



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Scienze

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**STUDIO DELL'INTERAZIONE NANOPARTICELLA
D'ORO – BOVINE SERUM ALBUMIN ATTRAVERSO
FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY**

Relatore: Prof.ssa Camilla Ferrante

Correlatore: Dott.ssa Giovanna Albertin

Controrelatore: Prof. Fabrizio Mancin

Laureanda: Ilaria Molinaro

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

**A papà, mamma, Silvia
e Giovanni**

INDICE

INTRODUZIONE	7
CAPITOLO1: PRESUPPOSTI TEORICI	9
1.1 Nanoparticelle d'oro e loro proprietà ottiche.....	9
1.2 Nanoparticelle in applicazioni biomediche.....	11
1.3 Protein-corona.....	12
1.4 Bovine Serum Albumin.....	16
1.5 Fluorescence Correlation Spectroscopy.....	17
1.5.1 Brillanza.....	20
1.5.2 La funzione di correlazione.....	20
1.5.3 Caratteristiche della funzione di correlazione.....	21
1.5.4 Diffusione libera traslazionale.....	23
1.5.5 Triplet blinking.....	26
1.5.6 Diffusione libera rotazionale.....	27
1.5.7 Flusso.....	28
1.6 Fluorescence Correlation Spectroscopy di GNPs.....	29
1.7 Analisi del protein-corona per nanoparticelle metalliche mediante varie tecniche spettroscopiche.....	31
CAPITOLO2: PARTE SPERIMENTALE	39
2.1 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle d'oro.....	39
2.1.1 UV-Vis.....	39
2.1.2 Dynamic Light Scattering e Z-Potential.....	40
2.2 Set-up ottico per l'imaging confocale e misure di FCS.....	41
2.3 Eccitazione mediante un processo di assorbimento a due fotoni.....	44
2.4 Canali microfluidici: preparazione e funzionalizzazione.....	46
2.4.1 PDMS.....	47
2.4.2 Preparazione dei canali microfluidici.....	47
2.4.3 Funzionalizzazione dei canali microfluidici.....	49
CAPITOLO3: RISULTATI E DISCUSSIONE	51
3.1 Misure preliminari per la calibrazione del set-up.....	51
3.2 Misure FCS di GNPs in acqua.....	55
3.2.1 Eccitazione delle GNPs a varie potenze.....	55
3.2.2 Calibrazione del volume focale mediante eccitazione a due fotoni della RodaminaB.....	57
3.2.3 Determinazione del raggio idrodinamico delle GNPs in acqua.....	59
3.3 Stima delle viscosità delle soluzioni a diverse concentrazioni di BSA.....	62
3.3.1 Misure FCS.....	62
3.3.2 Letteratura.....	65
3.4 Misure FCS di GNPs e BSA.....	67
3.5 Misure FCS in flusso.....	71
3.5.1 Funzionalizzazione dei canali.....	72
3.5.2 Considerazioni relative alle misure in flusso.....	74
CONCLUSIONI	79
APPENDICE: TEORIA DI MIE	81
BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUZIONE

Uno dei più significativi sviluppi scientifici delle ultime decadi è attribuibile al design di nanosistemi multifunzionali per l'*imaging* cellulare e il *targeting* terapeutico^[1].

