

INDICE

CAPITOLO 1_ INTRODUZIONE	5
1.1 Nanoparticelle per Drug Delivery	7
1.2 Nanoparticelle di silice	9
1.3 Terapia fotodinamica (PDT)	13
CAPITOLO 2_ OBIETTIVO della TESI	17
CAPITOLO 3_ RISULTATI e DISCUSSIONE	21
3.1 Ottimizzazione della sintesi delle nanoparticelle di silice ORMOSIL ...	23
3.2 Funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle	25
3.2.1 Interazione con albumina di siero umano (HSA).....	25
3.2.2 Sintesi di NP ORMOSIL funzionalizzate con una serie di organosilani con struttura omogenea ma carica diversa.....	29
3.2.3 Sintesi e studio delle proprietà di NP ORMOSIL fotoconiugabili.....	31
3.3 Conclusione	51
CAPITOLO 4_ PARTE SPERIMENTALE	53
4.1 Strumentazione	55
4.2 Solventi e soluzioni	56
4.3 Ottimizzazione sintesi delle nanoparticelle di silice	57
4.4 Determinazione ricoprimento di nanoparticelle di silice commerciali con albumina	58
4.5 Sintesi libreria chimica	59
4.5.1 Sintesi precursori	59
- Sintesi di 11-(N,N,N-trimeti) dodechene	59
- Sintesi di dodec-11-en-1-il (2-(trimetilammonio)etil) fosfato	60
1_Sintesi 2-bromoetil fosforodichloroidrato	60
2_Sintesi 2-bromoetil dodec-11-en fosfato	61

3_Sintesi dodec-11-en-(2-(trimetilammonio)etil) fosfato	62
- Sintesi undec-10-en-fosfato.....	63
4.5.2 Metodo di sintesi generale dei derivati silani a partire dai precursori	64
4.5.3 Metodo di sintesi nanoparticelle funzionalizzate con la libreria chimica	66
4.6 Sintesi nanoparticelle funzionalizzate con furano.....	68
4.6.1 Sintesi 1-[(3-furan-2-ilpropanoil)ossi]pirrolidina-2,5-dione.....	68
4.6.2 Sintesi di m-THPC mono Si.....	69
4.6.3 Sintesi PEG ₃₄₀₀ NH ₂	70
4.6.4 Sintesi nanoparticelle funzionalizzate al 10% con PEG NH ₂	71
4.6.5 Funzionalizzazione nanoparticelle con derivati del furano	74
4.6.6 Reazioni di prova per verificare la funzionalizzazione con furano	76
- Formazione idrazoni aromatici	76
- Reazione Dieals-Alder	77
- Sintesi 1-{2-[(7-nitro-2,1,3-benzossidiazol-4-il)amino]etil}-1 <i>H</i> -pirrole-2,5-dione	77
4.7 Test fluorescamina	79
BIBLIOGRAFIA	83

CAPITOLO 1
INTRODUZIONE

1.1 Nanoparticelle per Drug Delivery

Particelle con dimensioni dell'ordine di grandezza dei nanometri possono essere utili per la costruzione di sistemi di trasporto per i farmaci. Questi particolari sistemi di trasporto, anche definiti *carrier*, vengono combinati con farmaci o con agenti attivi e utilizzati affinché li trasportino all'interno del tessuto malato e li rilascino in maniera controllata. Questo processo nel linguaggio scientifico viene definito *drug delivery*.¹

I metodi tradizionali usati per il trattamento dei tumori, come l'intervento chirurgico, la chemioterapia e la radioterapia, presentano ancora molti problemi: non sono in grado di essere selettivi e colpiscono quindi indistintamente sia le cellule malate che quelle sane. Invece il sistema *drug delivery* dovrebbe rilasciare in maniera controllata il farmaco solo nella zone di interesse. Questo comporta l'uso di una dose molto inferiore di farmaco e un suo minor accumulo nei tessuti sani, diminuendone di conseguenza la tossicità.

Inoltre lo scopo di un sistema di *drug delivery* è quello di migliorare i problemi della somministrazione del farmaco legati alla farmacocinetica e farmacodinamica quali la bassa biodisponibilità, la mancanza di selettività e la rapida cattura da parte del sistema immunitario.

L'inclusione dei farmaci in un sistema *drug delivery* permette anche di migliorarne la solubilità rendendone più agevole la somministrazione e consentendone un rilascio controllato.²

La progettazione di una nanoparticella capace di svolgere un'efficace azione di *drug delivery* richiede comunque l'adozione di accurate strategie che la rendano in grado di superare gli ostacoli principali incontrati all'interno di un organismo vivente. Il primo tra essi è il sistema immunitario, organizzato ed evoluto per intercettare corpi estranei di dimensioni nanometriche o micrometriche (virus e batteri).

Le strategie per ottenere una nanoparticella in grado di superare la barriera immunitaria si basano sulla funzionalizzazione superficiale con molecole o polimeri con caratteristiche di neutralità ed idrofilicità. Queste funzionalizzazioni scoraggiano l'interazione della particella con le proteine responsabili della risposta immunitaria. Una strategia alternativa potrebbe prevedere invece la selezione di una singola proteina dall'ambiente biologico, che si leghi alla particella e la renda capace di evadere la cattura da parte del sistema immunitario ma non l'*uptake* da parte del tessuto bersaglio.

Al di là dell'invisibilità al sistema immunitario, le altre caratteristiche che deve possedere un nanosistema per essere utilizzato per applicazioni biomediche sono la bassa tossicità e la capacità di riuscire a raggiungere il tessuto bersaglio (*target*). Per soddisfare l'ultimo requisito, nel caso di patologie tumorali che creano masse solide, si sfruttano due strategie di direccionamento:

1. *Targeting Attivo* realizzato funzionalizzando la superficie con agenti direzionanti per riuscire ad ottenere un controllo sul percorso e la distribuzione del *carrier* all'interno del corpo.

Tali sistemi permettono al *carrier* di essere riconosciuto e intercettato solo dal tessuto tumorale. In questo caso il direccionamento è dovuto all'interazione di un ligando, un anticorpo o un'aptamero specifico con recettori sovraespressi nelle cellule di un particolare tessuto.

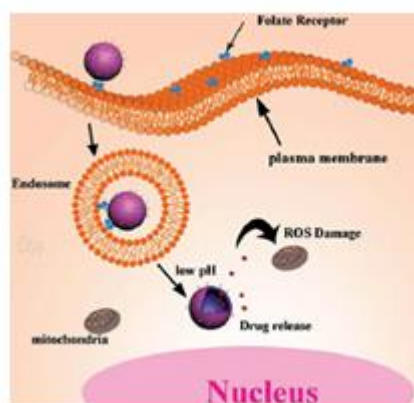


Figura 1: Schema di funzionamento del targeting attivo

2. *Targeting Passivo* sfrutta l'accumulo di un *carrier* in un tumore solido grazie al cosiddetto "effetto EPR" (*Enhanced Permeability and Retention*), senza la necessità di aggiungere alle particelle altri componenti che aumentino la specificità verso le cellule tumorali.

L'effetto EPR sfrutta le anomalie strutturali presenti nel tumore. Lo sviluppo della massa tumorale è così veloce da non consentire una contemporanea ed efficace vascolarizzazione del tessuto. I vasi sanguigni hanno quindi una struttura anomala, con un endotelio che presenta fenestrazioni che permettono l'extravasazione di nanoparticelle di dimensioni fino a 200 nm. Inoltre il tessuto tumorale è caratterizzato anche dalla scarsa presenza di vasi linfatici,

per questo motivo le nanoparticelle vengono ritenute all'interno della massa tumorale per periodi prolungati.

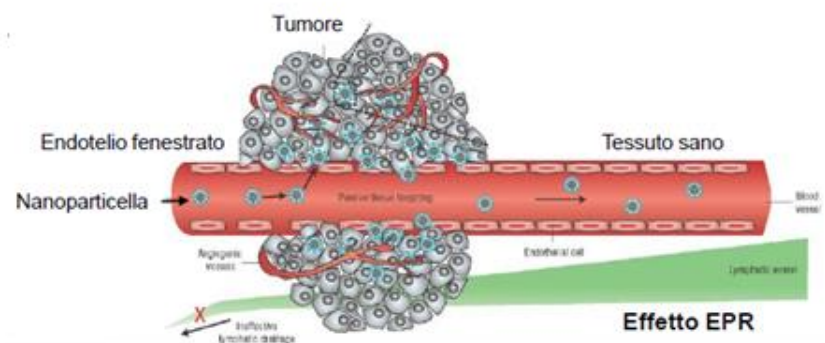


Figura 2: Schema di funzionamento dell'effetto EPR

Le strategie di *targeting* e le capacità di carico dei nanosistemi permettono quindi di concentrare il farmaco solo dove necessario, potenziando la sua efficacia terapeutica e limitandone la presenza nell'intero organismo, con conseguente riduzione degli effetti collaterali.

I sistemi *drug delivery* più comunemente usati sono sistemi colloidali come micelle polimeriche, microemulsioni, liposomi o nanoparticelle organiche e inorganiche. In questa tesi è stato considerato il sistema costituito da nanoparticelle di silice.

1.2 Nanoparticelle di silice

Il componente fondamentale per la costruzione delle nanoparticelle studiate è il silicio. La sua reattività chimica è analogo al carbonio con alcune peculiari differenze: infatti ha dimensioni più elevate, in quanto possiede elettroni negli orbitali 3d è meno elettronegativo ed è più polarizzabile del carbonio. Difatti i composti di silicio sono molto più soggetti ad attacco nucleofilo.

Gli ossidi di silicio, con formula SiO_2 , non possiedono doppi legami (come nel caso della CO_2) quindi non formano molecole discrete, ma creano materiali polimerici con caratteristiche isolanti.

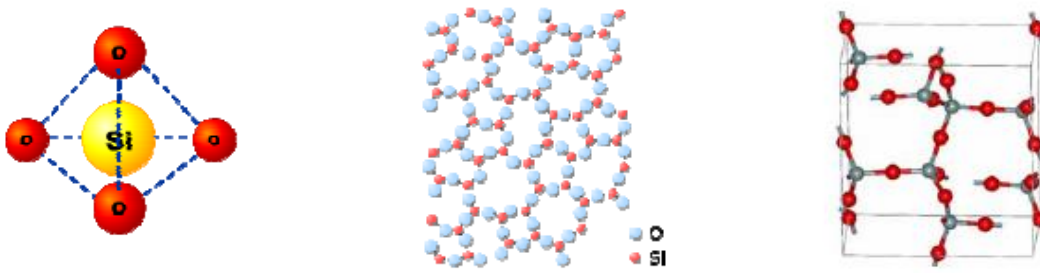


Figura 1: A sinistra si mostra la struttura tetraedrica della silice; la figura centrale illustra la disposizione amorfa del silano; l'immagine a destra raffigura la disposizione ordinata del silicio

Se le unità tetraedriche si dispongono in modo disordinato (amorfo) si costituisce il vetro o silice (figura centrale). Mentre se le unità si dispongono in modo ordinato si ottengono il quarzo e altri materiali cristallini (figura a destra).

La composizione di interesse per la creazione delle nanoparticelle è la struttura disordinata che porta alla formazione della silice.

La formazione di tali nanoparticelle avviene normalmente per polimerizzazione base catalizzata di monomeri silanologici, quali l'ortosilicato o i tetraalcossisilani.

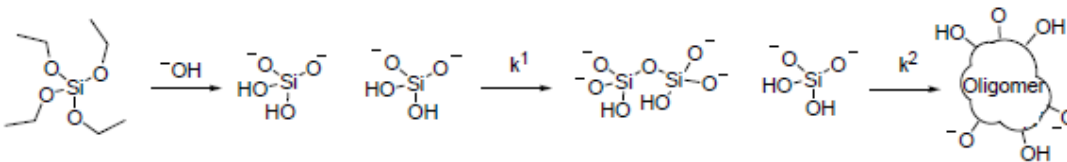


Figura 2: Schema della reazione di formazione di nanoparticelle di silice

In condizioni di catalisi basica lo stadio di crescita prevale rispetto allo stadio di nucleazione. Perciò si vengono a formare molte nanoparticelle di piccole dimensioni. Gli oligomeri non sono stabili e tendono a condensare formando particelle di dimensione più elevate.

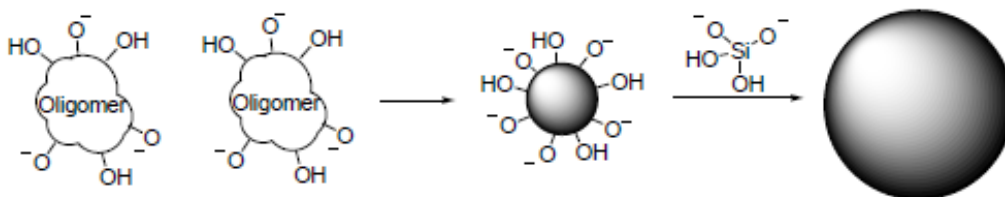


Figura 3: Schema rappresentativo dello stadio di condensazione degli oligomeri e di successiva crescita per condensazione di monomeri

La condensazione degli oligomeri si ferma quando la carica superficiale è sufficiente a garantire la stabilità colloidale, a questo punto la crescita delle particelle continua per condensazione di singoli monomeri sulla superficie delle particelle.

Le dimensioni finali sono controllate essenzialmente dalla quantità di catalizzatore (ammoniaca): aumentando la quantità di ammoniaca si ottengono particelle di dimensioni più elevate. Questo è dovuto al fatto che la forza ionica del mezzo, determinata dalla quantità di catalizzatore, definisce la stabilità colloidale.

Si studia l'utilizzo della silice per scopi biomedici in quanto essa presenta caratteristiche importanti, le più rilevanti delle quali sono: rigidità strutturale, relativa inerzia chimica e stabilità strutturale a variazioni dell'ambiente, che non comporta trasformazioni di porosità e di rigonfiamento.

Tali proprietà fanno sì che le nanoparticelle abbiano una struttura in cui la matrice silicea conferisce rigidità creando un sistema strutturalmente ben definito, mentre l'elevata porosità può ospitare un numero elevato di sostanze diverse. Infatti, a differenza di altri materiali, le particelle di silice non possiedono particolari proprietà chimico-fisiche dovute alla loro nanodimensione se non un rapporto area superficie molto elevato.

A seconda dell'utilizzo finale e delle modalità di sintesi, le nanoparticelle di silice possiedono quattro compartimenti che possono essere funzionalizzati in modo diverso. La superficie e le pareti dei pori possono essere funzionalizzate con derivati organosilanici (funzionalizzazione covalente); mentre nei pori ed anche nella matrice silicea stessa possono essere intrappolate molecole organiche (per intrappolamento sterico).

Il protocollo di sintesi utilizzato in questo lavoro di tesi prevede la polimerizzazione base-catalizzata del viniltrietossisilano in microemulsioni stabilizzate dal tensioattivo Brij® 35. L'utilizzo della microemulsione consente di preorganizzare topologicamente i componenti della nanoparticella a seconda della loro lipofilità. In questo modo, derivati organosilanici con caratteristiche anfifiliche vanno a posizionarsi all'interfaccia con il solvente acquoso: di conseguenza, costituiscono lo strato di funzionalizzazione superficiale della nanoparticella, mentre derivati lipofili vanno a includersi nella matrice silicea (covalentemente o stericamente) costituendo il "carico attivo" della particella. Modificando quindi le caratteristiche dei precursori

è perciò possibile modificare, almeno parzialmente, le proprietà delle particelle stesse.

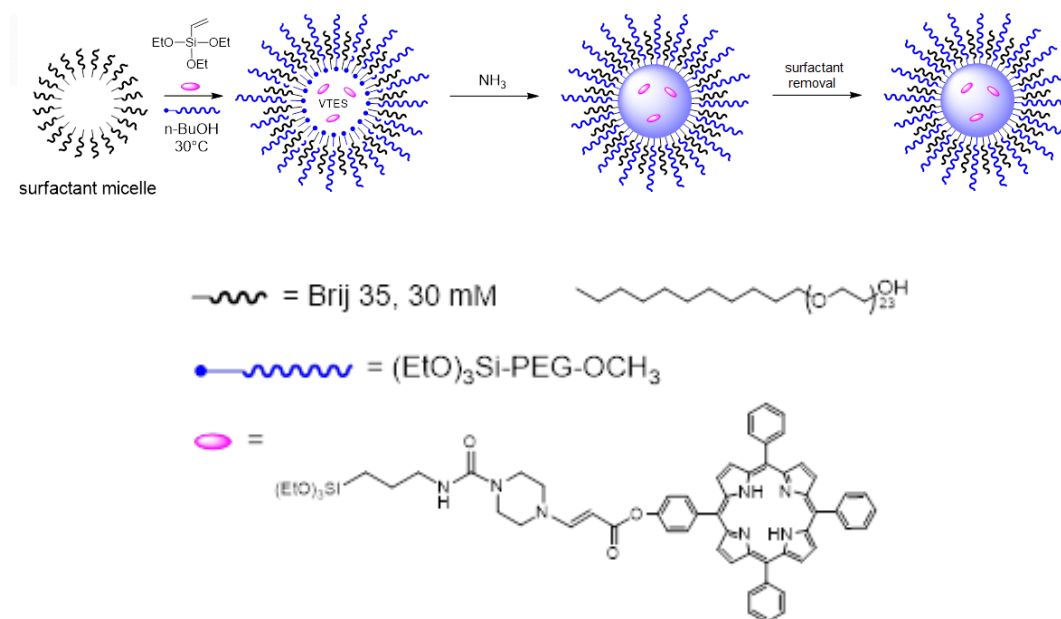


Figura 4: Schema di sintesi delle nanoparticelle ORMOSIL PEGilate

Grazie a questa procedura sintetica è possibile controllare il diametro delle nanoparticelle preparate in un intervallo tra 10 e 200 nm.

Quando vengono iniettate in un fluido biologico, le nanoparticelle di silice sono rapidamente fagocitate dal sistema immunitario a causa della loro tendenza ad aggregare e ad adsorbire proteine. I gruppi silanici presenti sulla superficie, largamente deprotonati a pH fisiologico, conferiscono alla nanoparticella la stabilità colloidale dovuta alla repulsione elettrostatica tra le cariche negative. Tuttavia la dispersione in solventi con alta forza ionica, come i fluidi biologici, attenua la repulsione elettrostatica e causa l'aggregazione e la precipitazione delle nanoparticelle. D'altro canto le proteine adsorbite possono attivare il riconoscimento e l'eliminazione da parte delle cellule del sistema immunitario. A causa di questi fattori le nanoparticelle vengono rapidamente eliminate dalla circolazione sanguigna, senza avere il tempo necessario per raggiungere il *target*. Per questo motivo si ritiene necessario dotare il nanovettore di un *coating* che aumenti la stabilità delle particelle in ambiente biologico. Il protocollo di sintesi descritto consente infatti di ricoprire le

nanoparticelle con un denso strato di PEG e altri polimeri biocompatibili, che conferiscono alle nanoparticelle stabilità in ambiente biologico.

1.3 Terapia fotodinamica (PDT)

La silice rappresenta una matrice ideale per l'inclusione di fotosensibilizzatori, grazie alla sua trasparenza alla luce e relativa inerzia rispetto ai processi fotofisici, oltre alla elevata porosità che rende le nanoparticelle permeabili all'ossigeno.

Per queste caratteristiche le nanoparticelle di silice possono essere utilizzate per la terapia fotodinamica (PDT *Photodynamic therapy*).

La PDT è un approccio terapeutico che consiste nell'utilizzo di radiazioni luminose per il trattamento di malattie di vario genere. Attualmente viene utilizzata per il trattamento dermatologico della psoriasi e di lesioni tumorali superficiali, ed è approvato in particolare per i tumori della testa e del collo.

La terapia prevede quattro fasi distinte di trattamento: somministrazione del farmaco, accumulo nel tumore, attivazione del fotosensibilizzante con la generazione delle specie citotossiche e morte cellulare.

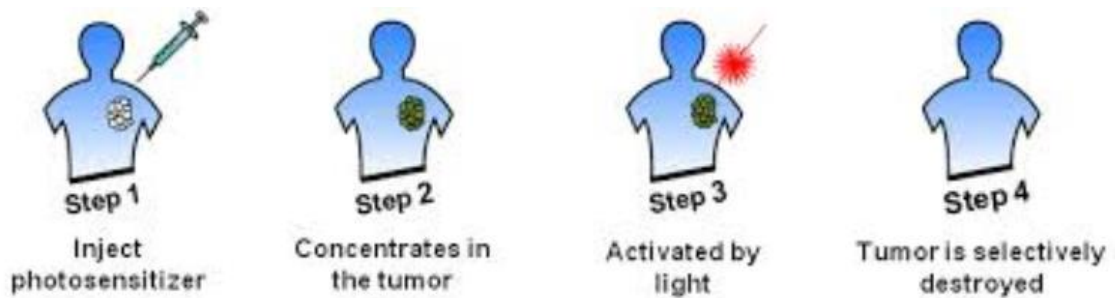


Figura 1: Fasi del trattamento PDT

Il meccanismo prevede la simultanea presenza dei tre componenti chiave: una sostanza fotosensibilizzante, la luce e l'ossigeno molecolare.

Il fotosensibilizzante somministrato si accumula preferenzialmente solo nel sito malato. In seguito si procede con l'irradiazione mirata in grado di interagire con il fotosensibilizzante.

Il fotone di energia viene assorbito dal fotosensibilizzante provocando la migrazione di un elettrone da un orbitale di legame o di non-legame ad uno di anti-legame a più

alta energia. Questa transizione elettronica porta il fotosensibilizzatore dallo stato fondamentale di singoletto S_0 a quello di singoletto eccitato S_1 .

La dispersione dell'energia ricevuta può seguire diversi meccanismi:

- l'emissione di fluorescenza: attraverso il rilascio del fotone assorbito;
- conversione interna: la dissipazione dell'energia avviene attraverso un processo non radioattivo fino ad arrivare al livello vibrazionale più basso dello stato elettronico eccitato. Successivamente la molecola può emettere un fotone e ritornare allo stato elettronico fondamentale (processo di fluorescenza), oppure l'emissione radioattiva può avvenire attraverso un passaggio dallo stato eccitato di singoletto S_1 allo stato eccitato di tripletto T_1 a seguito del meccanismo di *intersystem crossing* (processo di fosforescenza);
- processi non radioattivi di conversione in altre forme energetiche, come in energia termica, attraverso processi collisionali o di *quenching*;
- trasferimento intermolecolare dell'eccitazione elettronica: il sensibilizzante nello stato di tripletto T_1 , che è caratterizzato da tempi di vita relativamente lunghi, può dissipare l'energia trasferendola ad una molecola che si trova in uno stato fondamentale di tripletto e portandola in uno stato di tripletto eccitato.

