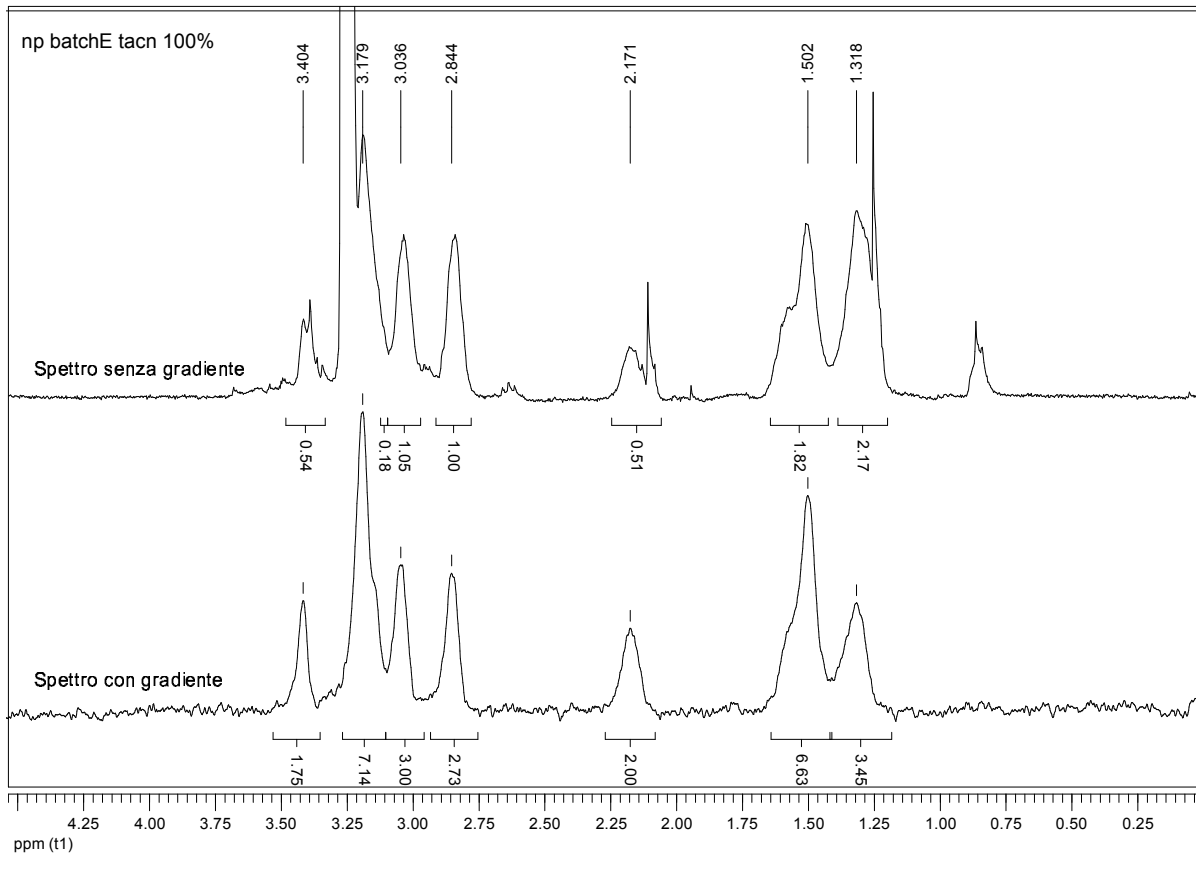












### ***Ringraziamenti:***

Desidero ringraziare in primo luogo il Professor Scrimin per avermi dato l'opportunità di svolgere questo internato di Tesi e per la disponibilità che mi ha sempre dimostrato. Grazie anche al professor Prins, o meglio a Leonard, per avermi guidato con competenza, gentilezza ed entusiasmo tra i meandri del mio progetto di Tesi.

Grazie mille Giovanni, per aver sopportato con pazienza il mio disordine e le mie rotture (nel vero senso della parola) e per avermi sempre offerto il tuo salvifico aiuto. Grazie a Giulio, Federico, Marta e Matteo, o meglio Tim Burton, per la compagnia e le risate fatte in lab, nonostante il Metal! Grazie alla rubrica del Metro, "La posta del Cuore", per averci donato dei momenti decisamente toccanti.

Grazie mille ai miei compagni di corso, per avermi iniziato all'arte dello scopone scientifico e avermi regalato delle scene indimenticabili: mi mancherete cari!

Fede, ovviamente un super grazie a te, per essere stato prima un super compagno di corso, poi un meraviglioso amico, quindi un confidente comprensivo e alla fine anche un vigliacco Ladro di sorella (scherzo)!

Grazie a Jacopo, Leti e tutti gli altri erasmus per aver rallegrato il soggiorno parigino.

Grazie alle mie compagne di appartamento, in particolare Leila grazie (anche se non ti fai mai vedere!!!!) per avere portato un tocco esotico-principesco nella nostra casa un po' rustica, e ovviamente Miky, grazie FES per l'affetto sincero che mi hai sempre dimostrato: senza di te stare a Padova non sarebbe stata la stessa cosa.

Grazie alla Fia e al Teo: siete veramente gli amici più glitter che uno possa immaginare di avere! Grazie Fra, la mia amichetta di sempre: non occorre dirtelo che, senza di te, sarei ancora all'asilo! Grazie anche al Francy e alla Silvia Masso: anche se non ci si vede spesso, ho sempre potuto contare sulla vostra sincera amicizia!

E adesso veniamo alla famijja!!!! Grazie alla mia nonna Marì, per essere stata una nonna affettuosa e folcloristica! Grazie ai miei Zii, con la Z maiuscola appunto, Sandro e Liana, per il caloroso affetto che da sempre mi avete donato. Grazie al Marco, tenerone: da quando sei arrivato tu, non sono più la sola svanita in famiglia! Grazie alla mia cuggi per essermi Sempre stata vicina e avermi sempre difeso! Grazie al Marci e alla Laura, per aver fatto la Giuli, la mia super nipotina.

Grazie alla mia sorella, amica, seconda mamma, madrina.....: Silvia, spesso non riesco a dimostrarti quanto ti voglio bene, quanto ti stimo e quanto ti sono grata!

Grazie alla mia mamma, per avermi sempre rincuorato, ascoltato e incitato ed avermi insegnato un affetto sincero, quello da groppo alla gola. Grazie al mio Papà, per essere sempre stato al mio fianco.

E alla fine (paura che ti dimenticassi, eh??) grazie Paolo, per avermi dimostrato che anche il nylon può diventare una bacchetta magica e trasformare una vita in una favola.