A partire dagli anni '90 i ricercatori hanno sintetizzato diversi tipi di nanoparticelle, che si distinguono per composizione chimica, forma e proprietà chimico-fisiche. Tra queste molto lavoro è stato dedicato allo sviluppo di nanosistemi a partire dai metalli nobili, come l'oro^[2]. Le nanoparticelle d'oro sono nanomateriali versatili di straordinario interesse, attribuibile alle loro peculiari proprietà ottiche, in particolare alla presenza dello spiccato assorbimento associato alla risonanza plasmonica di superficie, e alle promettenti applicazioni previste in campo biomedico, a partire dal *sensing* chimico fino all'*imaging* nel trattamento del cancro e nel *drug delivery*^[3]. Recenti studi infatti hanno avvalorato il loro uso in varie tecniche sia di diagnosi sia di terapia del cancro^[4]. A tal proposito, uno degli aspetti più critici e ancora da indagare nel dettaglio riguarda il loro destino quando interagiscono con fluidi biologici e sistemi cellulari. In questi ambienti i nanosistemi possono da un lato modificare le loro proprietà dimensionali e superficiali, e di conseguenza variare le loro proprietà funzionali, ma dall'altro possono indurre anche processi di modifica genetica e citotossicità dopo la loro internalizzazione nelle cellule. In particolare, l'esposizione ad ambienti biologici, caratterizzati da un'elevata forza ionica e da una varietà di sistemi proteici, possono portare ad aggregazione delle nanoparticelle, con modifica delle proprietà di assorbimento plasmonico e conseguente emissione, e adsorbimento di proteine sulla superficie delle nanoparticelle, che comporta una forte variazione nell'affinità delle stesse verso substrati cellulari.

L'intento di questa tesi consiste nello studio, mediante *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, dell'interazione esistente tra le nanoparticelle d'oro e l'albumina, una delle proteine più abbondanti nel plasma sanguigno^{[5][6]}.

Questa tecnica spettroscopica, sensibile alla singola molecola, misura le fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza indotte da alcuni processi fotofisici del fluoroforo. Fluttuazioni del segnale di fluorescenza si osservano quando le nanoparticelle d'oro attraversano il volume focale in seguito ad un processo di eccitazione ottica con impulsi laser ad alta intensità nella regione del vicino IR. Il caratteristico tempo di diffusione delle particelle è correlato al loro raggio idrodinamico, per cui l'eventuale aumento delle dimensioni della nanoparticella d'oro, dovuto all'interazione con l'albumina, si riflette nella velocità di transito della specie fluorescente nel volume focale. Sulla base di ciò è stato possibile studiare più dettagliatamente le caratteristiche del processo di interazione tra l'albumina e le nanoparticelle d'oro.

Il lavoro svolto è descritto nel seguente modo.

Il Capitolo1 tratta lo stato dell'arte relativo alle proprietà e applicazioni delle nanoparticelle d'oro e alla definizione e caratterizzazione del protein-corona. Nello stesso capitolo è descritta la teoria di *Fluorescence Correlation Spectroscopy* e i processi analizzabili attraverso questa tecnica. Infine viene riportata una panoramica delle analisi, effettuate mediante varie tecniche sperimentali, del protein-corona che si forma sulle nanoparticelle metalliche.

Il Capitolo2 presenta brevemente il procedimento di sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro sintetizzate in questo lavoro. Il capitolo descrive inoltre l'apparato strumentale impiegato per le misure di *fluorescence correlation spectroscopy*, riportando l'attenzione sui differenti processi di eccitazione ottica a uno e due fotoni. Inoltre viene descritta la preparazione e funzionalizzazione dei canali microfluidici necessari per le misure in flusso.

Il Capitolo3 riporta le misure di *fluorescence correlation spectroscopy* partendo da una definizione delle procedure necessarie per l'ottimizzazione e la calibrazione dell'esperimento, e proseguendo con la descrizione degli esperimenti effettuati in condizioni statiche con le nanoparticelle d'oro in acqua e in presenza di soluzioni a concentrazione variabile di albumina bovina (Bovine Serum Albumin). A fine capitolo sono presenti alcune misure preliminari e le conseguenti considerazioni relative alle misure di *fluorescence correlation spectroscopy* in flusso per nanoparticelle di oro in presenza ed assenza di BSA.

CAPITOLO1: PRESUPPOSTI TEORICI

1.1 Nanoparticelle d'oro e loro proprietà ottiche

Le particelle metalliche di dimensioni nanometriche sono studiate principalmente per le loro innovative proprietà nel campo dell'ottica, dell'elettronica e della catalisi^{[7][8]}.

In presenza di un campo elettromagnetico oscillante, gli elettroni di conduzione della nanoparticella (NP) metallica sono sottoposti ad oscillazioni coerenti collettive, note come "oscillazioni plasmoniche" o "plasmoni" (Figura1.1).