Quest'ultimo processo è quello fondamentale per la PDT in quanto la molecola che subisce il trasferimento di energia può essere l'ossigeno molecolare che si trasforma in ossigeno di singoletto.

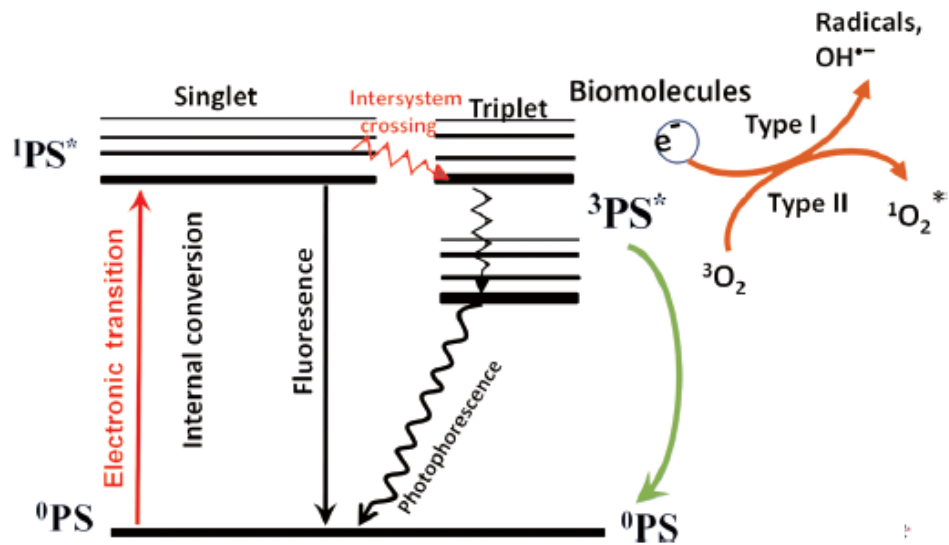


Figura 2: Schema dei meccanismi di assorbimento e dispersione dell'energia luminosa da parte di un fotosensibilizzatore

Scendendo in dettaglio, esistono due tipologie di meccanismi con cui la luce, in presenza di un fotosensibilizzante e di ossigeno, può promuovere reazioni chimiche in substrati organici (rappresentate figura 2).

Meccanismo di tipo I: trasferimento di elettroni

Secondo tale meccanismo il fotosensibilizzante nel suo stato eccitato genera una specie radicalica per trasferimento elettronico al substrato organico (lipidi insaturi, amminoacidi aromatici). La specie radicalica reagisce con l'ossigeno molecolare nel suo stato fondamentale portando alla formazione di intermedi molto reattivi e forti ossidanti, detti "specie reattive all'ossigeno" (ROS).

Meccanismo di tipo II: trasferimento di energia

In questo meccanismo l'energia dell'eccitazione elettronica del sensibilizzante viene trasferita, come già accennato, allo stato di tripletto fondamentale dell'ossigeno, per generare l'ossigeno di singoletto e riportare il sensibilizzante al suo stato fondamentale.

I due tipi di reazione spesso contribuiscono simultaneamente al trattamento contro il cancro e la prevalenza dell'uno rispetto all'altro dipende dal tipo di fotosensibilizzante utilizzato.

Le nanoparticelle presentano le opportune caratteristiche per essere utilizzate come vettori per il *drug delivery* in PDT aggirando i problemi legati alla solubilità del fotosensibilizzante ed aumentandone la selettività di accumulo. Inoltre è importante notare come non sia necessario prevedere meccanismi di rilascio del fotosensibilizzatore dalla nanoparticella dal momento che essa è trasparente alla luce e permeabile all'ossigeno.

CAPITOLO 2
OBIETTIVO della TESI

Il mio lavoro di tesi si proponeva di approfondire alcune tematiche collegate allo sviluppo di nanovettori di silice (SiO_2) per potenziali applicazioni biomediche. In particolare, come già accennato, la trasparenza alla luce e l'inerzia chimica rispetto a reazioni fotochimiche di queste particelle, permettono di includere nella matrice dei fotosensibilizzatori che possono essere sfruttati per la terapia PDT (*Photo Dynamic Therapy*). Nonostante alcuni tentativi, svolti anche nel gruppo di ricerca in cui ho svolto la mia tesi di laurea, l'utilizzo di nanoparticelle di silice ed altri materiali come vettori di foto sensibilizzatori per la PDT non ha ancora portato a vantaggi rilevanti. Come in altri settori della nano medicina, diventa sempre più evidente che in comportamento "passivo" delle nanoparticelle, che si limitano a trasportare il farmaco sfuggendo al sistema immunitario, non è sufficiente ad ottenere vantaggi terapeutici rilevanti.

Il contributo che mi proponevo di dare a questo settore era lo sviluppo di strategie di tipo attivo per un comportamento "intelligente", in particolare individuando metodi volti a consentire di funzionalizzare le nanoparticelle con molecole di diverse dimensioni in grado di migliorare le proprietà di *targeting* attivo.

Per raggiungere questo obiettivo ho cercato da un lato di individuare strategie che consentissero di funzionalizzare le nanoparticelle con piccole molecole o polimeri tramite legami covalenti eventualmente fotoattivati. Dall'altro ho esplorato alcune strategie che potessero portare all'assorbimento selettivo sulla superficie del *carrier* di polimeri o proteine sfruttando interazioni deboli.

Il punto di partenza era rappresentato dal protocollo di sintesi one-pot di nanoparticelle ORMOSIL (ORganically Modified SILica nanoparticles) messo a punto nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi.

Una prima serie di esperimenti avevano lo scopo di verificare la possibilità di modulare l'interazione delle particelle con le proteine del siero controllando la carica superficiale delle stesse. L'idea era quella di iniziare a determinare delle "regole di assorbimento" che consentissero di correlare l'identità chimica della superficie delle particelle alla natura delle proteine legate. In effetti, esperimenti preliminari hanno consentito di verificare come particelle di silice del diametro di 20 nm, seppur dotate di carica superficiale negativa, legano con moderata affinità l'albumina (Human Serum Albumin HSA), che pure possiede una carica netta negativa. Ho quindi deciso di sintetizzare una piccola libreria di derivati organosilano aventi carica diversa.

Questi derivati, aventi caratteristiche anfifiliche, avrebbero dovuto formare un monostrato di ricoprimento delle particelle preparate con il protocollo descritto nel capitolo introduttivo.

Le attività svolte hanno permesso di mettere a punto un efficace metodo di sintesi per queste molecole basato sulla reazione di fotoaddizione tiolo-alchene, ma i derivati realizzati si sono rilevati inadatti alla funzionalizzazione superficiale delle particelle.

Il secondo approccio investigato prevedeva la preparazione di nanoparticelle ORMOSIL ricoperte con un polimero poliossietilenglicole (PEG) co-funzionalizzate con un gruppo funzionale attivabile dall'ossigeno di singoletto, il furano.

Questo tipo di particelle avrebbe potuto essere utilizzato sia per reazioni di coniugazione fotopromossa con opportuni gruppi di *targeting* o altre specie attive sia per la cattura fotocontrollata di biomolecole in campioni biologici o addirittura in vivo. Il furano può inoltre fungere esso stesso da gruppo funzionale reattivo per reazioni di coniugazione biortogonale nella reazione di Diels-Alder.

Gli studi effettuati sono stati volti a caratterizzare le nanoparticelle sintetizzate, in particolare a verificare la presenza del derivato del furano nel monostrato di ricoprimento, e a studiare l'efficacia delle reazioni di coniugazione fotoattivata e di Diels-Alder.

I risultati preliminari ottenuti sembrano confermare l'attività prevista delle nanoparticelle ed in particolare la possibilità di modulare la reattività del monostrato di ricoprimento delle particelle tramite l'esposizione ad ossigeno di singoletto prodotto da opportuni fotosensibilizzatori.

Come attività supplementare mi sono dedicata ad esplorare le possibilità di migliorare il protocollo di sintesi delle nanoparticelle ORMOSIL da me utilizzato. Uno dei punti deboli è la necessità di sintetizzare i derivati PEG-trialcossisilano utilizzati per il ricoprimento delle particelle. Tali derivati comportano costi di sintesi piuttosto elevati e problemi di immagazzinamento. Infatti l'elevata igroscopicità del PEG comporta l'esposizione dei residui trialcossisilano a rilevanti quantità di acqua con conseguente degradazione degli stessi (idrolisi).

Mi sono quindi proposta di valutare la sostituzione dei derivati PEG-trialcossisilano ma anche del tensioattivo Brij® 35 con il tensioattivo Pluronic® F127.

Tale tensioattivo è non-tossico ed approvato dall'FDA per l'uso parenterale e questo consentirebbe di ridurre la potenziale tossicità delle particelle.

CAPITOLO 3

RISULTATI e DISCUSSIONE

3.1 Ottimizzazione della sintesi delle nanoparticelle di silice ORMOSIL

Nel primo capitolo della tesi è stato descritto il protocollo di sintesi one-pot di nanoparticelle ORMOSIL (Organically Modified Silica Nanoparticles) messo a punto nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi.

Partendo da questo protocollo mi sono proposta, come primo obiettivo della tesi, di ottimizzare la strategia di sintesi.

Il metodo di sintesi prestabilito utilizza come tensioattivo il Brij® 35, il quale, una volta terminata la sintesi, viene rimosso aggiungendo i beads assorbenti di polistirene che si legano alle catene alchiliche del Brij® 35. Nonostante il Brij® 35 sia un tensioattivo PEGilato, la PEGilazione delle nanoparticelle viene garantita aggiungendo alla miscela di reazione un secondo tensioattivo, il quale è un derivato del PEG funzionalizzato ad una estremità con un gruppo feniletiltrimetossisilano che copolimerizza con la matrice di silice legando covalentemente le molecole di PEG alla superficie delle particelle. Sfortunatamente questi derivati sono caratterizzati da costi elevati e da scarsa stabilità, dovuta alla elevata reattività del gruppo trimetossisilano che mal si concilia con l'igroscopicità del PEG.

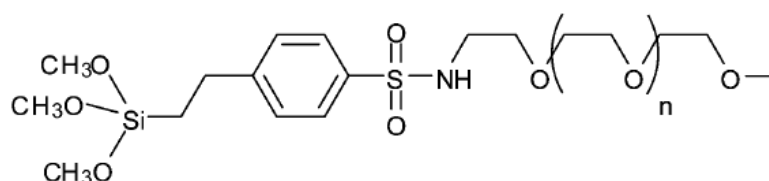


Figura 1: Struttura del PEG alcossisilano (n= 44)

L'utilizzo del derivato PEG silano potrebbe essere evitato se il tensioattivo utilizzato per stabilizzare la microemulsione rimanesse fisicamente intrappolato nella matrice silicea. Partendo da questa osservazione mi sono proposta di investigare la possibilità di sostituire il tensioattivo Brij® 35 con il Pluronic® F127.

Il Pluronic® F127 fa parte di un gruppo di tensioattivi che strutturalmente sono costituiti da un blocco centrale idrofobico di polipropilene ossido (PPO) legato a due blocchi idrofili di polietilene ossido (PEO).

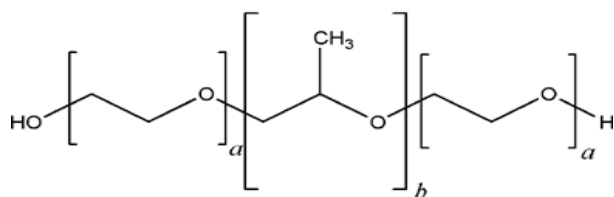


Figura 2: Struttura del tensioattivo Pluronic® F127

Le unità di polioossietilene rappresentano circa il 70% del peso molecolare e questo gli conferisce una elevata solubilità in acqua. La struttura a blocchi fa sì che la micellizzazione comporti un ripiegamento a V della molecola che consente l'esposizione delle porzioni idrofiliche al solvente e di quella idrofobica al nucleo dell'aggregato.

La struttura a V potrebbe consentire l'intrappolamento sterico del tensioattivo nella matrice della particelle e conseguentemente cancellare la necessità di utilizzare derivati organosilano per la funzionalizzazione delle particelle.

Le prove sperimentali effettuate sono state svolte seguendo il protocollo normalmente utilizzato e descritto a pagina 11 sostituendo il Brij® 35 con il tensioattivo Pluronic® F127.

In tabella 1 sono riportate le dimensioni delle nanoparticelle in funzione delle condizioni.

pH	[F127] M	Dimensioni NP
6.97	5	4.7 ± 0.4
3.08	5	12.9 ± 0.5
3.08	2	17.4 ± 0.4
3.08	1	20.3 ± 0.5

Tabella 1: Diametro idrodinamico di NP ORMOSIL sintetizzate con il tensioattivo F127 in funzione delle condizioni di reazione riportate.

Ho eseguito diverse prove, variando sia il pH della miscela di reazione (prima dell'aggiunta dell'ammoniaca) che la concentrazione di Pluronic® F127. Sfortunatamente, le prove effettuate hanno dimostrato come, se da un lato l'uso del F127 consente effettivamente di sostituire il Brij® 35 ottenendo nanoparticelle PEGilate, dall'altro non consente di preparare nanoparticelle di diametro superiore a 20 nm.

3.2 Funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle

Nella seconda parte del mio lavoro di tesi ho cercato di sviluppare strategie per funzionalizzare in modi diversi la superficie delle nanoparticelle.

Come prima cosa sono stati effettuati esperimenti con lo scopo di analizzare l'interazione tra una proteina del siero (l'albumina) con la nanoparticella controllando la carica superficiale della stessa, per riuscire a correlare la struttura chimica della superficie delle nanoparticelle alla natura delle proteine legate.

Ho quindi deciso di sintetizzare una piccola libreria di tre derivati organosilano aventi carica diversa. Gli esperimenti svolti hanno permesso di mettere a punto un efficace metodo di sintesi per queste molecole basata su reazioni fotochimiche.

Come ultima attività ho preparato delle nanoparticelle ORMOSIL ricoperte con un polimero poliossietilenglicole (PEG) co-funzionalizzate con un gruppo funzionale fotoattivabile, il furano. Tale gruppo reattivo viene legato sulla superficie delle nanoparticelle, e reagisce con l'ossigeno di singoletto trasformandosi in un composto in grado di creare un legame stabile con le ammine.

Inoltre il furano può essere utilizzato per reazioni biortogonali nella reazione di Diels-Alder.

Gli studi effettuati sono stati volti a verificare la presenza del furano nel monostrato e a studiare l'efficacia della reazione di coniugazione fotoattivata e di Diels-Alder.

3.2.1 Interazione con Albumina di siero umano (HSA)

L'albumina di siero umano (HSA, Human Serum Albumin) è la proteina plasmatica più abbondante dell'organismo umano, costituendo da sola circa il 55% del contenuto proteico totale plasmatico. È formata da una singola catena polipeptidica di 585 aminoacidi con un peso molecolare di 66.500 Dalton.

Le funzioni e le proprietà leganti dell'HSA sono molteplici, le più importanti sono:

- agisce come agente solubilizzante per lunghe catene di acidi grassi ed è pertanto essenziale per il metabolismo dei lipidi;
- si lega a un grande numero di farmaci terapeutici come ad esempio penicilline, sulfamidici;
- funge da mezzo di trasporto per ioni metallici nel sangue;

- è la principale proteina responsabile della regolazione della pressione osmotica.

La struttura tridimensionale di HSA è stata chiarita dalla analisi a raggi X ed è illustrata in figura 1. La forma tridimensionale a V della HSA può essere descritta come un ellissoide costituito da tre domini α -elicoidali (I blu, II verde, III rosso), e ogni dominio contiene due sottodomini (A e B), denominata IA (azzurro), IB (blu), IIA (verde chiaro), IIB (verde scuro), IIIA (rosa) e IIIB (rosso).

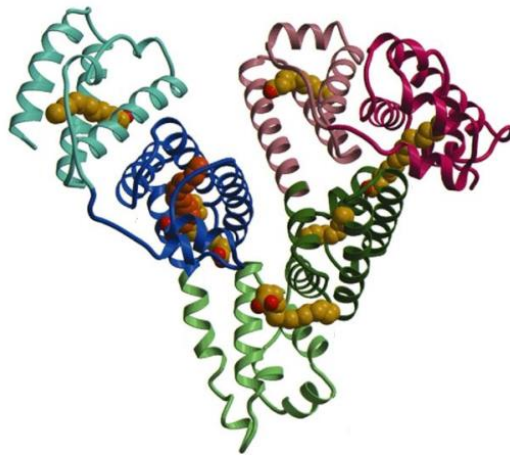


Figura 1: Struttura tridimensionale dell'HSA

L'HSA è una proteina acida, molto solubile ed estremamente robusta: è stabile nell'intervallo di pH 4-9, solubile in etanolo al 40%, e può essere riscaldata a 60 ° C per 10 h senza effetti deleteri. Queste proprietà, nonché la sua biodegradabilità, la sua mancanza di tossicità e immunogenicità la rendono una candidata ideale per *Drug Delivery*.³

Per determinare l'efficienza dell'interazione tra nanoparticella e la proteina ho utilizzato misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS) che permettono di ottenere una stima del raggio idrodinamico medio. Generalmente il processo di binding viene descritto dall'equazione di Hill, che nella forma più generale è così espressa:

$$\theta = \frac{[P]^n}{K'_D + [P]^n} = \frac{[P]^n}{(K_D)^n + [P]^n} = \frac{[P]^n}{1 + \left(\frac{K_D}{[P]}\right)^n}$$

Equazione 1: Equazione generale di Hill

dove θ è la frazione di siti superficiali occupati della NP, $[P]$ è la concentrazione di proteina libera, K_D' è la costante termodinamica di dissociazione, K_D è il coefficiente di dissociazione che quantifica la forza dell'interazione NP-proteina (ed è la concentrazione di proteina che porta all'occupazione della metà siti di binding) mentre n è il coefficiente di Hill, che descrive il grado di cooperatività di associazione.

In letteratura sono presenti diversi articoli riguardanti l'associazione NP-proteina in cui si studiano le proprietà di associazione delle NP quando adsorbono le proteine.

In un studio riportato nella rivista Nature Nanotechnology (2009)⁴ riguardante nanoparticelle di FePt ricoperte di HSA, si dimostra la formazione di un singolo monostato di HSA su NP di FePt. Nell'articolo gli autori attribuiscono all'HSA una conformazione a prisma triangolare equilatero di lato di circa 8 nm e altezza approssimativamente di 3.4 nm.

I risultati ottenuti aggiungendo aliquote crescenti di HSA ad una soluzione di nanoparticelle di silice non PEGilate sono riportate in figura.

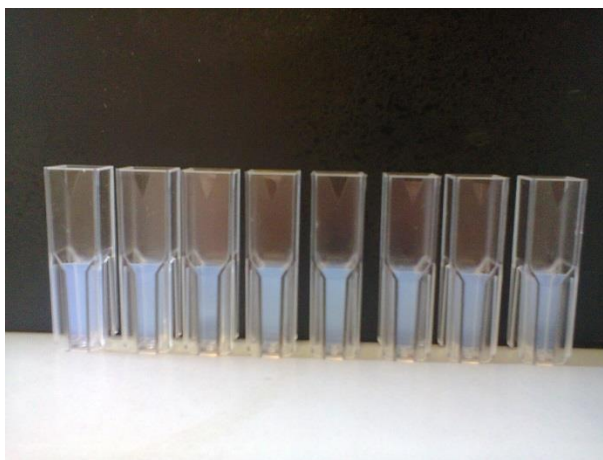


Figura 2: Soluzioni a concentrazione diversa di HSA

Utilizzando la seguente equazione è possibile interpolare i valori di raggio idrodinamico in funzione della concentrazione ricavando i parametri che descrivono il processo di binding.

$$R_H = R_0 \sqrt[3]{1 + \frac{c \cdot N_{max}}{1 + (K_D/[HSA])^n}}$$

Equazione 2: Equazione utilizzata per il fitting dei dati

R_H : raggio idrodinamico delle nanoparticelle ricoperte di albumina

R_o : raggio idrodinamico delle nanoparticelle non rivestite

c : è il rapporto tra i volumi delle nanoparticelle rivestite e non ricoperte

N_{max} : numero massimo di albumine legate alla nanoparticella

K_D : costante di dissociazione

$[HSA]$: concentrazione di albumina

n : indice di cooperatività

Tale equazione si ricava rielaborando la legge di Hill precedentemente descritta.

I passaggi matematici sono di seguito riportati:

- la frazione di siti superficiali occupati della NP viene espressa come rapporto tra N/N_{max}

$$N = N_{max} \frac{1}{1 + \left(\frac{K_D}{[HSA]}\right)^n}$$

- il raggio idrodinamico delle nanoparticelle ricoperte di albumina R_H può essere descritta utilizzando il raggio idrodinamico delle nanoparticelle non rivestite (R_o) e sommando ad esso il contributo dovuto alla presenza di HSA.

$$R_H = R_o + \Delta R = \sqrt[3]{\frac{3}{4}(V_o + NV_{HSA})} = R_H \sqrt[3]{1 + cN}$$

Con i dati di raggio idrodinamico medio delle nanoparticelle si costruisce un grafico che correla le dimensioni ottenute in funzione della concentrazione di albumina.

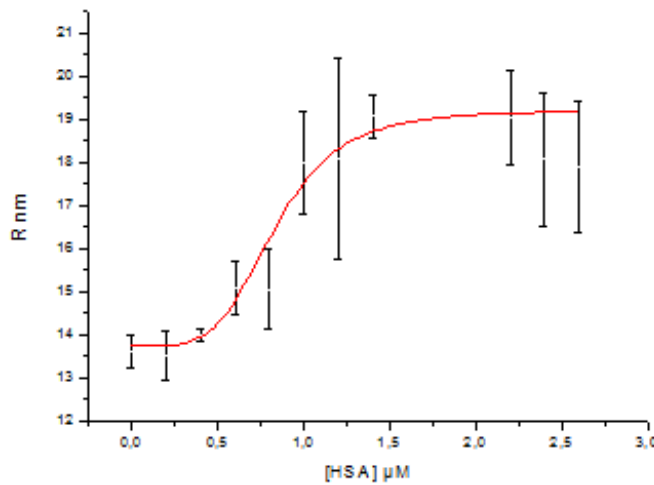


Figura 3: Raggio idrodinamico medio delle nanoparticelle in funzione della concentrazione di albumina ([NP]= 100 μg/mL, T= 25°C)

Si osserva un incremento di circa 5 nm del valore del raggio R_H della NP all'aumentare della concentrazione di HSA. Considerando la forma ad ellissoide allungata della HSA di dimensioni 14x4 nm e di raggio assiale di circa 3.5 nm⁵ si può supporre che uno spessore di circa 5 nm corrisponde a un monostrato.