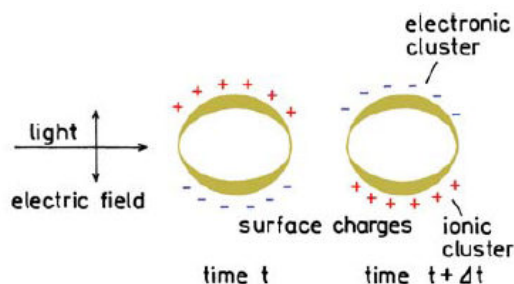


Figura1.1 Schema di eccitazione delle oscillazioni plasmoniche di dipolo mediante radiazione elettromagnetica.

Questo processo, definito "risonanza plasmonica localizzata di superficie" (LSPR), è risonante ad una specifica frequenza della radiazione elettromagnetica incidente, funzione della composizione, forma e dimensione della nanostruttura.

Questa oscillazione elettronica può essere visualizzata come un fotone, confinato nella dimensione della nanostruttura, generante un intenso campo elettrico attorno alla particella. Una delle più importanti proprietà della LSPR deriva dalla possibilità di variare la posizione del picco plasmonico modificando *dimensione, forma, composizione* della nanostruttura e caratteristiche dielettriche del *mezzo* in cui le nanostrutture sono disperse. Dato che le nanoparticelle hanno un rapporto area superficiale/volume elevato, la frequenza plasmonica è molto sensibile alla natura dielettrica della sua interfaccia con il mezzo. Tale peculiarità è ampiamente sfruttata in diverse applicazioni, anche in campo biomedico^{[9][10]}.

Le proprietà di assorbimento ottico delle NPs sferiche sono state modellizzate attraverso la **teoria di Mie** (Appendice). Secondo questa teoria, le particelle più piccole presentano singole risonanze, con carattere dipolare, le cui risposte ottiche si possono descrivere attraverso i termini a più basso ordine; quelle di diverse centinaia di nanometri esibiscono LSPR multipli corrispondenti ai modi plasmonici di più alto ordine^[5].

Le nanoparticelle d'oro (GNPs) di dimensioni di circa 10 nm esibiscono un picco plasmonico a 520 nm. L'aumento delle *dimensioni* delle nanosfere oppure la loro aggregazione comporta l'accoppiamento dei plasmoni di superficie con conseguente spostamento verso il rosso delle frequenze plasmoniche, accompagnato da un allargamento del picco. Ad esempio, come

mostrato nello spettro di assorbimento in Figura 1.2, il picco LSPR delle GNPs di 40nm si osserva a circa 530 nm.

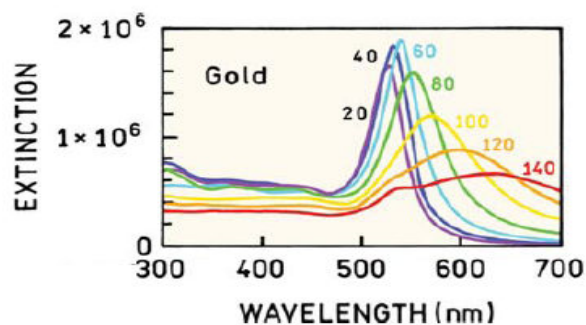


Figura 1.2 Spettri di estinzione di soluzioni colloidali d'oro.

In molte applicazioni biologiche, soprattutto nei studi in vivo, è preferibile lavorare nella regione spettrale del vicino IR (NIR), 650-900nm. Questa zona spettrale, chiamata "*finestra trasparente*", è caratterizzata da un'elevata trasmissione nei tessuti molli per cui, a causa di una riduzione dell'assorbimento da parte di emoglobina (<650nm) e acqua (>900nm) nel sangue e dello scattering da parte dei tessuti, la luce può penetrare in profondità. Picchi LSPR nella regione NIR si possono ottenere solo da GNPs non sferiche: rods, rices, stars oppure strutture hollow come shell e cage. GNPs sferiche, infatti, presentano picchi LSPR singoli limitati alla regione visibile^{[4][10]}.