Di seguito sono riportati i parametri ottenuti con il metodo di calcolo precedentemente descritto.

R_o	13.7±0.2 nm
c	$9 \cdot 10^{-3}$
N_{max}	1860.73
K_D	$0.9 \cdot 10^{-6} \pm 10^{-7} \mu M$
n	4 ± 1

I dati più rilevanti sono la costante di binding (K_D) e l'indice di cooperatività (n). Quest'ultimo, essendo superiore all'unità, indica la presenza di un processo di binding cooperativo. Perciò l'interazione tra la proteina e la NP incrementa l'affinità tra le due specie favorendo l'ulteriore associazione.

Mentre il valore della costante di *binding* rappresenta il coefficiente di dissociazione che quantifica la forza dell'interazione proteina-NP.

In genere, si tratta di un valore piuttosto basso che indica un'interazione relativamente debole, come ci si può aspettare dal momento che sia l'albumina che la particella sono oggetti carichi negativamente a pH fisiologico.

3.2.2 Sintesi di NP ORMOSIL funzionalizzate con una serie di organosilani con struttura omogenea ma carica diversa

Come abbiamo visto nel paragrafo precedente, è possibile utilizzare misure di DLS per valutare l'interazione tra nanoparticelle e proteine. D'altra parte anche una proteina carica negativamente come l'albumina è in grado di legarsi alla superficie negativa della particella di silice indicando che molti tipi di interazione sono in gioco. Partendo da questa osservazione mi sono proposta di sintetizzare una libreria chimica con diversa carica per verificare la possibilità di regolare l'interazione delle

nanoparticelle con le proteine, e capire meglio quale è la miglior interazione utilizzabile per scopi in nanomedicina.

Si è deciso di sintetizzare tre diversi derivati organosilani dotati di carica diversa, ma caratterizzati dalla massima omogeneità strutturale:

- carica positivamente: la carica è dovuta al gruppo ammonio quaternario presente al termine della catena;
- zwitterionica: presenta un gruppo ammonio quaternario che dista da un gruppo fosfato carico negativamente tramite due atomi di carbonio;
- carica negativamente: possiede un gruppo fosfato carico negativamente che simula l'aspetto della membrana biologica.

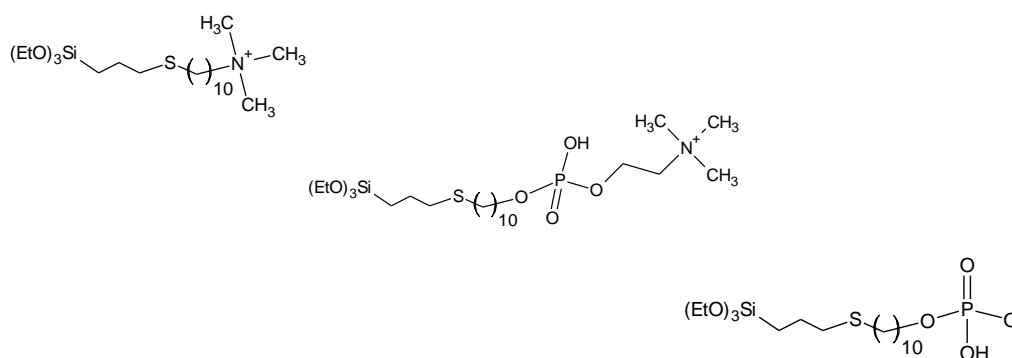


Figura 1: Strutture dei derivati organosilano: specie positiva, specie zwitterionica e specie negativa

Tali derivati si ottengono con facilità per reazione fotoaddizione tiolo-alchene promossa dal fotoiniziatore l'Irgacure[®] 651. Le rese sono elevate in quanto non prevede la formazione di sottoprodotti e perciò non necessita di purificazione.

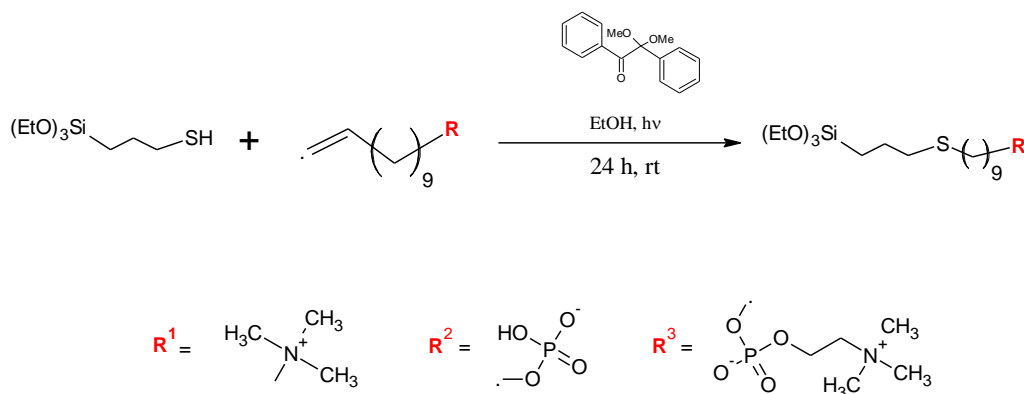


Figura 2: Schema generale di sintesi dei derivati silani a partire dai precursori

Questi derivati sono stati utilizzati per preparare nanoparticelle ORMOSIL utilizzando la procedura one-pot messa a punto nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi. Il protocollo è stato ovviamente modificato sostituendo il PEG-silano con i derivati sintetizzati. Sfortunatamente tutti i tentativi effettuati non hanno portato alla formazione di nanoparticelle con una forte tendenza all'aggregazione o prive dello strato di funzionalizzazione superficiale.

3.2.3 Sintesi e studio delle proprietà di NP ORMOSIL fotoconiugabili

L'ultimo metodo studiato aveva come obiettivo la messa a punto di una strategia di coniugazione fotoattivata di nanoparticelle ORMOSIL ricoperte di PEG.

Questo tipo di particelle possono essere facilmente preparate con il protocollo descritto in precedenza, che consente non solo la funzionalizzazione superficiale ma anche l'introduzione di fotosensibilizzatori. Tali molecole, in seguito all'eccitazione con radiazione luminosa, possono convertire l'ossigeno molecolare in ossigeno di singoletto, il quale a sua volta potrebbe reagire con un opportuno gruppo funzionale posizionato nel monostato di ricoprimento rendendolo reattivo.

Il gruppo reattivo da me scelto è il furano. E' infatti noto che questa molecola reagisce con l'ossigeno di singoletto per formare un derivato 2-ene-1,4-dione in grado di reagire con ammine alifatiche e aromatiche formando un legame stabile.

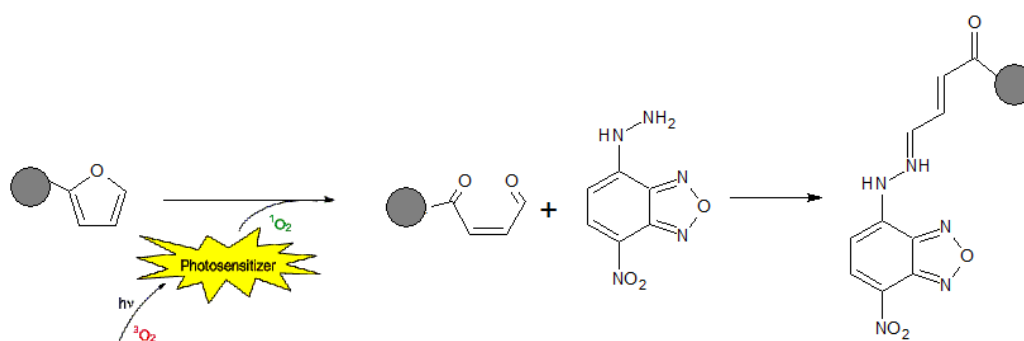


Figura 1: Schema di fotoattivazione dei derivati del furano e loro utilizzo come crosslinker reattivi. Il furano legato sulla superficie della nanoparticella reagisce con l'ossigeno di singoletto creando un composto reattivo il 2-ene-1,4-dione, il quale è in grado di creare un legame stabile con ammine.

Sulla base di queste considerazioni ho deciso di preparare delle nanoparticelle ORMOSIL del diametro di 20 nm dopate covalentemente con un derivato del

fotosensibilizzatore m-tetraidrossifenilclorina (m-THPC) e funzionalizzate in superficie con il PEG2000. Il 10% delle molecole di PEG costituenti il *coating* era a sua volta funzionalizzato con gruppi amminici terminali che potessero essere utilizzati come punti di ancoraggio per il furano.

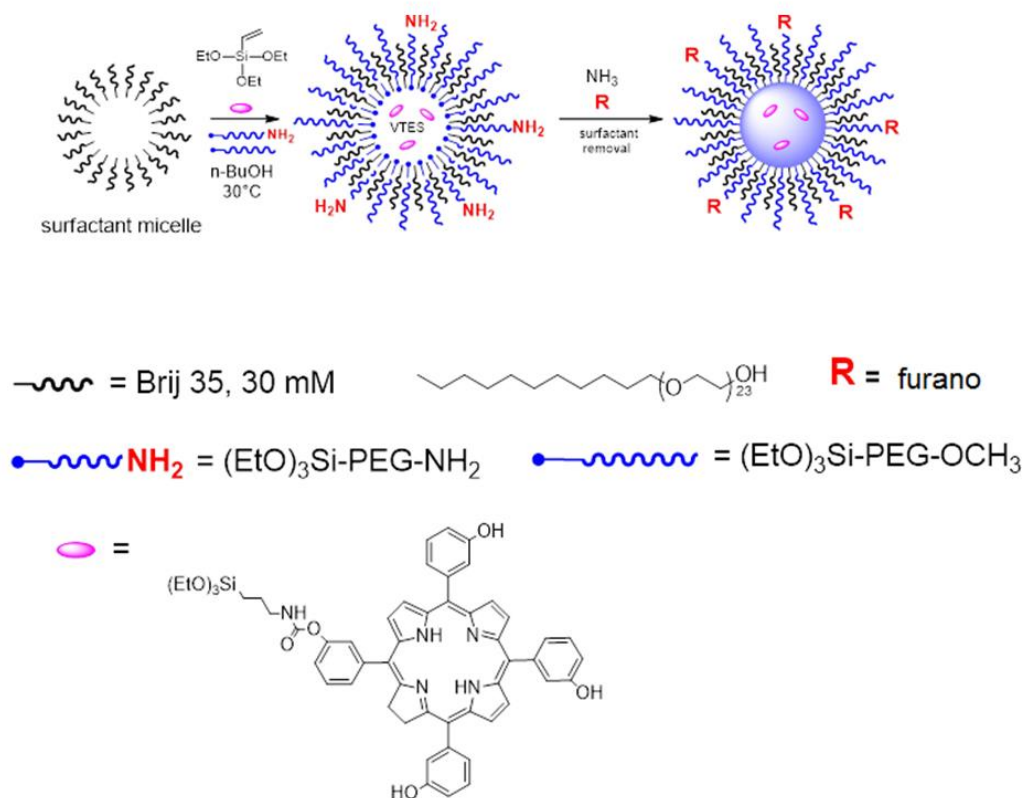


Figura 2: Schema di sintesi delle nanoparticelle funzionalizzate al 10% con PEG NH₂

Il derivato del furano, acido 2-furanpropionico, è stato a sua volta trasformato nell'estere attivo dell'*N*-idrossisuccinimide ed utilizzato per la funzionalizzazione dei gruppi amminici terminali inseriti nelle particelle.

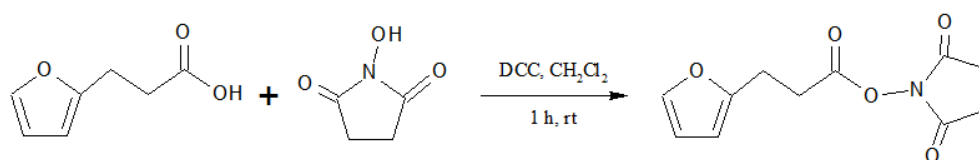


Figura 3: Schema sintesi dell'estere attivo dell'acido 2-furanpropionico

L'analisi delle nanoparticelle con la fluorescamina, che diviene fluorescente in seguito alla reazione con ammine primarie, consente di verificare indirettamente

l'efficacia della coniugazione. Infatti prima della reazione con l'estere attivo del furano le nanoparticelle rivelano la presenza di una discreta quantità di gruppi amminici, quantità che diminuisce fin quasi ad azzerarsi dopo la reazione.

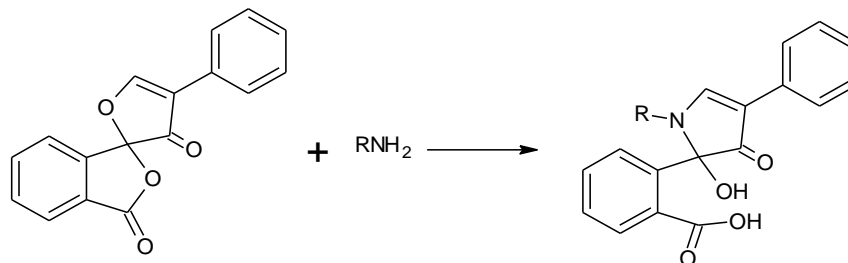


Figura 4: Schema di reazione tra fluorescamina e un ammina primaria con formazione di una molecola fluorescente.

Per verificare in modo diretto la presenza del furano legato alle NP e l'efficacia della reazione di foto attivazione si sono sviluppate diverse metodiche. I due metodi su cui ho maggiormente concentrato la mia attenzione prevedono di rilevare variazione spettroscopiche dovute ad un cambiamento chimico.

La prima strategia prevede il foto irraggiamento delle NP con luce visibile, in modo da attivare la produzione di ossigeno di singoletto da parte del m-THPC incluso nelle particelle. Il meccanismo precedentemente descritto dovrebbe trasformare il furano in un aldeide in grado di reagire con un derivato fluorescente dell'idrazina aggiunto in seguito, il 4-idrazino-7-nitrobenzofurazano (Figura 4) formando un addotto di tipo idrazone rilevabile con tecniche spettroscopiche.

Per assicurarsi della validità di tale metodo, sono state svolte delle reazioni di prova, utilizzando l'acetaldeide per simulare la presenza del gruppo aldeidico.

La reazione attesa è la seguente:

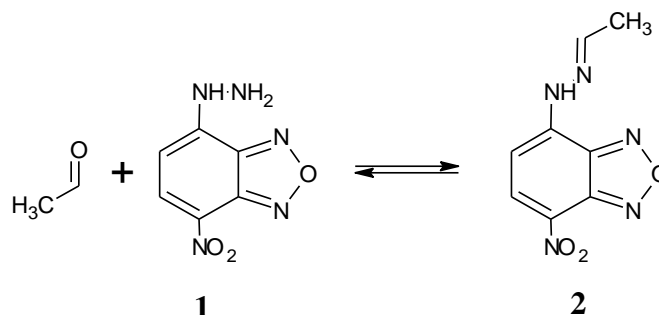


Figura 5: Schema della reazione tra acetaldeide e 4-idrazino-7-nitrobenzofurazano

Per ottimizzare le condizioni operative si è innanzitutto analizzato il tipo di solvente da utilizzare. I solventi presi in considerazione sono: soluzione tampone di PBS, metanolo, etanolo e cloroformio.

Sono stati registrati gli spettri di assorbimento UV-Vis e fluorescenza nei diversi solventi dei composti.

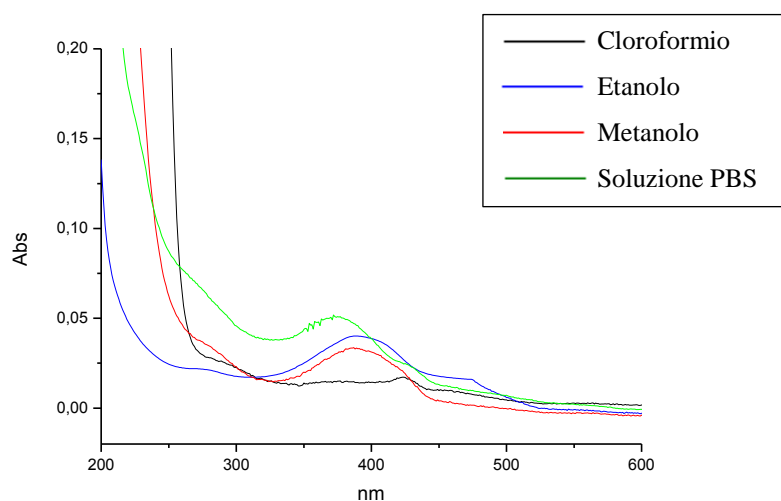


Figura 6: Spettri di assorbimento UV-Vis del composto 1 in diversi solventi ($[1] = 1\mu\text{M}$)

Come noto, negli spettri di assorbimento si registra uno shift del massimo di assorbimento passando dal solvente più polare al meno polare. Questo è dovuto alla formazione di uno stato eccitato a separazione di carica, sensibile quindi alla polarità del solvente.

In modo analogo, nello spettro di emissione si verifica uno smorzamento della fluorescenza (quenching) in solventi polari, come si può notare di seguito questo fenomeno si verifica in modo minore con il solvente cloroformio.

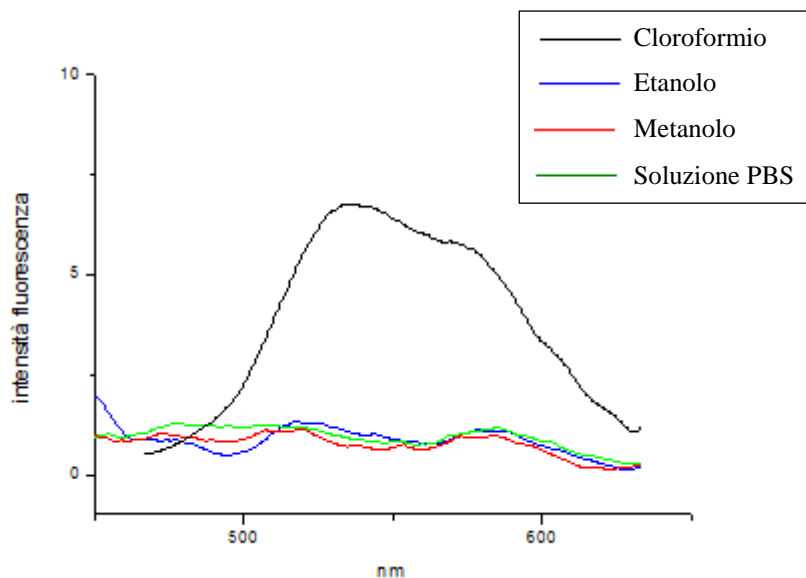


Figura 7: Spettri di emissione del composto 1 in diversi solventi
($\lambda_{ecc} = 380 \text{ nm}$, $[1] = 1 \mu\text{M}$)

Sono stati quindi registrati gli spettri in seguito all'aggiunta di acetaldeide.

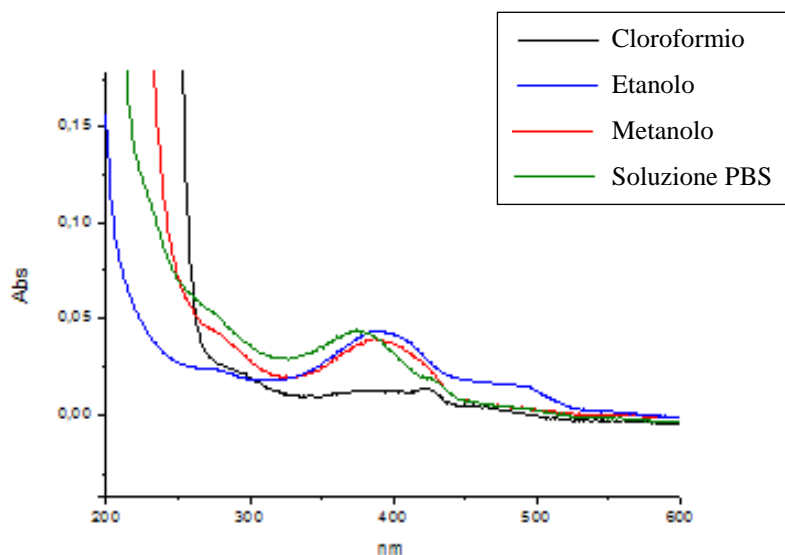


Figura 8: Spettri di assorbimento UV-Vis della miscela dei composti 1 e acetaldeide in diversi solventi ($[1] = 1 \mu\text{M}$, $[\text{CH}_3\text{CHO}] = 10 \mu\text{M}$)

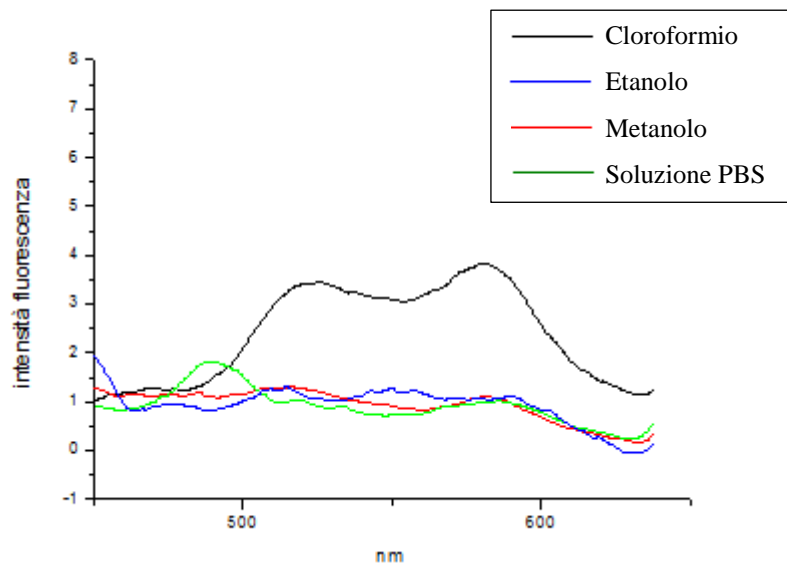


Figura 9: Spettro di emissione della miscela dei composti 1 e acetaldeide in diversi solventi
 ([1]= 1 μ M, [CH₃CHO]= 10 μ M)

Come si può notare non ci sono variazioni significative.