Nel caso dei nanorods, si osservano due bande plasmoniche, risultanti dalle oscillazioni elettroniche lungo i due assi. La banda plasmonica "trasversale", a circa 520nm, corrisponde all'oscillazione lungo l'asse più corto della particella, quella "longitudinale", a lunghezze d'onda nel NIR, è definita dal rapporto lunghezza/larghezza^{[10][11][12]}.

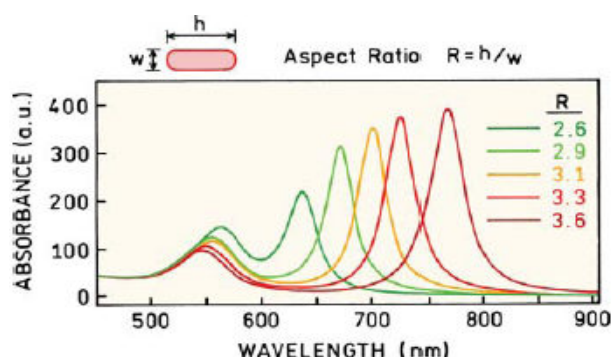


Figura 1.3 Spettro di assorbimento di nanorods d'oro caratterizzato da diversi rapporti lunghezza/larghezza.

GNPs sferiche (forma a più bassa energia superficiale)^[2], ad esempio, si possono preparare mediante riduzione di un sale metallico in presenza di un *capping agent* e di un agente stabilizzante. Quest'ultimo, adsorbendosi o legandosi chimicamente al nucleo metallico,

previene l'aggregazione^[13]. Il **metodo di Turkevich** (1951) consiste, per l'appunto, nella riduzione di acido tetracloroaurico da parte di citrato per produrre GNPs di circa 15nm di diametro. Il metodo di Brust (1994) permette di sintetizzare GNPs più piccole trasferendo gli ioni d'oro da una soluzione acquosa ad una fase organica mediante un agente di trasferimento di fase, per poi effettuare la riduzione con boroidruro^[2].

Le nanoparticelle dotate di risonanze plasmoniche stanno acquisendo un crescente rilievo nell'*imaging* e nelle terapie biomediche perché:

- possiedono elevate sezioni d'urto di estinzione (10^4 - 10^5 volte superiori rispetto ai *dyes* fluorescenti);
- sono fotostabili e non vanno incontro a *photobleaching*, consentendo l'utilizzo di energie di eccitazione maggiori e per tempi d'irraggiamento maggiori;
- possono esibire risonanze plasmoniche dal visibile alle lunghezze d'onda del NIR;
- la luce assorbita può essere convertita in calore per l'uso in terapia fototermica;
- possono essere facilmente coniugate a piccole molecole utili per il *targeting* molecolare oppure a leganti di riconoscimento per ottenere elevate specificità di binding^{[9][5][14]}.

In particolare la scelta delle GNPs si basa:

1. sulla disponibilità di vari metodi semplici di sintesi caratterizzati da un attento controllo di dimensione e forma,
2. sulla facilità di modificarne la superficie,
3. sull'abilità di rivelare il loro accumulo mediante varie tecniche analitiche quantitative,
4. sulla biocompatibilità e bassa citotossicità,
5. sulla maggior stabilità chimica rispetto a nanoparticelle fatte con altri materiali.

Date queste proprietà con le GNPs, sono stati effettuati diversi studi per investigare l'influenza delle loro dimensione/forma/chimica superficiale nell'interazione biologica (accumulazione in citoplasma, lisosomi o nuclei nelle colture cellulari)^[2]. Varie metodologie vengono utilizzate per la rivelazione di GNPs in vari contesti biologici (mare, suolo, larve): Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS), tecnica analitica capace di rilevare 60 parti per trilione di atomi, spettroscopia UV-visibile o TEM^{[1][2][15]}.

1.2 Nanoparticelle in applicazioni biomediche

Le NPs metalliche possiedono promettenti proprietà sfruttate in applicazioni biomediche e sono usate come sistemi per il *targeting* specifico, agenti per terapie fotodinamiche o per il *drug delivery*^{[1][16]}. Preliminarmente alla studio dettagliato dell'interazione tra NP e sistema cellulare, risulta essenziale comprendere lo stato delle nanoparticelle una volta aggiunte alle

colture cellulari per poterle introdurre in organismi più complessi, in una seconda fase.

E' stato dimostrato che le NPs metalliche inserite in un ambiente biologico possono andare incontro a diversi processi, come ad esempio l'aggregazione in presenza di sali o legarsi a ponte a biomolecole per la perdita di *capping agents*, soprattutto a basse concentrazioni, oppure ricoprirsi di biomolecole, ad elevate concentrazioni.

L'aggregazione delle NPs o l'assorbimento di proteine sulla loro superficie possono portare a drammatiche variazioni di dimensioni, forma, carica superficiale e idrofobicità delle nanoparticelle, e di conseguenza sono in grado di influenzare stati di aggregazione, velocità di sedimentazione, assorbimento cellulare e la loro citotossicità. L'interazione specifica nanoparticella-proteina è stata definito "**protein-corona**". La sua natura dinamica influenza la possibilità e il grado di internalizzazione cellulare della NP.

1.3 Protein-corona

L'interfaccia nano-bio comprende le interazioni chimico-fisiche dinamiche, le cinetiche e le termodinamiche di scambio tra le superfici di nanomateriali e le superfici dei componenti biologici, quali proteine, membrane, fosfolipidi, organelli, vescicole, DNA e fluidi biologici^[17]. Risulta essenziale comprendere le forze dinamiche coinvolte e i componenti molecolari che determinano queste interazioni. Essendo impossibile descrivere nel dettaglio tutte le interazioni bio-chimico-fisiche che hanno luogo all'interfaccia, ci si limita a esplorarle sulla base dei concetti già noti.

L'interfaccia nano-bio (Figura 1.4) è definita da tre componenti interagenti:

- la superficie della nanoparticella, le cui caratteristiche sono determinate dalla sua composizione chimico-fisica,
- l'interfaccia solido-liquido che interagisce con il mezzo circostante,
- la zona di contatto tra l'interfaccia solido-liquido e i substrati biologici.

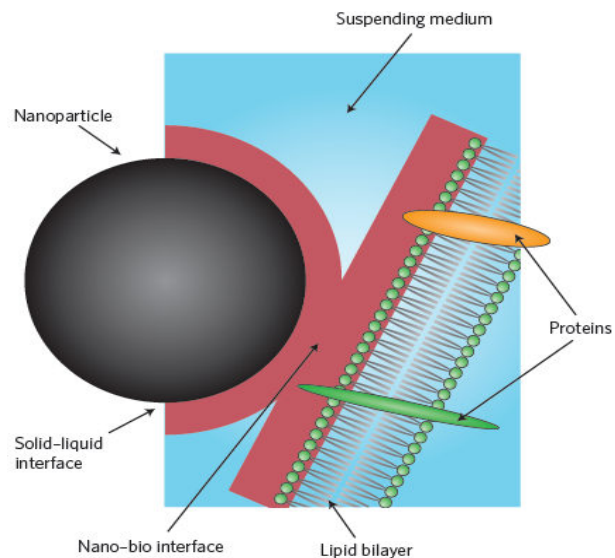


Figura 1.4 Rappresentazione dell'interfaccia tra una nanoparticella e un *bilayer* lipidico.

In un determinato mezzo le caratteristiche più importanti della nanoparticella che determinano le proprietà della superficie sono: la *composizione chimica* del materiale, la *funzionalizzazione* della superficie, *forma* e *angolatura* della curvatura, *porosità* e *cristallinità* superficiale, *eterogeneità*, *asperità* e *bagnabilità*.

Altre proprietà, come carica superficiale effettiva, aggregazione particellare, stato di dispersione, stabilità/biodegradabilità, caratteristiche di dissoluzione, idratazione, sono determinate dalle caratteristiche del mezzo in cui le nanoparticelle sono disperse (ad esempio: forza ionica, pH, temperatura, presenza di grandi molecole organiche o detergenti).