Ripetendo le misure in etanolo e lasciando la miscela a reagire per un giorno si osserva una variazione nello spettro di emissione, mentre l'assorbimento rimane invariato.

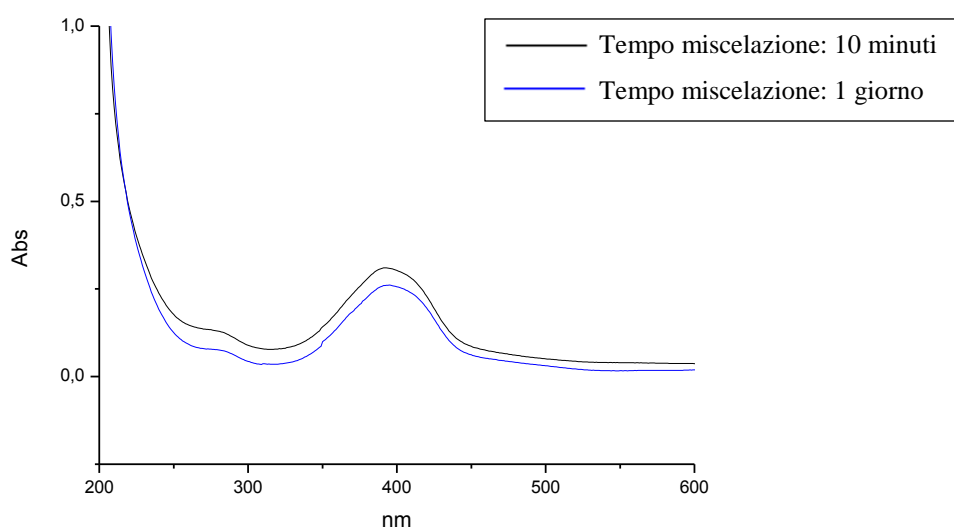


Figura 10: Spettri di assorbimento UV-Vis della miscela dei composti 1 e acetaldeide in etanolo dopo 10 minuti e un giorno dal mescolamento ([1]= 1 μ M, [CH₃CHO]= 10 μ M)

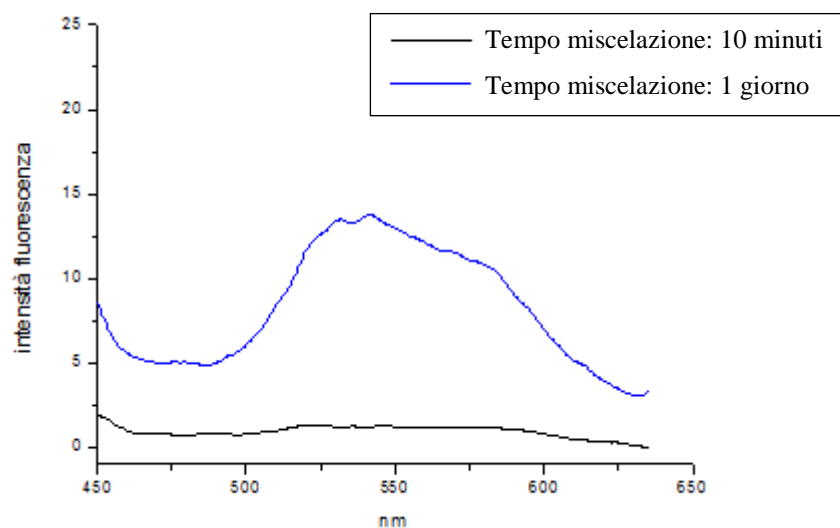


Figura 11: Spettri di emissione della miscela dei composti 1 e acetaldeide in etanolo dopo 10 minuti e un giorno dal mescolamento ($[1]= 1\mu\text{M}$, $[\text{CH}_3\text{CHO}]= 10\mu\text{M}$)

La reazione tra aldeide e idrazoni, seppur molto utilizzata, è quindi piuttosto lenta. In letteratura sono riportati alcuni metodi per velocizzarla che prevedono l'uso di un catalizzatore, l'anilina, oppure l'uso di ambienti acidi per la reazione.

Di seguito si riportano gli spettri relativi alla reazione effettuata in acido cloridrico 10^{-3} M.

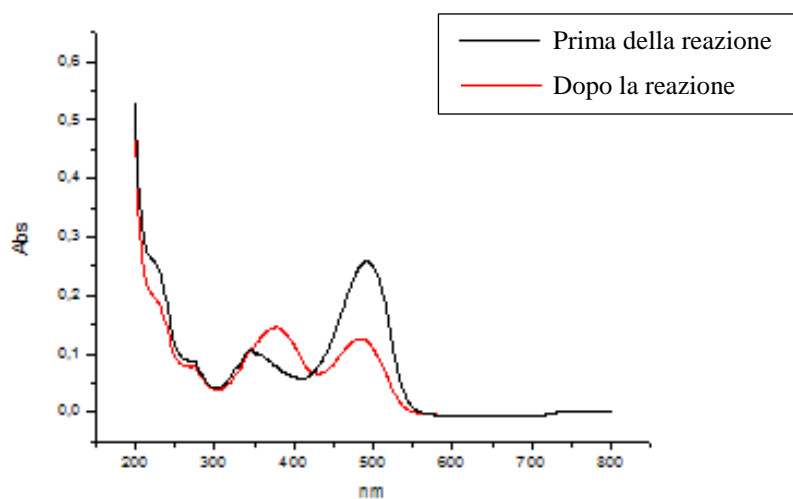


Figura 12: Spettri di assorbimento UV-Vis del composto 1 in HCl acquoso prima e dopo l'aggiunta di acetaldeide ($[1]= 1\mu\text{M}$, $[\text{CH}_3\text{CHO}]= 10\mu\text{M}$, $[\text{HCl}]= 10^{-3}$ M)

Il composto di partenza 1 presenta due bande di assorbimento rispettivamente a 343 e 490 nm. In seguito all'aggiunta dell'aldeide si verifica un abbassamento della banda a lunghezze d'onda maggiori e un leggero shift verso il rosso della banda a 343 nm.

Negli spettri in emissione, fissata la lunghezza d'onda di eccitazione a 343 nm compare una banda caratteristica a 400 nm che evidenzia anche delle transizioni vibrazionali. Portando la lunghezza d'onda di eccitazione a 490 nm si osserva uno spettro di emissione differente con una banda non strutturata centrata a 550 nm. Un tale comportamento non è comune e potrebbe indicare la presenza di due forme del composto 1, probabilmente due diversi stati di protonazione, caratterizzati da spettri di emissione diversi.

Dopo l'aggiunta di aldeide la banda a 400 nm scompare, mentre rimane quella a 550 nm.

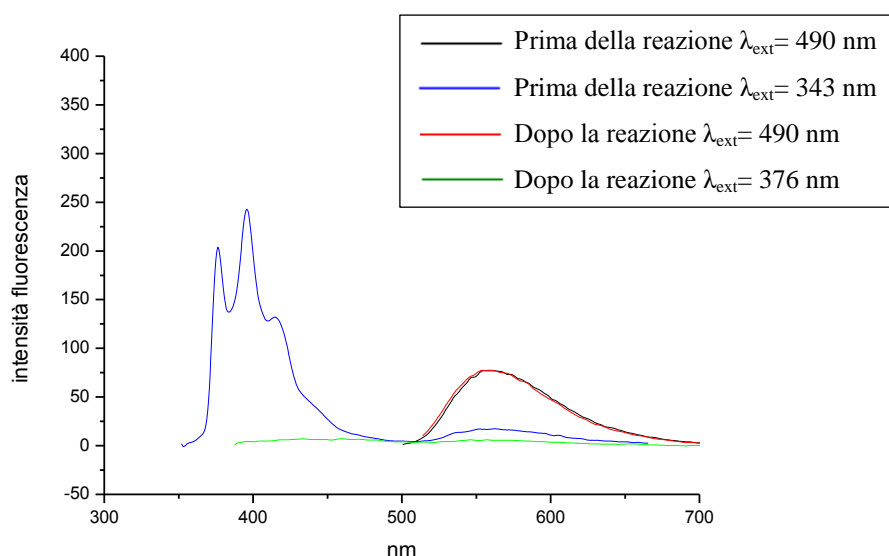


Figura 13: Spettri di emissione del composto 1 in HCl acquoso prima e dopo l'aggiunta di acetaldeide ($[1] = 1\mu\text{M}$, $[\text{CH}_3\text{CHO}] = 10\mu\text{M}$, $[\text{HCl}] = 10^{-3}\text{ M}$)

Di conseguenza i dati ottenuti indicano che il decorso della reazione tra 1 e derivati aldeidici può essere analizzato basandosi sulle variazioni dello spettro di assorbimento e sulla scomparsa della banda di emissione a 400 nm.

Il motivo della maggior velocità della reazione a pH acido è la catalisi acida dovuta alla protonazione dell'ossigeno carbonilico dell'aldeide, che rende più elettrofilo il carbonio carbonilico. Tuttavia si deve ricercare un compromesso tra questo effetto positivo e quello negativo dovuto alla protonazione del gruppo idrazone, che ne deprime la reattività nucleofila.

Per ottimizzare le condizioni della reazione sono stati registrati gli spettri del composto 1 variando il pH della soluzione.

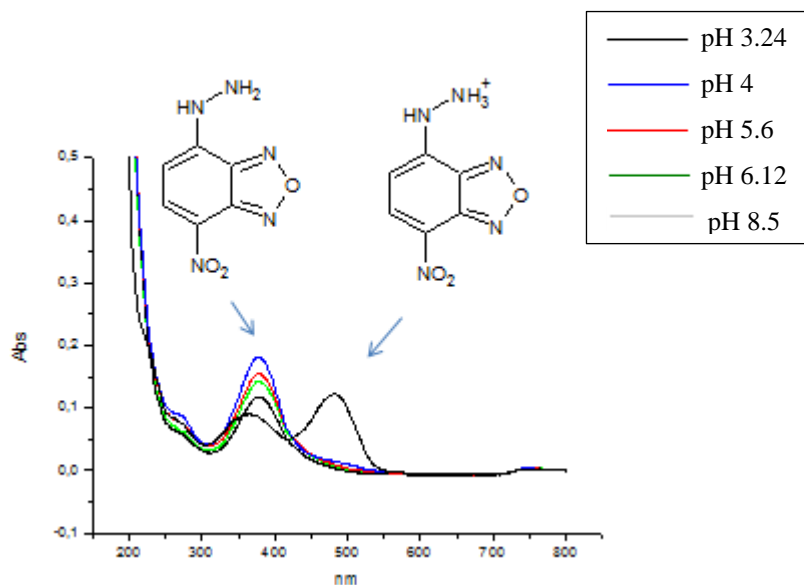


Figura 14: Spettri di assorbimento UV-Vis del composto 1 in acqua a diversi pH ($[1] = 1\mu\text{M}$)

Come si può notare dallo spettro di assorbimento, al di sopra del valore di pH 3.24 si osserva la completa scomparsa della banda a lunghezza d'onda 480 nm facendo così pensare che tale banda appartenga alla forma protonata.

Lo spettro di emissione, invece, rivela che anche la banda a 400 nm (eccitando a 324 nm) si osserva solo a pH 3.24 ed è quindi ascrivibile alla specie protonata. In effetti lo spostamento dell'emissione verso il rosso e la comparsa di bande vibrazionali (non visibili però in quest'ultimo spettro) è un comportamento che si osserva normalmente in seguito alla protonazione di un gruppo donatore in sistemi di tipo push-pull.

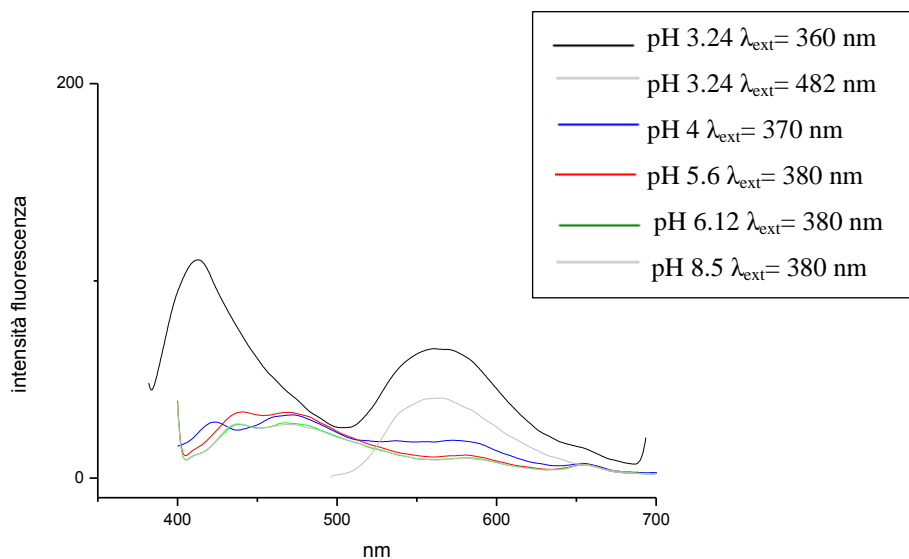


Figura 15: Spettri di emissione del composto in acqua a diversi pH ($[1] = 1\mu\text{M}$)

La stessa indagine è stata svolta per il prodotto della reazione tra 1 e acetaldeide ottenendo risultati simili. Le maggiori differenze si osservano a pH 3.24, dove nello spettro di assorbimento le bande a 360 e 490 nm hanno intensità simile (mentre nel caso del composto 1 prevale la banda a 490 nm), e in quello di emissione dove non compare la banda a 420 nm caratteristica del composto 1 protonato.

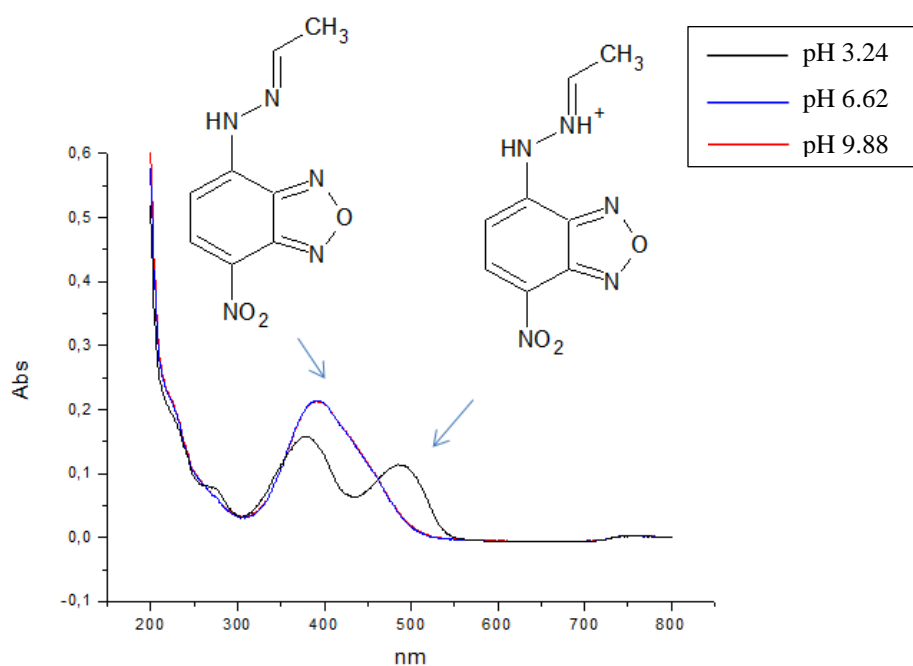


Figura 16: Spettri di assorbimento UV-Vis del composto 2 in acqua a diversi pH

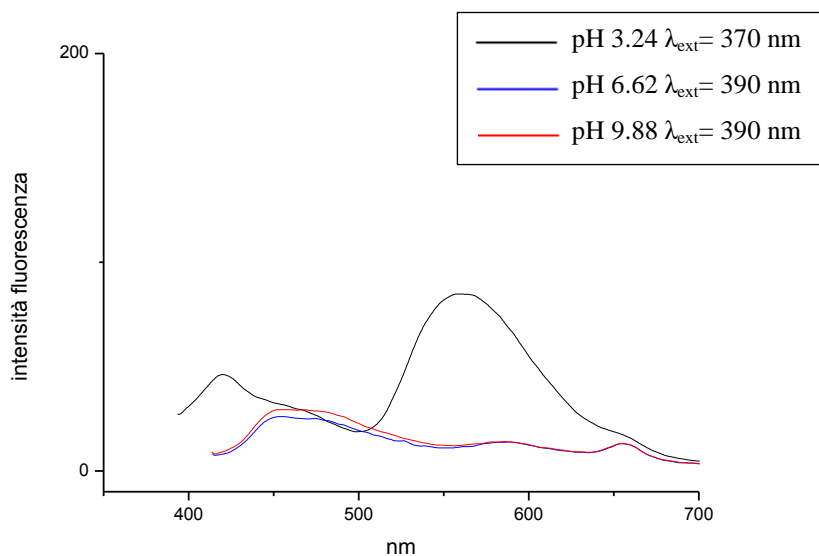


Figura 17: Spettri di emissione del composto 2 in acqua a diversi pH

Avendo chiarito le variazioni spettroscopiche della reazione di prova, mi sono dedicata ad investigare la reazione utilizzando questa volta le nanoparticelle funzionalizzate con il furano.

Le NP sono state diluite in una soluzione di acido cloridrico 10^{-3} M e sottoposte a foto irraggiamento per un'ora con una lampada a tungsteno da 500 W. A questo punto il composto 1 è stato aggiunto alla miscela e sono stati registrati gli spettri di assorbimento ed emissione.

Le analisi spettroscopiche sono di difficile interpretazione, in quanto le bande del fotosensibilizzante (nell'UV la banda di Soret a 420 nm, molto intensa, e le 4 Q-bands tra 450 e 650 nm, in emissione la doppia banda a 655 e 700 nm) nascondono in parte quelle del composto 1.

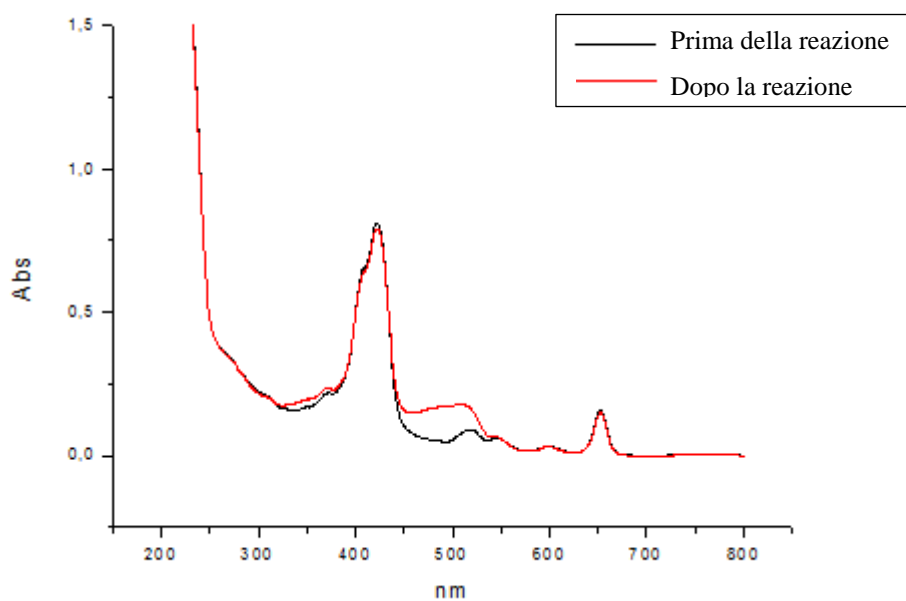


Figura 18: Spettri di assorbimento UV-Vis delle NP1 foto irraggiate, prima e dopo l'aggiunta di 1 ([1]= 5 μ M, [NP1]= 5 μ M, [HCl]= 10⁻³ M)

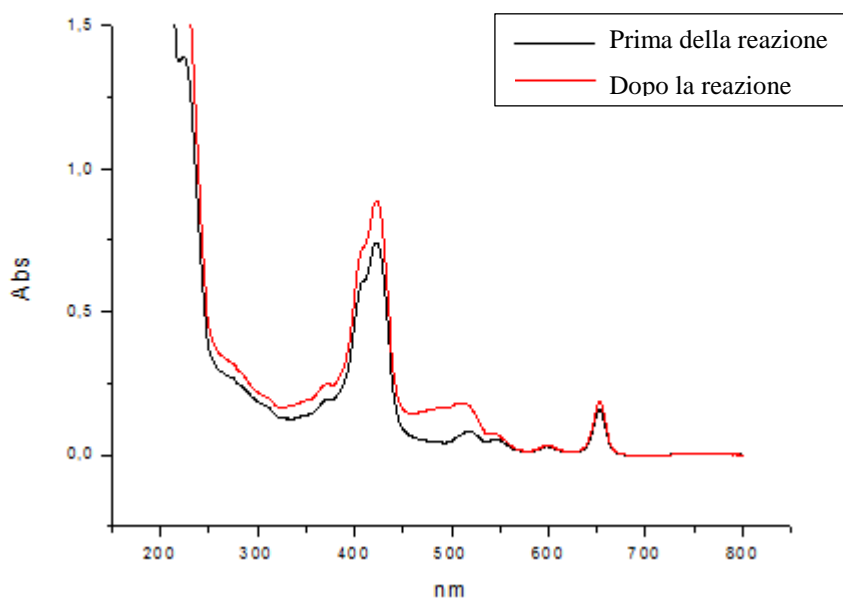


Figura 19: Spettri di assorbimento UV-Vis delle NP1 non foto irraggiate, prima e dopo l'aggiunta di 1 ([1]= 5 μ M, [NP1]= 5 μ M, [HCl]= 10⁻³ M)

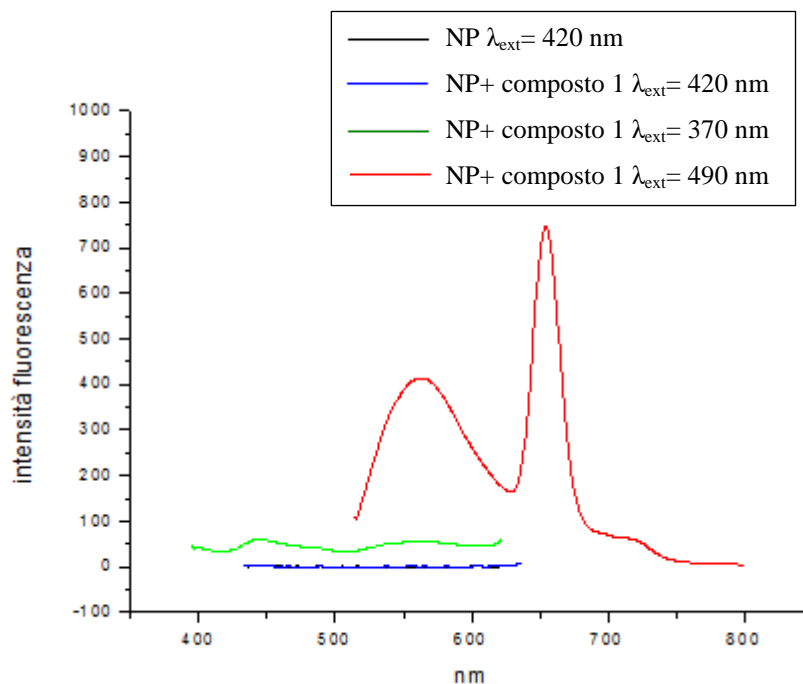


Figura 20: Spettri di emissione delle NP1 foto irradiate prima e dopo l'aggiunta di 1 ([1]= 5 μ M, [NP1]= 5 μ M, [HCl]= 10⁻³ M)

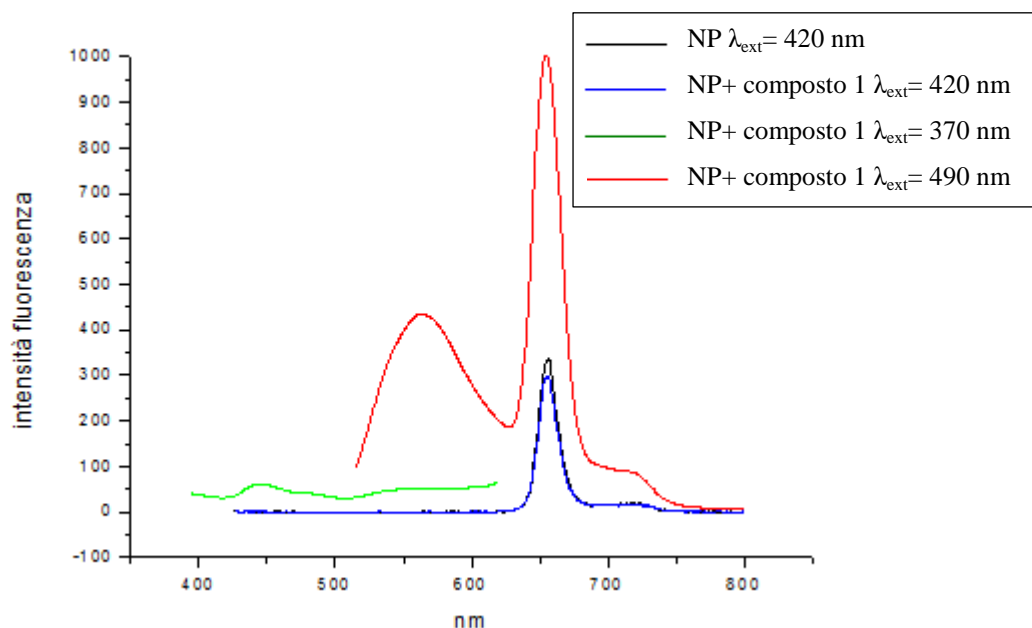


Figura 21: Spettri in emissione delle NP1 non foto irradiate prima e dopo l'aggiunta di 1 ([1]= 5 μ M, [NP1]= 5 μ M, [HCl]= 10⁻³ M)

In ogni caso non si osservano particolari differenze tra gli spettri ottenuti aggiungendo il composto 1 alle nanoparticelle foto irradiate o a quelle non foto irradiate. Negli spettri di emissione non si nota la banda a 420 nm, e questo dovrebbe confermare l'avvenuta reazione, tale banda è però assente anche negli spettri della

miscela di reazione non sottoposta preliminarmente a foto irradiazione, e questo suggerisce che i motivi della sua assenza possono essere altri. Per ottenere maggiori informazioni ho quindi preparato delle nanoparticelle (NP2), con le stesse dimensioni e funzionalizzazione amminica, prive del fotosensibilizzatore incapsulato.

In questo caso, l'attivazione del residuo furano è stata provocata da un sensibilizzatore (il rosa bengala) aggiunto alla soluzione. L'efficacia di questo sensibilizzatore e la capacità del derivato 1 di segnalare l'avvenuta formazione dell'aldeide sono stati verificati usando il acido 2-furan-propionico come modello (schema seguente).

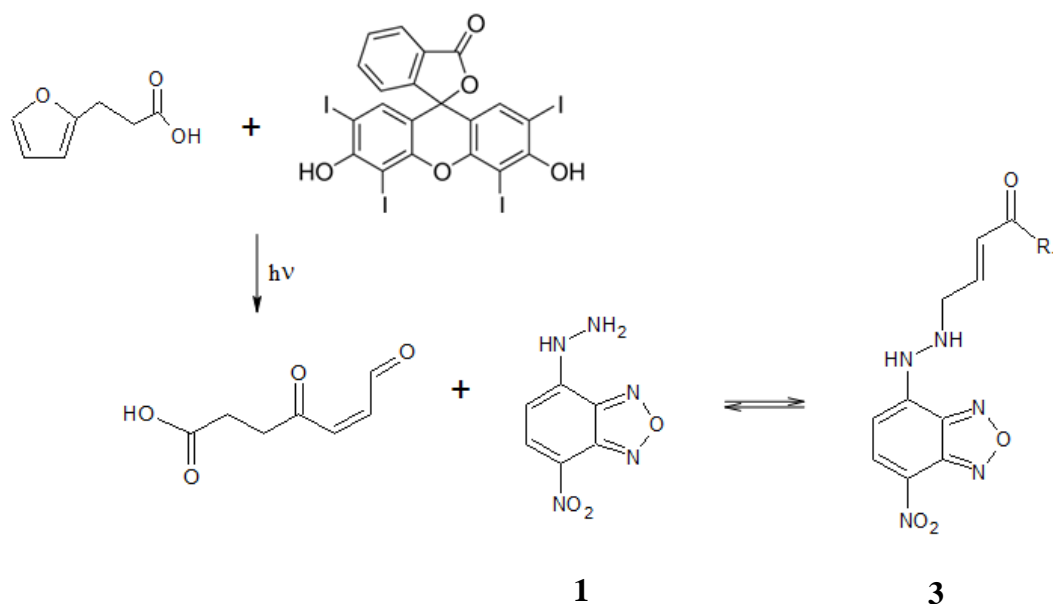


Figura 22: Schema di reazione tra l'acido 2-furanpropionico e il composto 1 in seguito a fotosensibilizzazione con rosa bengala

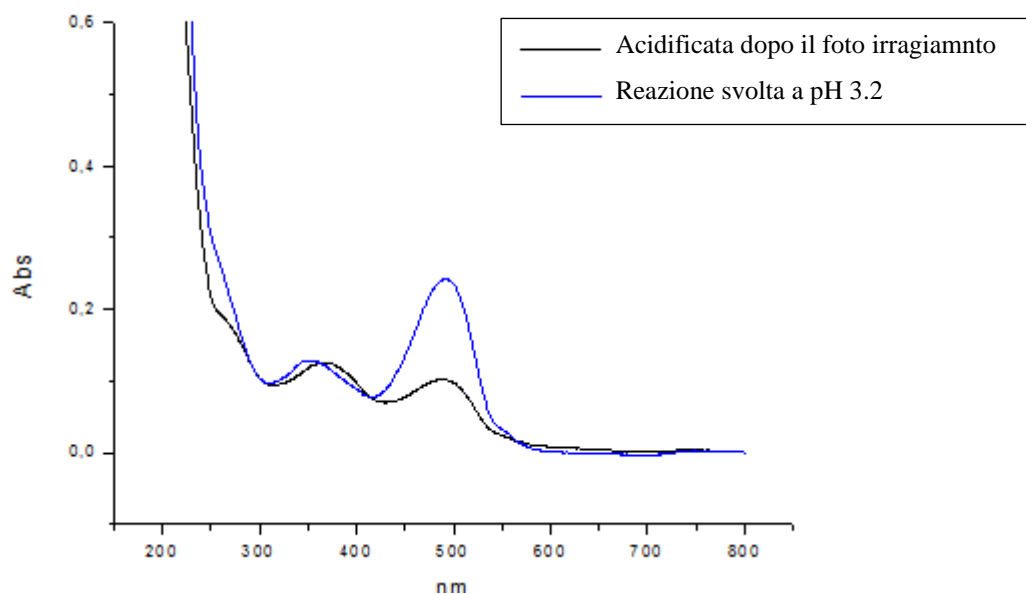


Figura 23: Spettro di assorbimento UV-Vis della miscela di reazione tra l'acido 2-furanpropionico e il composto 1 in seguito a fotosensibilizzazione con rosa bengala in condizioni di acidità diverse ([acido 2-fruran-propionico]= 20 μ M, [1]= 20 μ M)

Sono stati inoltre testati due protocolli differenti, nel primo caso il foto irraggiamento viene effettuato su una soluzione a pH 3.2, nel secondo il pH della miscela è neutro e l'acidificazione viene effettuata solo subito prima dell'aggiunta del derivato 1.

La curva blu rappresenta il primo caso e mostra le bande caratteristiche del reagente 1, perciò la reazione idrazone-aldeide non è avvenuta. Nel secondo caso, la curva nera, compare il caratteristico andamento a doppia banda di intensità simile che ci si aspetta per il prodotto della reazione idrazone-aldeide. La reazione tra il furano e l'ossigeno di singoletto non è quindi efficiente a pH 3.3 e la miscela deve essere acidificata solo successivamente al foto irraggiamento.

La stessa procedura è stata ripetuta sulle particelle funzionalizzate con il furano. Nelle seguenti figure sono riportati i risultati ottenuti.

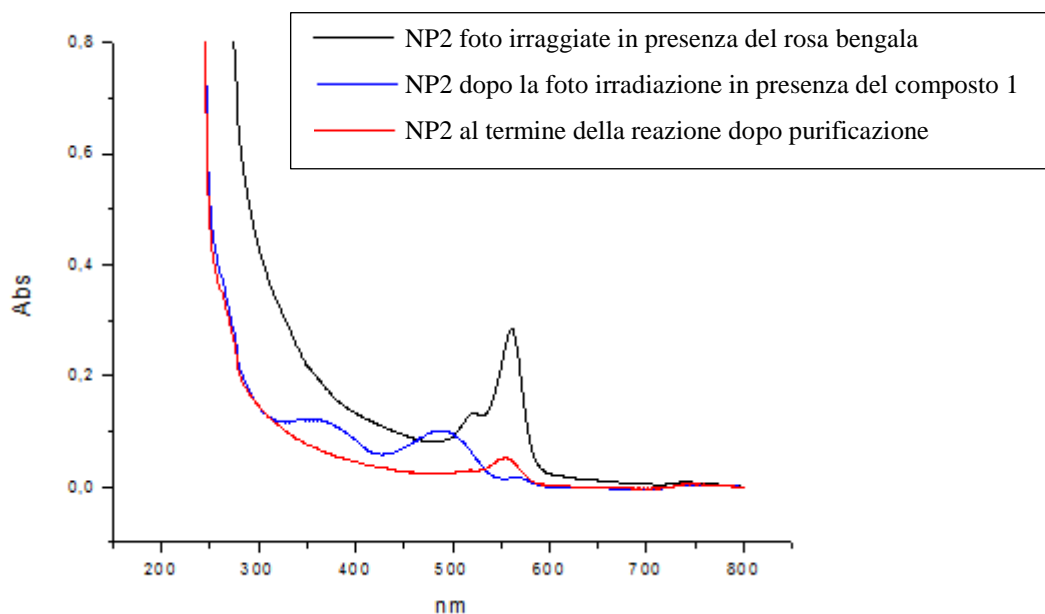


Figura 24: Spettro di assorbimento UV-Vis delle NP2 foto irradiate in presenza di rosa bengala in acqua dopo l'irraggiamento, dopo l'aggiunta di 1 e dopo purificazione per ultrafiltrazione ([NP2]= 20 μ M, [rosa bengala]= 5 μ M, [1]= 20 μ M)

In assorbimento, inizialmente, in presenza delle NP e del solo rosa bengala, si notano solo le bande caratteristiche del fotoiniziatore. In seguito all'aggiunta del composto 1 ad un pH di 3.3 scompaiono queste bande (degradazione del PS) e si notano quelle attese per il prodotto di reazione tra l'aldeide ed il composto 1.

Lo spettro rosso si riferisce però al prodotto purificato per ultrafiltrazione con H₂O: qui non si osserva alcun segnale attribuibile al composto 2 o ai suoi derivati. Gli spettri di emissione non risultano informativi.

Le particelle purificate non danno quindi alcun segno di aver effettivamente legato il composto 1 e quindi prodotto il gruppo aldeidico. Due ipotesi possono spiegare questo risultato:

- la mancata funzionalizzazione delle nanoparticelle con il furano;
- la dissociazione dell'idrazone durante la purificazione a pH acido.

La seconda ipotesi è stata però esclusa effettuando la purificazione a pH neutro senza ottenere risultati migliori.

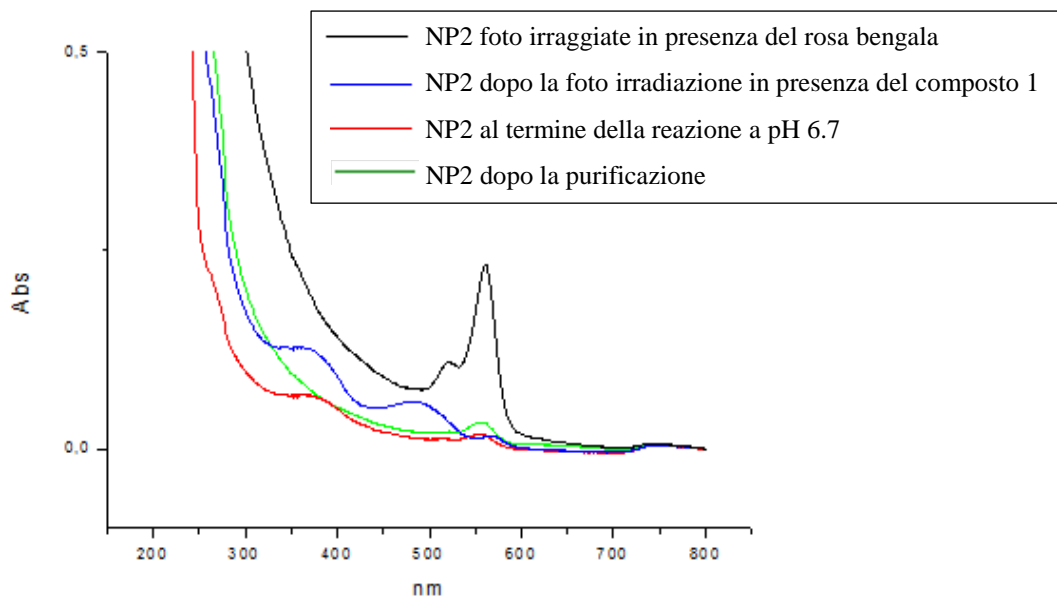


Figura 25: Spettro di assorbimento UV-Vis delle NP2
 ([NP2]= 20 μ M, [rosa bengala]= 5 μ M, [1]= 20 μ M)

Visti i deludenti risultati ottenuti, ho deciso di investigare la reazione utilizzando un metodo diverso per rilevare la presenza del furano.

In questo caso ho deciso di sintetizzare un derivato 4 del fluoroforo NBD coniugato con un gruppo maleimmide. Quest'ultimo dovrebbe reagire con il furano legato alle particelle tramite una reazione di Diels-Alder. La successiva purificazione delle particelle dovrebbe consentire di rilevare la presenza del fluoroforo legato alle particelle. Anche in questo caso ho effettuato una reazione di prova facendo reagire il derivato maleimide del NBD ammina con l'acido 2-furanpropionico per verificare le proprietà spettroscopiche del prodotto.

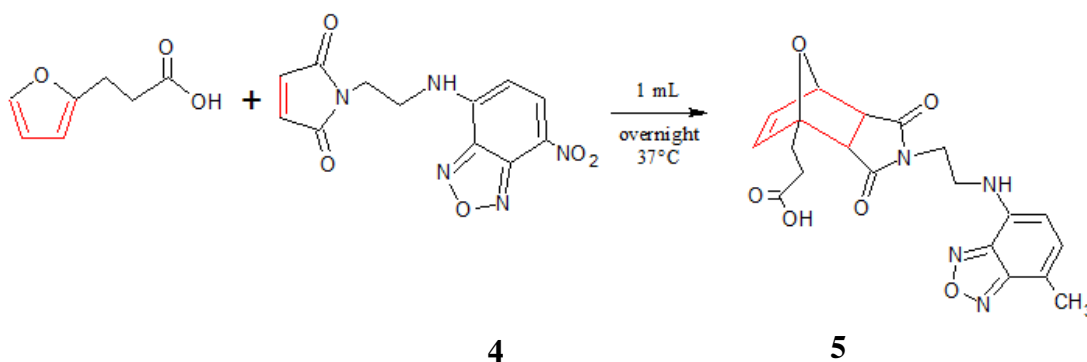


Figura 26: Schema di reazione tra l'acido 2-furanpropionico e il composto 4

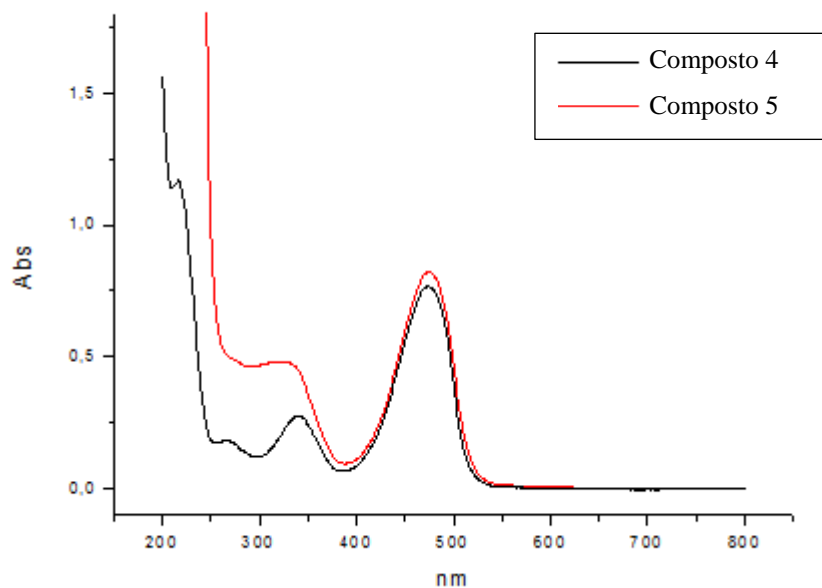


Figura 27: Spettri di assorbimento UV-Vis del composto 4 prima e dopo l'aggiunta di acido 2-furanpropionico ($[4] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{acido 2-furanpropionico}] = 10 \mu\text{M}$)

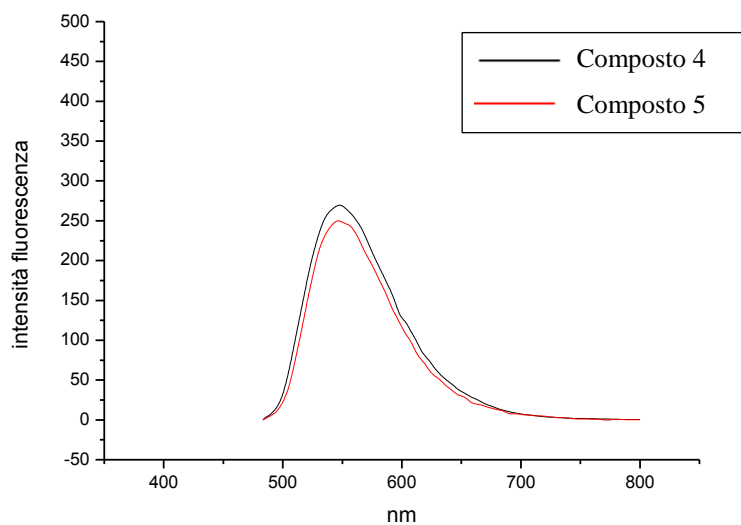


Figura 28: Spettro di emissione del composto 4 prima e dopo l'aggiunta di acido 2-furanpropionico ($\lambda_{\text{ecc}} = 470 \text{ nm}$, $[4] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{acido 2-furanpropionico}] = 10 \mu\text{M}$)

I risultati ottenuti dimostrano che la reazione non altera significativamente le proprietà del fluoroforo. La figura 29 mostra però che, dopo la reazione con le nanoparticelle e la successiva purificazione non si rivela la presenza significativa di NBD legato alle nanoparticelle.