Le interazioni tipiche dell'interfaccia particella-mezzo includono forze a lungo raggio, derivanti da interazioni attrattive di *van Der Waals* e da interazioni elettrostatiche repulsive del doppio strato elettrico, come pure forze a corto raggio, originanti da interazioni steriche, di carica e del solvente.

L'interfaccia metastabile solido-liquido è sottoposta ad un ambiente inomogeneo e dinamico che contribuisce alla formazione dell'interfaccia nano-bio. Questa non omogeneità deriva dalle differenti distribuzioni e abbondanze di proteine, lipidi, strutture glicosilate negli ambienti biologici e comporta una difficoltà nello studio di tutte le possibili interazioni.

Il plasma è un fluido complesso contenente più di 3700 differenti proteine, molte di queste presenti a bassissime abbondanze relative^[18]; la quantità relativa di queste proteine varia anche all'interno di una popolazione e anche nello stesso individuo nell'arco della giornata^[19].

Le proteine del plasma partecipano al trasporto molecolare oppure regolano i diversi eventi biologici, fornendo biomarcatori per la diagnosi e il trattamento di malattie^[18].

Quando le NPs entrano nei fluidi biologici subiscono delle notevoli variazioni. La formazione del **protein-corona** è una delle più importanti alterazioni^[20]. Si assiste infatti ad uno

spontaneo ricoprimento delle NPs da parte delle proteine contenute nel mezzo biologico^{[21][19]} che porta ad una variazione della prima zona di contatto della nanostruttura con i diversi sistemi cellulari^[21]. Il processo di formazione del protein-corona è costituito da una prima fase definita *soft* corona, che ha luogo nelle prime fasi di interazione tra la NP e la proteina ed è pertanto di natura transiente, e da una seconda fase detta *hard* corona che è caratterizzata da interazioni più stabili tra NPs e proteine. Quest'ultima richiede del tempo per formarsi e definisce l'identità biologica finale della particella^{[20][22]}.

La composizione del protein-corona è determinata dalla concentrazione delle proteine presenti nel plasma, dalle costanti cinetiche e termodinamiche di *binding* di ciascuna proteina per una determinata NP^[23]. Lo strato superficiale di proteine può essere sottoposto a variazioni conformazionali portando all'esposizione di nuovi epitopi con possibili alterazioni delle loro funzioni^{[10][24]}. In presenza di siero tutte le NPs risultano cariche negativamente in quanto la maggior parte delle proteine esibisce proprietà debolmente anioniche in condizioni fisiologiche^[25].

E' stato verificato che la stabilità delle NPs, una volta entrate in contatto con un mezzo biologico, è mediata dalla repulsione sterica tra molecole adsorbite anziché da repulsione elettrostatica come prima dell'incubazione^[20].

I complessi nanoparticelle-leganti sono caratterizzati da stabilità temporali che variano a seconda del tipo di proteina e di particella. Esse sono comunque comprese tra microsecondi e giorni^[19] e possono essere valutate quantitativamente mediante le seguenti tecniche:

- cromatografia di esclusione di dimensioni
- spettroscopia di risonanza plasmonica di superficie (SPR)
- spettroscopia di fluorescenza
- calorimetria isoterma di titolazione (ITC)

Le cinetiche di associazione e di dissociazione NPs - proteine ed i contemporanei scambi con le proteine libere hanno un ruolo decisamente importante nell'indagine delle interazioni esistenti tra le NPs e le superfici biologiche e i recettori (Figura 1.5). Si possono quantificare parametri cinetici e termodinamici mediante SPR, ITC e cromatografia di esclusione dimensionale^[19].

La *natura superficiale* delle NPs (ad esempio idrofobicità, dimensione, raggio di curvatura, carica, *coating*) stabilisce quali biomolecole siano in grado di interagire con le particelle stesse mediando il loro accesso nelle cellule.

Anche la *dimensione* sembra essere un importante fattore nel determinare la composizione del protein-corona. E' stato riportato che, a parità di idrofobicità della NP, il maggior grado di

ricoprimento si osserva per le NPs più grandi, come se una maggiore curvatura della NP comportasse una riduzione dell'adsorbimento di biomolecole^[24].

Ulteriori studi confermano come la concentrazione delle proteine attorno alle nanoparticelle influenzi il *binding* stesso. Cedervall e altri dimostrarono che molte e differenti proteine del plasma si adsorbono spontaneamente sulla superficie delle NPs (Figura 1.6)^[10].

Gli stessi autori evidenziarono che Human Serum Albumin (**HSA**) e fibrinogeno, molto abbondanti nel plasma, dominano nell'adsorbimento sulla superficie della particella per brevi periodi temporali, a seguito dei quali sono rimpiazzati da proteine meno abbondanti ma con affinità superiori e cinetiche più lente.

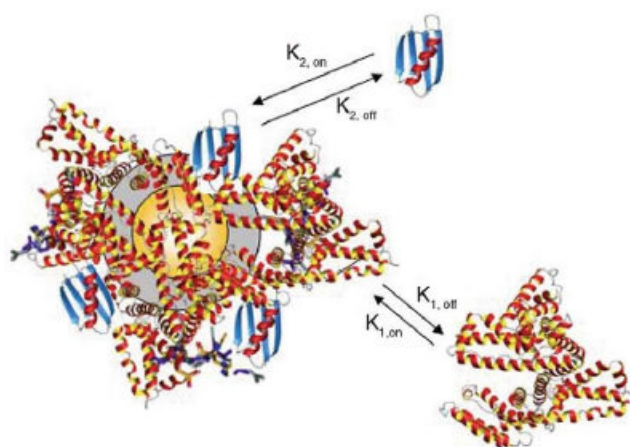


Figura 1.5 Processi di scambio e costanti di equilibrio relative al protein-corona di una nanoparticella.

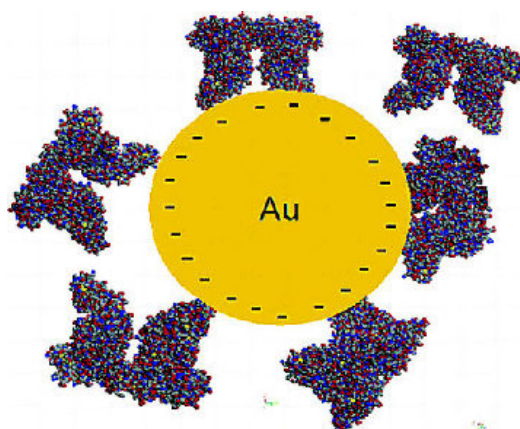


Figura 1.6 Protein-corona di Human Serum Albumin sulla GNP ricoperta di citrato.

Tuttavia, in un ambiente a minore concentrazione proteica, come ad esempio nei fluidi bronchiali e oculari, oppure quando l'area superficiale disponibile della NP è in largo eccesso rispetto alla quantità totale di proteine disponibili, le proteine con minore affinità (come l'albumina) domineranno nell'adsorbimento sulla superficie della particella^{[20][26]}.

E' interessante notare che, per albumina e fibrinogeno, i tempi di residenza sono più brevi

sulle NPs idrofobiche rispetto a quelle idrofiliche, mentre le NPs più idrofobiche sembrano esibire un grado maggiore di ricoprimento superficiale all'equilibrio^[19].

Le GNPs ricoperte con *PEG* (polietilenglicole) adsorbono sulle loro superfici una minore quantità di proteine, oltre a ridurre il *binding* non specifico, con conseguente differente biodistribuzione delle particelle e maggior tempo di permanenza nei tessuti tumorali^{[10][12][27]}. Queste NPs sono generalmente più stabili nelle soluzioni saline rispetto alle particelle non modificate^[27].

Al momento comunque non è stato stabilito un protocollo per poter controllare il numero esatto di molecole adsorbite per GNPs^[28].