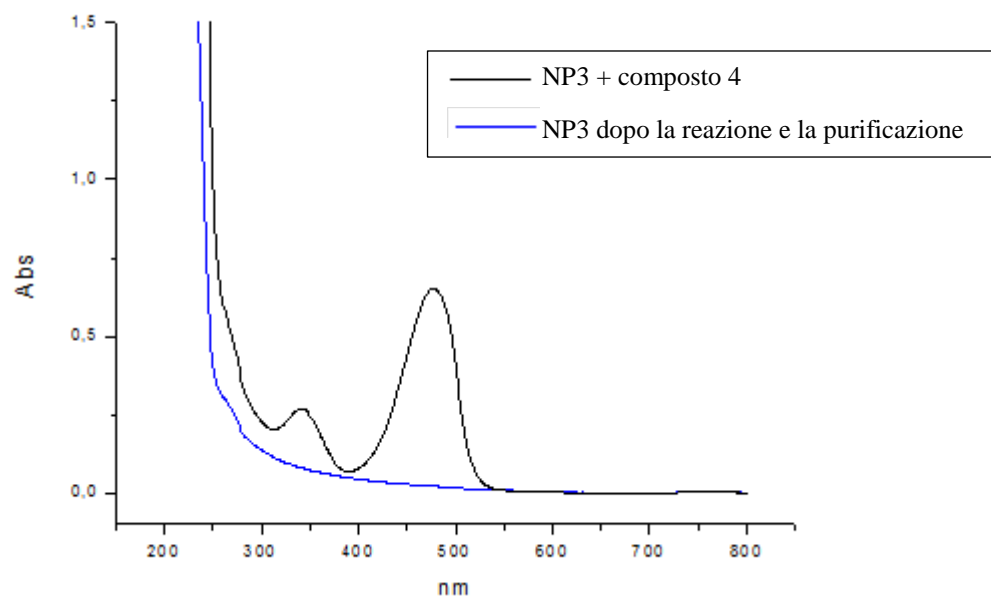


Figura 29: Spettro di assorbimento UV-Vis delle NP3 ($[NP3]= 10 \mu M$, $[4]= 50\mu M$)

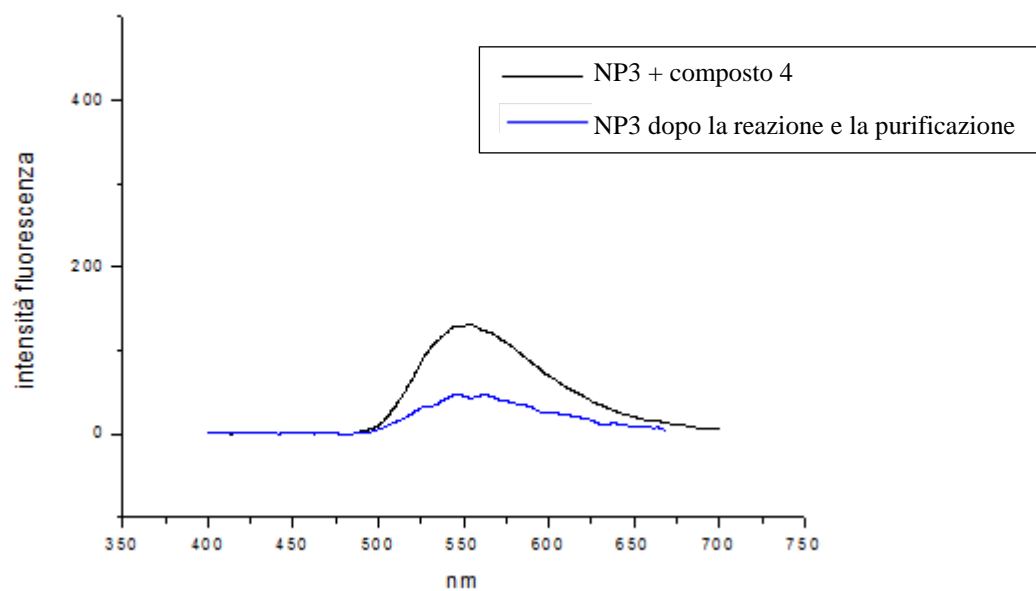


Figura 30: Spettro di emissione delle NP3 ($\lambda_{ecc}= 470 \text{ nm}$, $[NP3]= 10 \mu M$, $[4]= 50\mu M$)

3.3 Conclusione

In questo lavoro di Tesi sono stati studiati alcuni metodi per sintetizzare diverse categorie di molecole in grado di funzionalizzare la superficie delle nanoparticelle di silice.

In particolare una prima serie di esperimenti si concentrava nel verificare la possibilità di controllare l'interazione la nanoparticella e le proteine modificando le proprietà superficiali delle particelle.

La procedura sintetica utilizzata prevedeva la preparazione di derivati alcossisilano dotati di differenti gruppi terminali, forniti di gruppi con carica diversa, ed il loro utilizzo per ricoprire nanoparticelle ORMOSIL tramite la procedura di sintesi one-pot sviluppata nel gruppo in cui ho effettuato il mio lavoro di tesi. Il metodo di sintesi dei derivati scelto prevede una reazione di fotoaddizione tiolo-alchene: è una reazione click che non porta alla formazione di sottoprodotti, perciò non necessita di purificazione. Tale reazione potrà dimostrarsi molto utile nella sintesi di derivati alcossisilano. La sintesi delle nanoparticelle ricoperte si è però rilevata impossibile con il metodo scelto. La spiegazione più probabile è che la contemporanea presenza del tensioattivo e del derivato organosilano nella miscela di reazione porti ad una competizione per l'occupazione della superficie dell'emulsione in cui avviene la formazione della particella. In questo modo, la quantità di gruppi funzionali introdotti sulla particella risulta insufficiente a garantire la funzionalità colloidale.

Il secondo approccio studiato riguarda la funzionalizzazione delle nanoparticelle con un derivato del furano.

Questa molecola avrebbe dovuto reagire con l'ossigeno di singoletto (che viene creato per foto irraggiamento di un fotosensibilizzante), per formare un derivato aldeidico reattivo.

In questo modo si sarebbero ottenute NP contenenti in superficie molecole in grado di compiere reazioni di coniugazione con opportuni gruppi di *targeting* o, in alternativa, utilizzabili per la cattura di biomolecole.

Si è cercato di dimostrare la presenza e la reattività del derivato del furano nel monostrato di ricoprimento attraverso la coniugazione fotoattivata con un derivato idrazone e utilizzando una reazione di Diels-Alder.

I risultati ottenuti sono contraddittori: se da un lato, una volta ottimizzate le condizioni, è sembrato possibile dimostrare la formazione del derivato aldeidico sulle nanoparticelle, dall'altro le particelle dopo la purificazione non mostrano la presenza dei cromofori coniugati. In linea di principio i due risultati non sono in contraddizione, poiché l'estensiva purificazione potrebbe comportare il rilascio del cromoforo nel caso del derivato idrazinico, poiché la formazione dell'addotto idrazonico è reversibile, seppur lenta a pH neutro. Saranno necessari però ulteriori esperimenti per verificare l'effettiva efficacia di questa strategia.

Come ultima attività ho cercato di migliorare ulteriormente il protocollo di sintesi one-pot ORMOSIL (ORganically Modified SILica nanoparticles) messo a punto nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi. Il metodo è molto efficace e relativamente veloce, ma può essere migliorato andando a sostituire i derivati PEG-trialcossisilano, utilizzati per il ricoprimento, oppure variando il tipo di tensioattivo. Il problema di tali derivati è infatti legato al costo di sintesi e ai problemi di immagazzinamento. Mentre il tensioattivo, che è un prodotto tossico e deve quindi essere rimosso completamente, potrebbe essere sostituito con composti caratterizzati da minor tossicità.

L'utilizzazione del tensioattivo Pluronic® F127 avrebbe potuto consentire una soluzione ottimale. Esso infatti potrebbe rimanere intrappolato nelle particelle grazie alla sua peculiare struttura a U e consentirebbe di sostituire entrambi: i derivati sia il PEG-silano che il tensioattivo Brij® 35. Inoltre esso non è tossico ed è autorizzato dall'FDA per l'uso parentale. La purificazione delle particelle sarebbe quindi molto più semplice.

Dalle diverse prove effettuate si dimostra la possibilità di effettuare con efficacia questa sostituzione, sintetizzando nanoparticelle PEGilate utilizzando il solo F127 come tensioattivo e agente funzionalizzante. Tuttavia non è stato possibile preparare nanoparticelle di diametro superiore a 20 nm, perdendo così uno dei vantaggi più rilevanti del metodo di sintesi utilizzato: la possibilità di controllare le dimensioni delle particelle ottenute.

I risultati ottenuti nel corso di quest'attività sperimentale, seppure ancora preliminari in molti aspetti, pongono le basi per esplorare nuove possibili strategie per l'utilizzo delle nanoparticelle di silice in campo biomedico.

CAPITOLO 4
PARTE SPERIMENTALE

4.1 Strumentazione

Spettroscopia UV-VIS: lo spettrofotometro impiegato per la registrazione degli spettri UV-VIS è un Varian Cary 50 gestito con software Cary WinUV, dotato di lampada allo Xenon impulsata e portacelle termostatato a circolazione d'acqua. Per le analisi sono state utilizzate cuvette con cammino ottico di un centimetro.

Dynamic Light Scattering (DLS): le misure DLS sono state effettuate con uno strumento ZetaSizer NanoS della Malvern che utilizza un laser operante a 633 nm e misura l'intensità di luce diffusa a 176°. Per le analisi sono state utilizzate cuvette in plastica con cammino ottico di un centimetro in portacelle termostatato con un sistema Peltier.

Spettroscopia di fluorescenza: il fluorimetro utilizzato per la registrazione degli spettri di fluorescenza è un Varian Cary Eclipse, gestito con software Cary Eclipse, dotato di lampada allo Xenon impulsata e portacelle termostatato a circolazione d'acqua. Per le analisi sono state usate cuvette di quarzo con cammino ottico di un centimetro.

Spettrometria di risonanza magnetica nucleare: gli spettrometri utilizzati sono stati Bruker AC 200 F operante a 200 MHz, AC 300 F operante a 300 MHz, AC 500 MHz. I chemical shift sono riferiti a tetrametilsilano utilizzato come standard interno. La simbologia usata per descrivere i segnali spettrali è stata: s= singoletto, d= doppietto, t= tripletto, m= multipletto.

Spettrometria di Massa: analisi ESI-MS sono state effettuate con lo strumento LC/MSD trap-SL & XCT di Agilent Technologies.

Spettro IR: gli spettri di assorbimento infrarosso in trasformata di Fourier nella regione compresa tra 4000 e 400 cm^{-1} sono stati acquisiti mediante spettrometro FT-IR Nicolet 5700. I campioni sono stati preparati sospendendo i composti in KBr anidro in polvere e pressando il tutto in una pastiglia.

Immagini TEM: gli esperimenti di microscopia elettronica in trasmissione sono stati effettuati al Dipartimento di Biologia "Vallisneri" dell'Università di Padova. Le

immagini sono state ottenute con un microscopio a trasmissione elettronica FeiTecnaï 12, operante a 100 kV.

Centrifuga: nel work-up della sintesi di nanoparticelle è stata utilizzata una centrifuga ThermoScientific IEC CL 10, che può raggiungere i 4000 rpm.

Ultrafiltrazione: per gli esperimenti di ultrafiltrazione sono stati utilizzati apparati di filtrazione *Millipore*[®] da 50 mL con membrane *Amicon*[®] in cellulosa rigenerata di 44 mm. Le membrane hanno un *cut-off* di 10.000 Dalton e un diametro medio dei pori di circa 3 nm.

Lampada per fotoirraggiamento: lampada 500 W Xe/HgXeArc Lamp Power Supply 68911, Oriellnstrument.

4.2 Solventi e soluzioni

Acqua milliQ: preparata utilizzando acqua deionizzata ($R > 18 \text{ M}\Omega$) filtrata con sistema MILLI-Q della *Millipore*[®] ($\text{H}_2\text{O MQ}$), è stata impiegata negli esperimenti di ultrafiltrazione e nella preparazione delle soluzioni per le misure spettrofotometriche.

PBS (Phosphate Saline Buffer): soluzione acquosa di Sali inorganici, contenente NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Albumina da siero umano (HSA): polvere liofilizzata di albumina da siero umano utilizzata per ricoprire le nanoparticelle di silice commerciali (LUDOX TM-40).

Soluzione commerciale di nanoparticelle di silice LUDOX TM-40: la soluzione colloidale Ludox TM-40 utilizzata è stata fornita dalla Sigma Aldrich, è una sospensione al 40 % in peso di nanoparticelle ($d = 1.3 \text{ g/mL}$). Sono state utilizzate per determinare il grado di ricoprimento con HSA.

4.3 Ottimizzazione sintesi delle nanoparticelle di silice

Sono state effettuate diverse prove modificando la concentrazione e il pH della soluzione contenente il tensioattivo F127.

Di seguito si riportano le condizioni che hanno permesso di ottenere le nanoparticelle aventi un diametro idrodinamico più elevato.

	PM	mL
H₂O mQ	-	4.5
F127 (10 mM)	12000	0.5
n-BuOH	58	0.150
VTES	190.31	0.100
dopo 30 minuti		
NH₃:H₂O (1:1)	-	0.01

In un reattore incamiciato da 10 mL, termostato a 30°C e munito di ancoretta magnetica, si introducono nell'ordine 4.5 mL di H₂O milliQ, 0.5 mL di una soluzione 10 mM di F127 in H₂O milliQ, 0.150 mL di n-butanolo, 0.100 mL di VTES e dopo 30 minuti 10 µL di NH₃:H₂O 1:1. Trascorse 2 ore la reazione di polimerizzazione è terminata e si filtra con filtri HVLP da 0.45 µm, si procede ultrafiltrando per 5 volte su membrana AMICON® (cut-off 10 kDa). Si misurano le dimensioni delle nanoparticelle ottenute al DLS (Dynamic Light Scattering).

Dynamic light scattering: 20.25 ± 0.5 nm

4.4 Determinazione ricoprimento di nanoparticelle di silice commerciali con l'albumina

Le dimensioni delle nanoparticelle di silice commerciali ricoperte di albumina sono state determinate mediante light-scattering dinamico (DLS). Le misure sono state effettuate in soluzioni di PBS (tampone fosfato salino) contenenti la medesima quantità di nanoparticelle e concentrazioni di albumina variabili. Nella tabella seguente si riportano le quantità utilizzate dei diversi campioni.

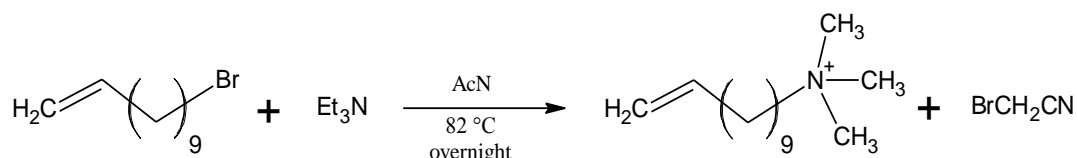
Campioni	PBS (μL)	NPs (μL)	HSA (μL)	HSA (μM)
1	1201.61	1.36	297.03	1.20
2	1152.11		346.53	1.40
3	1102.6		396.04	1.60
4	1053.1		445.54	1.80
5	1003.59		495.05	2.00
6	954.09		544.55	2.20
7	904.58		594.06	2.40
8	855.07		643.57	2.60

Le misurazioni sono state effettuate a 25°C, utilizzando cuvette di polistirene in un volume di 1500 μL . Il diametro idrodinamico medio è stato registrato lasciando trascorrere 10 minuti dalla preparazione del campione per consentire al campione di omogenizzarsi.

4.5 Sintesi libreria chimica

4.5.1 Sintesi precursori

- Sintesi di 11-(N,N,N-trimetil) dodecheneⁱ



Reagenti	PM	g	mmol	mL	d (g/mL)
11-bromoundechene	233.19	1.014	4.35	-	-
trimetilammina	59.11	0.8	4.08	1.5	0.75

In un pallone a due colli munito di ancoretta magnetica si introducono 11-bromoundechene (1,014 g, 4,35 mmol) disciolti in acetonitrile (20 mL) e successivamente si aggiunge trimetilammina (1.5 mL, 4,08 mmol). Si lascia decorrere la reazione a 82 °C seguendo il decorso mediante TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH 9:1, R_f=0,5).

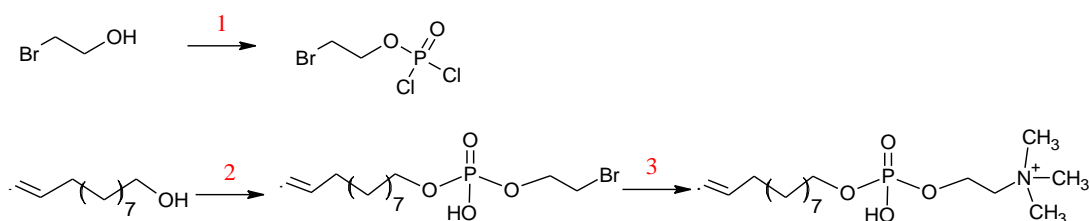
Dopo una notte si allontana il solvente al rotavapor, e si purifica il prodotto mediante una colonna cromatografica flash su gel di silice (eluente CH₂Cl₂/MeOH 9:1) ottenendo 1.31 g di prodotto sotto forma di solido bianco (resa 90%).

¹H NMR (200 MHz, MeOD): 1.27 (s, 12H, CH₂); 1.70 (s, 2H, CH₂); 1.96 (q, 2H, CH₂); 3.06 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃); 3.28 (t, 2H, CH₂); 4.78 (s, H, =CH); 4.87 (s, H, CH₂=); 5.73 (m, H, CH₂=).

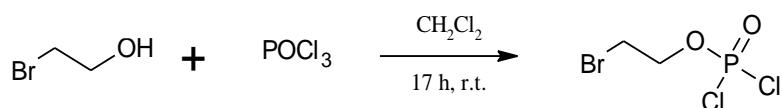
ⁱ Bonomi R. et al, **Assessment of the morphology of mixed SAMs on Au nanoparticles using a**

- Sintesi dodec-11-en-1-il (2-(trimetilammonio)etil) fosfateⁱⁱⁱ

Nel seguente schema di reazioni si riportano i passaggi di sintesi necessari per la formazione del derivato zwitterionico.



1 Sintesi 2-bromoetil fosforodichloroidrato



Reagenti	PM	g	mmol	mL	d (g/mL)
bromoetano	124.97	5	40	2.836	1.763
POCl ₃	153.32	11.12	72		

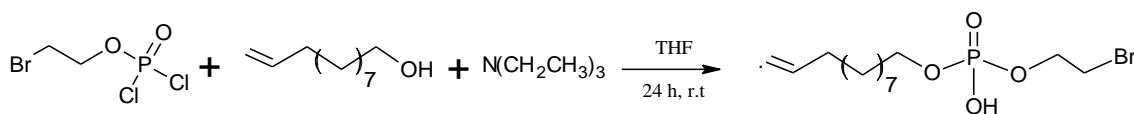
In un pallone da 50 mL contenente POCl₃ (11.12 g, 72 mmol) si aggiungono CH₂Cl₂ (6 mL) e il bromoetano (2.836 mL, 40 mmol) goccia a goccia. Dopo aver lasciato in agitazione per 12 ore, si introducono 10 mL di toluene e si evapora l'eccesso di POCl₃ a pressione ridotta per 4 ore a 40 °C (resa 98 %).

Il prodotto viene caratterizzato mediante ¹H NMR (200 MHz, CD₂Cl₂).

¹H NMR (200 MHz, CD₂Cl₂): 3.690 (t, 2H, CH₂); 4.668 (q, 2H, CH₂).

ⁱⁱⁱ Silvers L. A. et al., **Functional aliphatic polyesters and nanoparticles prepared by organocatalysis and orthogonal grafting chemistry**, "J. of Polymer Science", Vol. 50, 3517-3529 (2012)

2 Sintesi 2-bromoetil dodec-11-en fosfato



Reagenti	PM	g	mmol	mL	d (g/mL)
2-bromoetil fosforodichloridato	239.85	9.114	38	-	-
11-en-undecolo	170.17	2.5	14.69	2.955	0.845
triethylamina	100.89	2.27	22.5	3.127	0.726

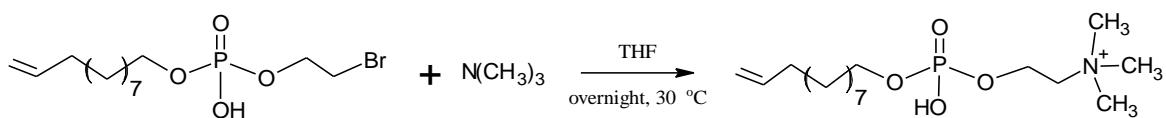
In un pallone da 500 mL contenente 120 mL di THF si aggiungono 11-en-undecolo (2.955 mL, 14.69 mmol), trietilamina (3.127 mL, 22.5 mmol) e lentamente si aggiunge 2-bromoetilfosforodichloridato diluito in 80 mL di THF e si lascia in agitazione per 24 ore.

Si allontana il trietilamina cloridato aggiungendo 300 mL di toluene che ne provoca la precipitazione, si filtra e si concentra a pressione ridotta.

L'olio giallo che si ottiene viene disciolto in THF (300 mL) e 0.5 M NaHCO₃ (300 mL), e si lascia in agitazione per 24 ore ottenendo una resa del 43 %. Il THF rende la soluzione incolore e trasparente, mentre l'aggiunta di NaHCO₃ provoca la formazione di un solido bianco rendendo la soluzione opaca.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 1.278 (s, 8H, CH₂); 1.639 (d, 2H, CH₂); 2.039 (d, 2H, CH₂); 3.520 (d, 2H, CH₂Br); 4.013 (d, 2H, CH₂); 4.240 (d, 2H, CH₂); 4.933 (d, H, CH₂=); 5.015 (s, H, CH₂=); 5.815 (m, H, CH₂=).

3 Sintesi dodec-11-en-(2-(trimetilammonio)etil) fosfato



1

Reagenti	PM	g	mmol	mL	d (g/mL)
1	355.07	2.22	6.25	-	-
trimetilammina	59.11	12.32	62.5	16.43	0.75

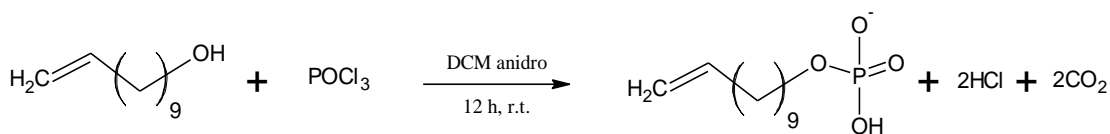
In un pallone da 250 mL contenente il composto **1** (2.22 g, 6.25 mmol) diluito in 50 mL di THF anidro si aggiunge la trimetilammina (16.43 mL, 62.5 mmol).

Si lascia in agitazione a 30°C per una notte a refluxo con un tappo di cloruro di calcio. Terminata la reazione si gorgoglia azoto, e si evapora il restante solvente all'evaporatore rotante.

La purificazione del prodotto viene effettuata tramite colonna cromatografica flash utilizzando come fase stazionaria SiO₂ e come eluente una miscela di CH₂Cl₂/MeOH in rapporto variabili (5:1 poi 1:1 e infine 100% MeOH). Si sono ottenuti 0.6675 g di un solido bianco (resa 31%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.323 (s, 12H, CH₂); 1.646 (d, 2H, CH₂); 2.061 (d, 2H, CH₂); 3.255 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃); 3.890 (d, 2H, CH₂); 4.276 (d, 2H, CH₂); 4.910 (d, H, CH₂=); 5.019 (s, H, CH₂=); 5.846 (m, H, CH₂=).

- Sintesi undec-10-en-fosfato



Reagenti	PM	g	mmol	mL	d (g/mL)
11-en-undecolo	170.17	1	5.87	1.176	0.845
POCl ₃	153.32	1.619	10.56	0.984	1.645

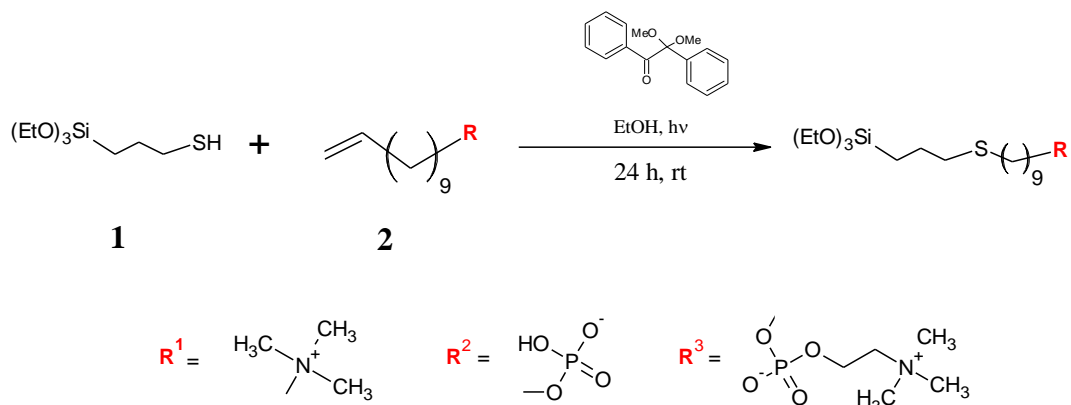
In un pallone si scioglie POCl₃ (1.619 g, 10.56 mmol) in 4 mL di CH₂Cl₂ anidro. Si aggiunge goccia a goccia l'11-en-undecolo (1 g, 5.87 mmol) e si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 12 ore con un tappo di cloruro di calcio.

Si aggiunge 7 mL di toluene e si rimuove il solvente e il POCl₃ residuo sotto vuoto scaldando a 40°C per 4 ore (resa 45 %).

Il prodotto liquido marrone scuro non necessita di purificazione.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 1.364 (s, 10H, CH₂); 1.699 (d, 2H, CH₂); 2.066 (d, 2H, CH₂); 4.005 (s, 2H, CH₂O); 5.013 (d, 2H, CH₂=); 5.800 (m, H, CH₂=).

4.5.2 Metodo di sintesi generale dei derivati silani a partire dai precursori^{iv}



Reagenti	PM	mmol	g	d (g/mL)	mL
1	238.42	1	0.238	0.987	0.242
2	-	1	-	-	-
fotoiniziatore	256.30	0.02	5.1	-	-

In una provetta di vetro contenente un'ancoretta magnetica si introducono il composto **1** (0.238g, 1 mmol), il composto **2** (1 mmol), il fotoiniziatore (5.1 mg, 0.02mmol) e infine 200 μL EtOH. Si utilizza un tappo forato in modo da poter gorgogliare azoto, e si ricopre la provetta con carta di alluminio. Si mantiene la miscela di reazione in continua agitazione e fotoirradiata $\lambda=368$ nm per 24 ore.

Caratterizzazione

- **Alchene con R¹**

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): 0.79 (m, 2H, SiCH₂); 1.19 (d, 9H, CH₃); 1.34-1.81 (d, 15H, CH₂); 2.56 (m, 4H, SCH₂); 3.20 (s, 9H, N(CH₃)₃); 3.65 (d, 2H, CH₂O).

^{iv} Alexander K. Tucker-Schwartz et al., **Thiol-ene Click Reaction as a General Route to Functional Trialkoxysilanes for Surface Coating Applications**, "J. Am. Chem. Soc", Vol. 133, 11026-11029 (2011)

- **Alchene con R²**

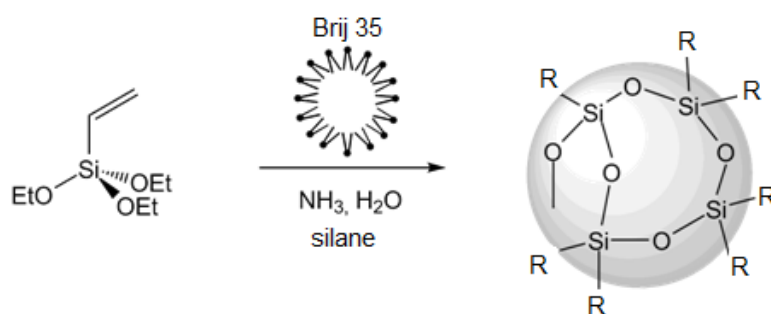
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): 0.79 (m, 2H, SiCH₂); 1.18 (d, 9H, CH₃); 1.34-1.68 (d, 15H, CH₂); 2.55 (m, 4H, SCH₂); 3.63 (m, 6H, CH₂); 3.97 (m, 2H, CH₂O).

- **Alchene con R³**

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): 0.66 (m, 2H, SiCH₂); 1.07 (d, 9H, CH₃); 1.11-1.67 (d, 15H, CH₂); 2.45 (m, 4H, SCH₂); 3.24 (m, 6H, N(CH₃)₃); 3.55 (m, 2H, CH₃N); 3.73 (d, 6H, CH₂); 4.17 (m, 2H, CH₂); 4.78 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (500 MHz, CD₃OD): 18.52 (1C, SiCH₂); 18.83 (3C, CH₃); 24.46-32.85 (11C, CH₂); 35.96 (1C, CH₂S); 54.83 (3C, N(CH₃)₃); 60.37 (3C, CH₂OSi); 67.04 (CH₂N(CH₃)₃); 67.09 (CH₂OP); 67.63 (); 79.17 (OCH₂).

4.5.3 Metodo di sintesi nanoparticelle funzionalizzate con la libreria chimica



	PM	mmol	mL
Silano	-	0.015	-
H₂O mQ	-	-	4.166
Brij 35	1200	-	0.833
n-BuOH	58	-	0.150
VTES	190.31	-	0.100
Dopo 30 minuti			
NH₃:H₂O (1:1)	-	-	0.01

In un reattore incamiciato da 10 mL, termostato a 30 °C e munito di ancoretta magnetica, si introducono nell'ordine il derivato silano (0.015 mmol), 4.166 mL di H₂O milliQ, 0.833 mL di una soluzione 30 mM di Brij 35 in H₂O milliQ, 0.150 mL di n-butanolo, 0.100 mL di VTES e dopo 30 minuti 10 µL di NH₃:H₂O 1:1. Trascorse 2 ore la reazione di polimerizzazione è terminata e si misurano le dimensioni delle nanoparticelle ottenute al DLS (Dynamic Light Scattering).

Si procede suddividendo in due porzioni uguali la sospensione di nanoparticelle, per effettuare due diverse purificazioni.

Ad una aliquota si introducono 430 mg di Bio-Beads SM-2 (polistirene, 86 mg per mL di soluzione di nanoparticelle) e si lascia agitare per 2 ore. Al termine si separa la sospensione di nanoparticelle dalla resina servendosi di pipetta Pasteur. Infine la miscela di reazione è stata ultrafiltrata per 5 volte su membrana AMICON[®] (cut-off 10 kDa).

Mentre l'altra porzione viene purificata per dialisi.

Infine ad entrambe le sospensioni di nanoparticelle si effettua la misura delle dimensioni e della carica superficiale con DLS.

In tabella si riportano i valori ottenuti

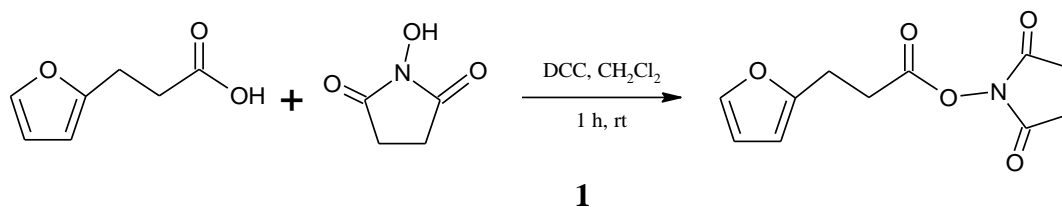
Silano		Diametro idrodinamico medio (nm)	PdI	Potenziale Zeta
positivo	non purificate	129.4 ± 0.7	0.160	-4 ± 2
	resina	114 ± 1	0.340	-10.4 ± 0.8
	dialisi	2.92 ± 0.05	0.293	-0.9 ± 0.4
negativo	non purificate	98 ± 2	0.026	-20 ± 1
	resina	77.3 ± 0.7	0.037	-29.3 ± 0.8
	dialisi	83 ± 3	0.018	-2.2 ± 0.3

Dai dati ottenuti dal DLS si ricava che nel caso del derivato silano con il gruppo amminico quaternario (definito silano positivo) il metodo di purificazione per dialisi è inefficace in quanto si ha la perdita delle NP. Il trattamento con resina e successiva ultrafiltrazione permette invece di mantenere le NP stabili. Inoltre i valori di potenziale zeta non concordano con la carica effettiva presente nel campione. Questo può essere dovuto alla presenza di un controione che ne maschera la carica o, nel caso peggiore, le NP non sono state funzionalizzate con il derivato silano positivo.

Mentre per il derivato silano che presenta un gruppo fosfato (definito silano negativo) con entrambi i metodi di purificazione si ottengono NP aventi pressoché la stessa dimensione. I valori di potenziale zeta ottenuti con i due metodi di purificazione sono in disaccordo in quanto si ha una diversa solvatazione.

4.6 Sintesi nanoparticelle funzionalizzate con furano

4.6.1 Sintesi 1-[3-furan-2-propanoil)ossi]pirolidina-2.5-dione^v



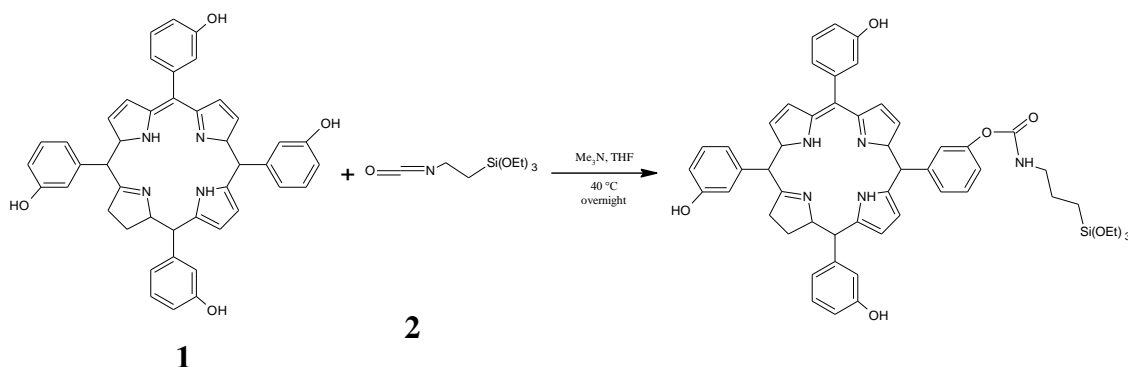
Reagenti	PM	mmol	mg
1	104.14	5	702.4
N-idrossisuccinimide	115.09	5	600
DCC	206.33	5	1000

In un pallone da 50 mL munito di ancoretta magnetica contenente il composto 1 (702.4 mg, 5 mmol) sciolto in 6 mL di diclorometano si introduce N-idrossisuccinimide (600 mg, 5 mmol) e DCC (1 g, 5 mmol). Si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora chiudendo il sistema con un tappo a cloruro di calcio. La miscela di reazione viene filtrata su carta da filtro e successivamente concentrata al rotavapor.

Il residuo viene purificato tramite colonna cromatografica utilizzando come eluente toluene:etilacetato in rapporto 10:1 (Rf:0.5), ottenendo 0.9248 g di prodotto (resa 73%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.58 (s, 4H, CH₂); 2.95-2.96 (d, 2H, CH₂); 2.97-2.98 (d, 2H, CH₂); 6.13 (s, 1H, CH); 6.31 (s, 1H, CH); 7.28 (s, 1H, CH).

^v Huang and Robert J. Kerns, **Diversity-oriented chemical modification of heparin: Identification of charge-reduced N-acyl heparin derivatives having increased selectivity for heparin-binding proteins** Liusheng, "Bioorganic & Medicinal Chemistry", Vol. 14, 2300-2313 (2006)

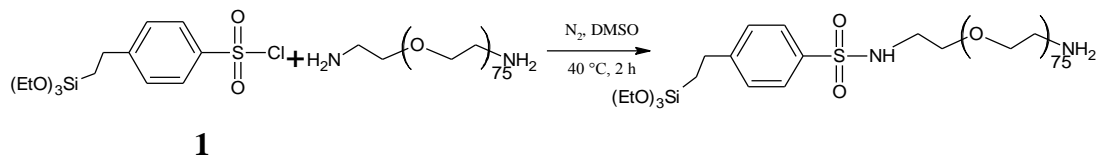
4.6.2 Sintesi di m-THPC mono Si^{vi}


Reagenti	PM	mmol	mg	d (g/mL)	μL
1	680.75	0.013	8.98	-	-
2	247.37	0.032	8.02	1	8.02
trimetilammina	101.19	0.032	3.24	0.727	4.45

In un vaial di reazione, munito di ancoretta magnetica e oscurato alle pareti con carta di alluminio si scioglie il composto 1 (8.98 mg, 0.013 mmol) in 100 μL di THF anidro, si aggiungono il composto 2 (8 μL, 0.032 mmol) e la trimetilammina (4.45 μL, 0.032 mmol). Si lascia reagire a 40 °C per una notte e si segue la reazione tramite TLC (eluente etere di petrolio/isopropanolo 3:1 Rf:0.4).

Si allontana il solvente al rotavapor e si ottiene il prodotto sotto forma di solido color violaceo (resa 98 %).

UV-Vis (toluene): λ_{\max} (nm) 420, 518, 545, 601, 654.

4.6.3 Sintesi PEG₃₄₀₀NH₂^{vii}


Reagenti	PM	mmol	mg	d (g/mL)	μL
1	324.85	$7.06 \cdot 10^{-3}$	2.3	≈ 1	4.6
PEG ₃₄₀₀ (NH ₂) ₂	3400	$7.06 \cdot 10^{-3}$	24.5	-	-

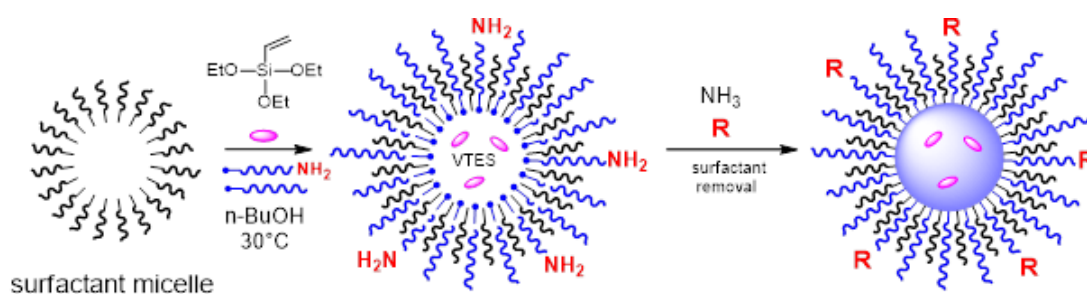
In un pallone a fondo conico munito di ancorotta magnetica si scioglie PEG₃₄₀₀(NH₂)₂ (24.5 mg, $7.06 \cdot 10^{-3}$ mmol) in 200 μL di DMSO anidro (se non si scioglie si immerge nel bagno ad olio impostato a 40 °C). Successivamente si introduce il composto 1 in soluzione 50% DCM (4.6 μL, $7.06 \cdot 10^{-3}$ mmol).

Si lascia in agitazione per due ore sotto azoto, in un bagno ad olio a 40°C.

^{vii} Mancin et al, **Highly PEGylated silica nanoparticles: “ready to use” stealth functional nanocarriers**, “J. Mater. Chem.”, Vol. 20, 2780-2787 (2010).
 Mancin et al, **Targeted delivery of photosensitizers: efficacy and selectivity issues revealed by multifunctional ORMOSIL nanovectors in cellular systems**, “Nanoscale”, Vol. 5, 6106-6116 (2013).

4.6.4 Sintesi nanoparticelle funzionalizzate al 10% con PEG NH₂^{viii}

Si riportano in un unico schema le sintesi delle NP funzionalizzate al 10% con gruppi amminici in presenza e in assenza del fotosensibilizzante, in quanto l'unica differenza è nell'aggiungere o meno di tale fotosensibilizzante.



	PM	mg	mL
PEG OMe	2288	31.5	-
H₂O mQ	-	-	4.166
Brij 35	1200	-	0.833
n-BuOH	58	-	0.150
Foscan 9.5 mM DMSO	-	-	0.130
VTES	190.31	-	0.100
NH₃:H₂O (1:1)	-	-	0.01
PEG₃₄₀₀NH₂	3638.4	3.5	0.027

In un reattore incamiciato da 10 mL, termostato a 30 °C e munito di ancorotta magnetica, si introducono nell'ordine il PEG OMe (31.5 mg), 4.166 mL di H₂O milliQ, 0.833 mL di una soluzione 30 mM di Brij 35 in H₂O milliQ, 0.150 mL di n-butanolo, 0.130 mL di Foscan 9.5 mM in DMSO, 0.100 mL di VTES e dopo 30 minuti 10 µL di NH₃:H₂O 1:1 e infine 0.027 mL di PEG₃₄₀₀NH₂. Terminata 2 ore la reazione di polimerizzazione è terminata, quindi si introduce nel reattore 430 mg di Bio-Beads Biorad SM-2 (polistirene, 86 mg per mL di soluzione di nanoparticelle) e si lascia agitare per 2 ore. Al termine si separa la sospensione di nanoparticelle dalla

^{viii} Mancin et al, **Highly PEGylated silica nanoparticles: “ready to use” stealth functional nanocarriers**, “J. Mater. Chem.”, Vol. 20, 2780-2787 (2010).
 Mancin et al, **Targeted delivery of photosensitizers: efficacy and selectivity issues revealed by multifunctional ORMOSIL nanovectors in cellular systems**, “Nanoscale”, Vol. 5, 6106-6116 (2013).

resina servendosi di pipetta Pasteur. La miscela di reazione in seguito viene ultrafiltrata per 5 volte su membrana AMICON® (cut-off 10 kDa).

Si misurano le dimensioni delle nanoparticelle ottenute al DLS (Dynamic Light Scattering).

Caratterizzazioni:

NP	DLS	UV-Vis	Concentrazione in peso
con Foscan	23 ± 3 nm	55.3 μM	2.156 mg/mL
senza Foscan	30 ± 8 nm	-	7.56 mg/mL

L'analisi UV-Vis è stata svolta solo per le NP contenenti il fotoiniziatore in quanto si sfrutta il caratteristico assorbimento del Foscan per calcolare la concentrazione delle NP. Conoscendo il coefficiente di estinzione molare del Foscan (ϵ) a λ : 650 nm e registrando lo spettro di assorbimento del campione, si calcola la concentrazione del campione attraverso la legge di Lambert-Beer.

$$\epsilon_{650}: 38300 \text{ cm}^{-1}$$

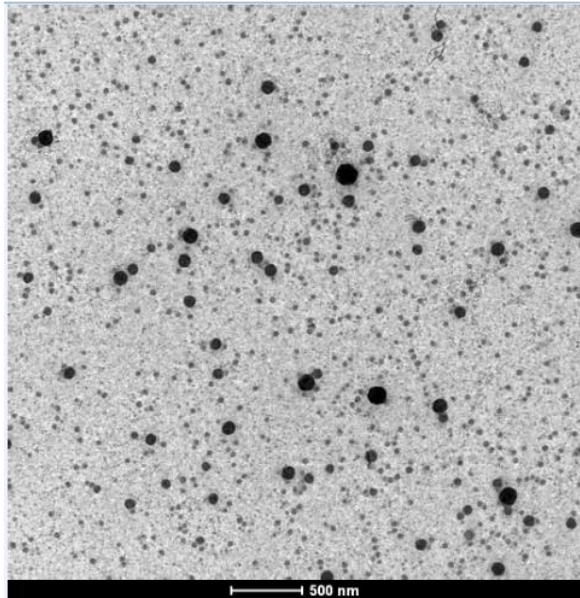
Assorbimento campione a 650 nm (Abs): 0.16285 nm

$$\text{Concentrazione campione in cuvetta} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot b} = 4.252 \text{ } \mu\text{M in } 650 \text{ } \mu\text{L}$$

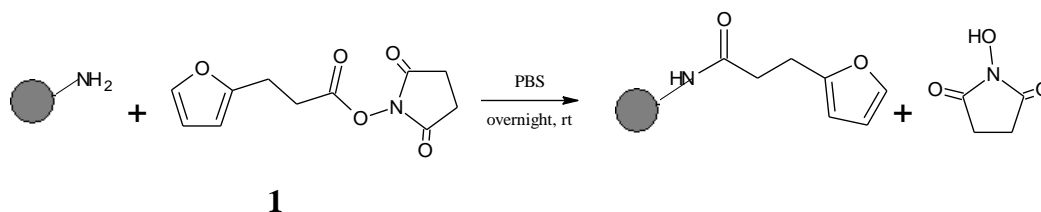
Concentrazione campione: 55.3 μM

La concentrazione in peso, invece viene misurata pesando la sospensione delle NP dopo averle essiccate.

Analisi TEM



4.6.5 Funzionalizzazione nanoparticelle con derivati del furano



Reagenti	PM	equivalenti	mg
NP-NH ₂	-	1	-
1	237.21	20	4

Le nanoparticelle sintetizzate con il metodo riportato nel paragrafo 5.6.4 vengono filtrate con filtro HVLP da 0.45 μm e vengono lavate con H₂O milliQ ultrafiltrandole per 5 volte su membrana AMICON[®] (cut-off 10 kDa) ottenendo un volume finale di 2 mL. Da questo volume si prelevano 200 μL per effettuare il test della fluorescamina utilizzato per verificare il grado di funzionalizzazione delle nanoparticelle. Si procede con un'ulteriore ultrafiltrazione per ottenere la sospensione delle nanoparticelle in PBS e non più in H₂O milliQ.

In un pallone da 10 mL munito di ancoretta magnetica si introducono il composto 1 (4 mg, 20 eq) e le nanoparticelle (1 eq).

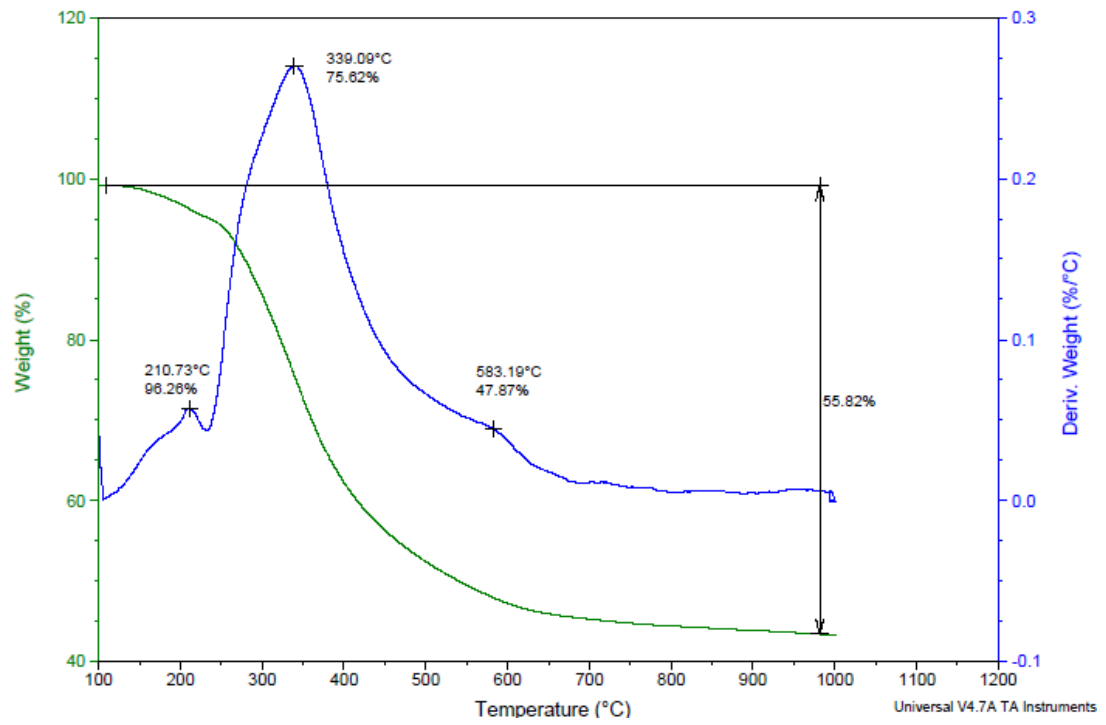
Si lascia la miscela di reazione in agitazione a temperatura ambiente per una notte oscurando le pareti con carta di alluminio.

Infine si filtrano con con filtro HVLP da 0.45 μm e ultrafiltrate per 5 volte su membrana AMICON[®] (cut-off 10 kDa) con H₂O milliQ.

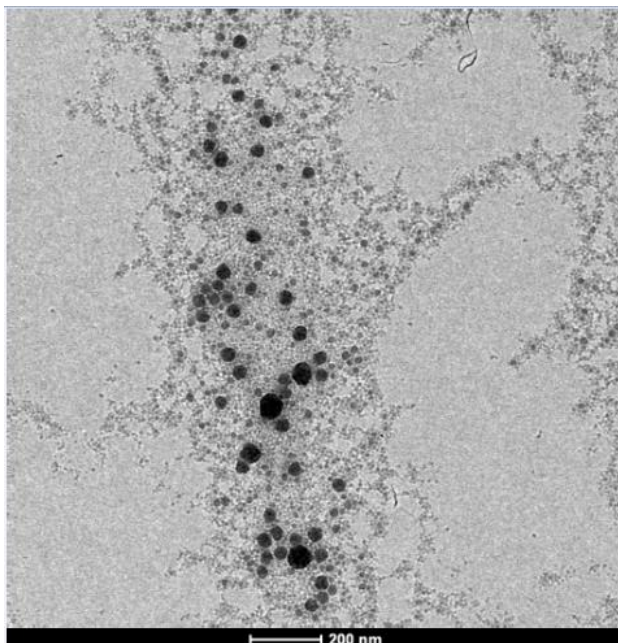
Caratterizzazioni:

NP	DLS	UV-Vis	Test fluorescamina	Concentrazione in peso
Con Foscan	30 \pm 7 nm	137.4 μM	278.14 μM con % funzionalizzazione 87 %	5.348 mg/mL
Senza Foscan	21 \pm 4 nm	-	138.9 μM con % funzionalizzazione 87 %	18.92 mg/mL

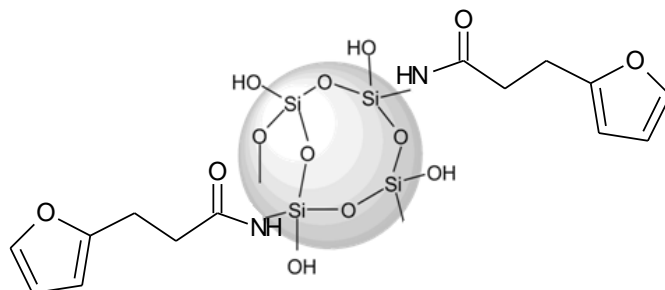
TGA:



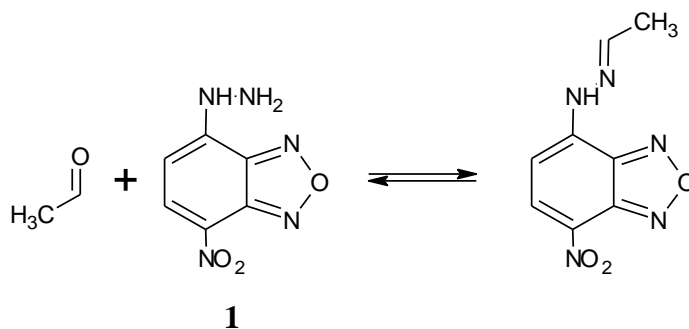
Analisi TEM:



4.6.6 Reazioni di prova per verificare la funzionalizzazione con furano



- Formazione idrazoni aromatici

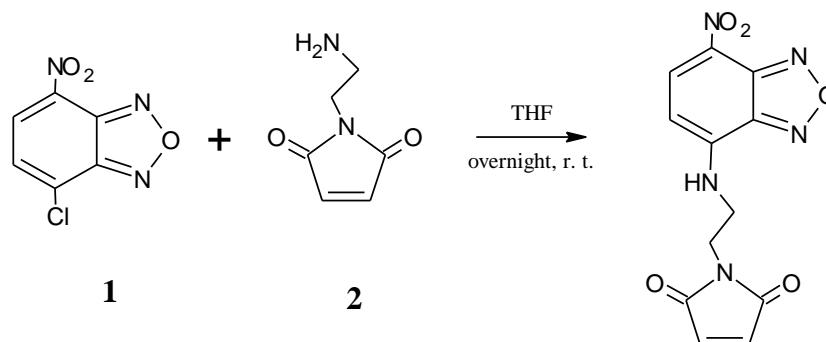


Reagenti	PM	μM	μL
acetaldeide	44.05	10	10
1	227.18	1	10

La reazione viene eseguita in una cuvetta UV a volume ridotto, si introducono 980 μL di etanolo, e 10 μL di composto 1 e si misurano gli spettri di assorbimento e di emissione. Successivamente si introducono 10 μL di acetaldeide e si verificano i cambiamenti spettroscopici.

Reazione Dieals-Alder

- Sintesi 1-{2-[(7-nitro-2,1,3-benzossidiazol-4-il)amino]etil}-1*H*-pirrole-2,5-dione



Reagenti	PM	mmol	mg
1	199.55	0.6609	131.9
2	254.16	0.6609	168

In un pallone da 50 mL munito di ancoretta magnetica e raffreddato con ghiaccio si inserisce una soluzione di composto 1 (131.9 mg, 0.6609 mmol) e DIPEA (618 μ L) in 7 mL di THF ottenendo una soluzione arancione. Con l'aggiunta goccia a goccia della soluzione di composto 2 (168 mg, 0.6609 mmol) in 9 mL di THF la colorazione della miscela varia diventando verde acido.

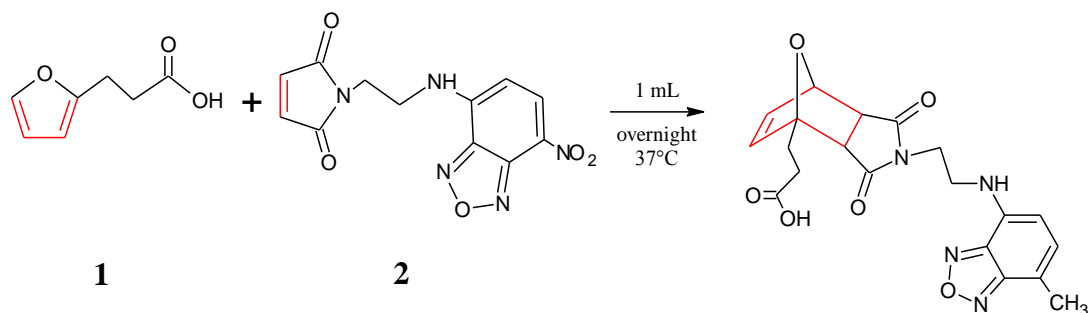
La miscela di reazione si lascia in agitazione per una notte a temperatura ambiente ottenendo una soluzione eterogenea marrone.

Trascorse 17 ore si allontana il solvente al rotavapor, e si purifica il prodotto mediante una colonna cromatografica flash su gel di silice (eluente acetato di etile/esano 1:1) ottenendo 35 mg di prodotto sotto forma di solido arancione (resa 20%).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): 6.57-6.60 (d, H, HC=); 7.14 (s, 2H, HC=); 8.65-8.68 (d, H, HC=); 9.52 (s, H, NH).

$^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz, DMSO): 36 (1C, CH_2); 42 (1C, CH_2); 55 (1C, HC=); 135 (2C, C=C); 144 (1C, C=N); 145 (1C, C=N); 146 (1C, =CN); 172 (2C, C=O).

- Reazione Dieals-Alder



Soluzione buffer Diels-Alder a pH=6

- NaH₂PO₄ · H₂O 5 mM
- NaCl 20 μM
- MgCl₂ · 6 H₂O 0.2 mM

Reagenti	PM	μM	μL
1	140.14	10	100
2	303.23	50	5.32
Buffer Diels-Alder pH 6	-	-	700

La reazione si svolge nel multisintetizzatore ad una temperatura di 37 °C.

A causa della piccola quantità richiesta del composto **2** si è deciso di sciogliere l'intera quantità sintetizzata (28,5 mg) in 10 mL di THF.

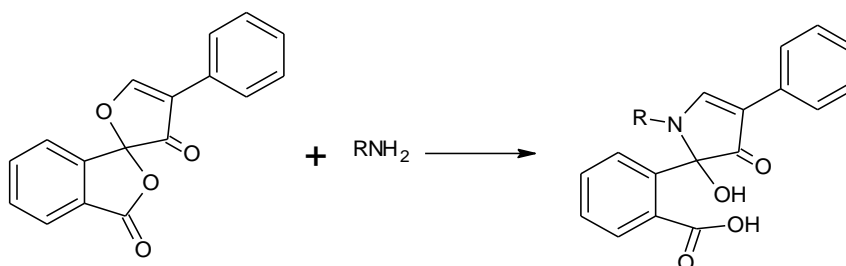
Da tale soluzione sono stati prelevati 5.32 μL (50 μM) e introdotti nella provetta di reazione.

Ad essa sono stati aggiunti 200 μL di DMSO, 100 μL di composto **1** (10 μM) e 700 μL della soluzione buffer Diels-Alder a pH=6. La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a 37°C per una notte.

4.7 Test fluorescamina

La fluorescamina è un composto organico ciclico con due anelli collegati tra loro mediante un solo atomo di carbonio. Tale molecola non è fluorescente ma se reagisce con ammine primarie dà origine ad un composto che ha un massimo di assorbimento a 391 nm e un massimo di fluorescenza a 480 nm.

Viene perciò usata come reagente per la determinazione di ammine.



Misurando quindi l'emissione di un campione a cui sia stata aggiunta della fluorescamina, e confrontando il risultato ottenuto con un'opportuna retta di calibrazione, è possibile quindi ottenere una misura della quantità di ammine primarie presenti nel campione. La retta di taratura è stata costruita utilizzando la propilammina come composto di riferimento. Quantità crescenti di propilammina sono state fatte reagire a 25 °C con un eccesso di fluorescamina, in una soluzione contenete tampone borato 0.5 M a pH 9, e di ciascun campione è stata misurata l'intensità di fluorescenza a 480 nm.

È stata poi costruita una retta di calibrazione riportando in un grafico l'intensità di fluorescenza misurata in funzione della concentrazione di propilammina.

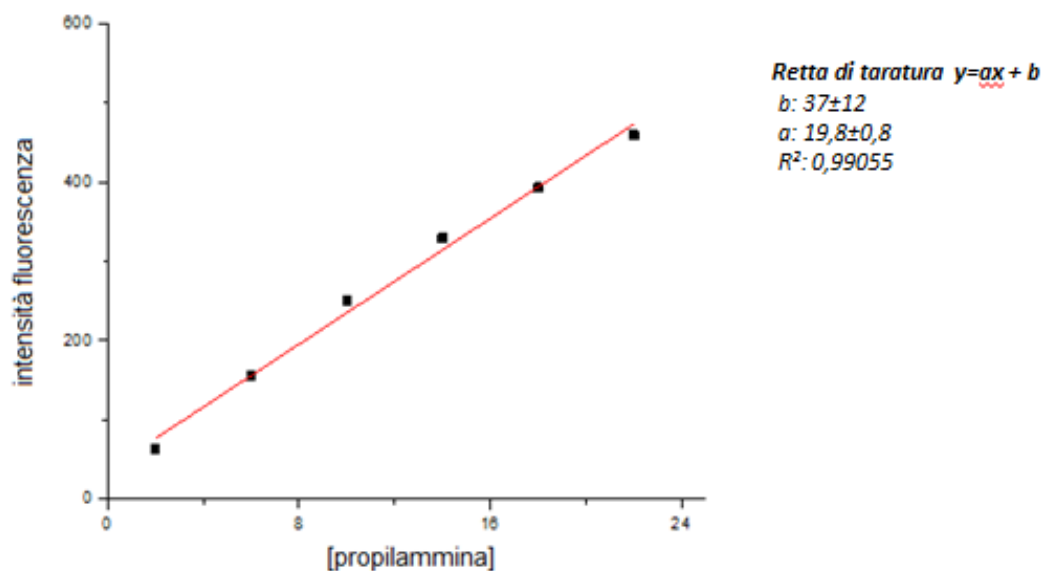
Sono stati quindi preparati per la retta di taratura le seguenti soluzioni:

- Una soluzione tampone borato 0.05 M a pH 9:
1.90 g di $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ sono stati sciolti in 100 mL di H_2O milliQ, si aggiunge qualche goccia di HCl concentrato per ottenere un pH di 9.
- Una soluzione di propilammina 0.1 mM in H_2O milliQ.
- Una soluzione di fluorescamina 1 mM in DMSO (deve essere preparata poco prima dell'utilizzo).

All'interno di cuvette in quarzo da 2 mL con cammino ottico di un centimetro si preparano diversi campioni contenenti quantità crescenti di propilammina secondo le composizioni riportate in tabella.

Tampone borato 0.05 M pH 9 (μL)	H ₂ O milliQ (μL)	Soluzione propilammina (μL)	Soluzione fluorescamina (μL)	Concentrazione propilammina (μM)
800	760	40	400	2
800	680	120	400	6
800	600	200	400	10
800	520	280	400	14
800	440	360	400	18
800	360	440	400	22

I campioni vengono preparati aggiungendo i vari componenti nell'ordine riportato in tabella, perciò nella cuvetta si inserisce per ultima la fluorescamina, si registra lo spettro di emissione e si legge l'intensità di fluorescenza a 485 nm ($\lambda_{ecc} = 390$ nm). Si costruisce una retta di taratura riportando in ascissa la concentrazione di propilammina e in ordinata l'intensità di fluorescenza letta a 485 nm.



Successivamente si prepara una cuvetta contenente 400 μL di tampone borato 0.05 M a pH 9, 350 μL di H₂O milliQ, 50 μL di soluzione di NP e infine 200 μL della soluzione 1 mM di fluorescamina in DMSO.

Al fluorimetro si registra lo spettro di emissione e si legge l'intensità di fluorescenza a 475 nm ($\lambda_{ecc} = 390$ nm) dalla quale, utilizzando la retta di taratura, si ricava la concentrazione dei gruppi amminici presenti sulla superficie della particella.

Campione	[NH₂] campione μM	[NH₂] teoriche μM	% funzionalizzazion e
NP	A	B	C

Calcoli per ricavare:

A: la concentrazione di gruppi amminici presenti nel campione si calcolano sostituendo all'equazione della retta di taratura l'intensità di fluorescenza misurata del campione. In questo modo si ricava la concentrazione presente nella cuvetta e per corrispondenza si ricava la concentrazione del campione.

B: la concentrazione teorica si ricava considerando la quantità di PEG NH₂ utilizzati nella sintesi.

$$[NH_2]_{\text{teoriche}} = \frac{3.5 \text{ g}}{3638.4} \cdot \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{NP}}}$$

C: la percentuale di funzionalizzazione si ottiene per proporzione tra i valori di concentrazione ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ L. Brannon-Peppas, **Polymers in Controlled Drug Delivery**, “Med. Plast. Biomater. Mag” (1997).
- ² S.D. Caruthers, s. A. Wickline, G. M. Lanza, **Nanotechnological applications in medicine**, “Current Opinion in Biotechnol”, Vol. 18, 26-30 (2007).
- ³ Xueyan Dong et al., **Characterization and antioxidant activity of bovine serum albumin and sulforaphane complex in different solvent**, “Journal of Luminescence”, Vol. 146, 351-357 (2014).
- ⁴ Röcker et al., **A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles**, “Nature Nanotechnology”, Vol. 4, 577-580 (2009).
- ⁵ Ferrer L. M. et al., **The Conformation of Serum Albumin in Solution: A Combined Phosphorescence Depolarization-Hydrodynamic Modeling Study**, “Biophysical Journal”, Vol. 80, 2422-2430 (2001).
- ⁶ Bonomi R. et al., **Assessment of the morphology of mixed SAMs on Au nanoparticles using a fluorescent probe**, “Chem. Commun.”, Vol. 47, 445-447 (2011).
- ⁷ Silvers L. A. et al., **Functional aliphatic polyesters and nanoparticles prepared by organocatalysis and orthogonal grafting chemistry**, “J. of Polymer Science”, Vol. 50, 3517-3529 (2012).
- ⁸ Alexander K. Tucker-Schwartz et al., **Thiol-ene Click Reaction as a General Route to Functional Trialkoxysilanes for Surface Coating Applications**, “J. Am. Chem. Soc”, Vol. 133, 11026-11029 (2011).
- ⁹ Vassilikogiannakis G. et al., **Using water, light, air and spirulina to access a wide variety of polyoxygenated compounds**, “The Royal Society of Chemistry”, vol. 14, 601-604 (2012).

- ¹⁰ Mancin et al, **Highly PEGylated silica nanoparticles: “ready to use” stealth functional nanocarriers**, “J. Mater. Chem.”, Vol. 20, 2780-2787 (2010).
- ¹¹ Mancin et al, **Targeted delivery of photosensitizers: efficacy and selectivity issues revealed by multifunctional ORMOSIL nanovectors in cellular systems**, “Nanoscale”, Vol. 5, 6106-6116 (2013).
- ¹² Vassilikogiannakis G. et.al., **Using water, light, air and spirulina to access a wide variety of polyoxygenated compounds**, The Royal Society of Chemistry, Vol. 14, 601-604 (2012).
- ¹³ Tom Brown et.al, **Rapid chemical ligation of oligonucleotides by the Diels–Alder reaction**, The Royal Society of Chemistry, Vol. 9, 232-235 (2011).
- ¹⁴ Robert J. Kerns et al., **Diversity-oriented chemical modification of heparin: Identification of charge-reduced N-acyl heparin derivatives having increased selectivity for heparin-binding proteins**, “Bioorg. Med. Chem”, Vol. 14, 2300-2313 (2006).
- ¹⁵ Benjamin F. Cravatt et.al., **Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition**, “J. Am. Chem. Soc.”, vol.125, 4685-4687 (2003).
- ¹⁶ Cristina Núñez, **Versatile Schiff-base hydrazone fluorescent receptors: Synthesis, spectroscopy and complexation studies**, “Inorganica Chimica Acta”, vol. 380, 40-49 (2012).
- ¹⁷ Michal Hocek et.al, **Direct Polymerase Synthesis of Reactive Aldehyde-Functionalized DNA and Its Conjugation and Staining with Hydrazines**, “Angew. Chem. Int. Ed.”, vol. 49, 1064 –1066 (2010).
- ¹⁸ Uwe Karst et.al, **N-Methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan as a New Reagent for Air Monitoring of Aldehydes and Ketones**, “Anal. Chem. “, vol. 17, 1893-1898 (1999).

-
- ¹⁹ Hiroaki Sawai et.al, **Bis(phenanthroline)-ethylenediamine conjugate displays excimer fluorescence upon binding with DNA**, “*C h e m . C o m m u n .*”, 1 3 8 6 – 1 3 8 7 (2004).
- ²⁰ Christopher W. Cairo et.al., **Detection of Cellular Sialic Acid Content Using Nitrobenzoxadiazole Carbonyl-Reactive Chromophores**, “*Bioconjugate Chem.*”, vol. 23, 363–371 (2012).
- ²¹ Susan L. Bane et.al., **4-Aminophenylalanine as a Biocompatible Nucleophilic Catalyst for Hydrazone Ligations at Low Temperature and Neutral pH**, “*Bioconjugate Chem.*”, vol. 22, 1954–1961 (2011).
- ²² Michael F. Greaney et.al., **Nucleophilic catalysis of acylhydrazone equilibration for protein-directed dynamic covalent chemistry**, “*Nature Chemistry*”, Vol 2, 490-497, (2010).
- ²³ Peter C. Dedon et.al., **Reaction of *cis*- and *trans*-2-Butene-1,4-dial with 2 ϕ -Deoxycytidine to Form Stable Oxadiazabicyclooctamine Adducts**, “*J. Am. Chem. Soc.*”, Vol. 123, 2664-2665 (2001).
- ²⁴ Annemieke Madder et.al., **Sequence Specific DNA Cross-Linking Triggered by Visible Light**, “*J. Am. Chem. Soc.*”, Vol. 134, 10737–10740 (2012).
- ²⁵ Lisa A. Peterson et.al., **Electrophilic Intermediates Produced By Bioactivation Of Furan**, “*Drug Metabolism Reviews*”, vol. 38, 615–626 (2006).