Studi di caratterizzazione di vario genere delle interazioni proteine-NPs si possono effettuare mediante varie tecniche fotofisiche^[18]:

- assorbimento UV-Visibile,
- quenching di fluorescenza,
- dynamic light scattering (DLS),
- Z-potential,
- dicroismo circolare (CD),
- microscopia elettronica.

Questi metodi di misura permettono di determinare le seguenti proprietà basilari:

1. costanti di associazione delle proteine con le GNPs,
2. variazioni conformazionali delle proteine in seguito all'adsorbimento,
3. dimensioni delle NPs,
4. formazione di aggregati proteine-NPs,
5. spessore dello strato proteico sulla NP.

1.4 Bovine Serum Albumin

Bovine serum albumin (BSA) è l'albumina del siero bovino, altamente solubile e molto stabile. Si tratta di un trasportatore multifunzionale di molecole, per di più responsabile della regolazione della pressione osmotica colloidale del sangue^[29]. La sequenza di amminoacidi è identica per il 76% a quella della Human Serum Albumin (HSA).

Possiede una forma ellissoide allungata di dimensioni 14x4 nm e raggio assiale di circa 3,5 nm (Figura 1.7)^{[30][31]}.

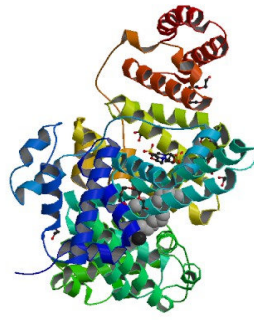


Figura 1.7 Bovine serum albumin.

Il peso molecolare è pari a 66,430 kDa con 583 amminoacidi in una singola catena polipeptidica. BSA possiede tre domini, 17 ponti disolfuro, un solo gruppo -SH (che gli consente di formare dimeri attraverso legame covalente) e due residui di triptofano, Trp213 posizionato nel core idrofobico della proteina e Trp134 localizzato sulla superficie della stessa^{[32][33][34]}.

L'albumina possiede 60 lisine, amminoacidi carichi positivamente, le quali possono intrattenere interazioni elettrostatiche con altre strutture cariche negativamente presenti a pH fisiologico. Di particolare importanza è la cisteina, che è altamente reattiva verso i cationi e le superfici metalliche. Il binding metallo-proteine, infatti, agisce principalmente attraverso i gruppi -SH dei residui di cisteina^{[20][22]}.

E' stato osservato che BSA, nonostante sia carica negativamente^[23], si lega spontaneamente alla superficie delle GNPs ricoperte di citrato. Il meccanismo di questo processo non è ancora stato chiarito^[35].

1.5 Fluorescence Correlation Spectroscopy

Fluorescence Fluctuation Spectroscopy (FFS) è il nome generalizzato per indicare una serie di metodi spettroscopici sensibili alla singola molecola basati sulla misura e sulla valutazione delle *fluttuazioni* dell'intensità di fluorescenza indotte da alcuni processi fotofisici del tracciante fluorescente^{[36][37][38]}.

Ciascun processo in grado di influenzare l'intensità di fluorescenza di queste molecole (variazioni delle posizioni all'interno del sistema di misura, della loro fotofisica, variazioni conformazionali oppure reazioni chimiche) porta ad una variazione temporale del segnale di fluorescenza, che segue spesso un andamento stocastico.

FCS consente la misura di costanti cinetiche anche quando il sistema si trova all'equilibrio, solamente nei casi in cui i processi reversibili causano variazioni spettrali. I dati ottenuti mediante FCS contengono informazioni circa le costanti di reazione in quanto una reazione

all'equilibrio procede in entrambe le direzioni con conseguente continua fluttuazione delle proprietà spettrali^[38]. La frequenza temporale di queste fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza è associata ai processi fisici sottostanti e ai relativi parametri (coefficienti di diffusione o costanti cinetiche fotofisiche).

L'idea chiave di questa tecnica spettroscopica è di valutare le fluttuazioni di intensità in maniera tale da poter determinare proprio questi parametri.

La tecnica prevede l'uso di un sistema laser altamente focalizzato per eccitare il fluoroforo in soluzione acquosa e nel rilevare le fluttuazioni di intensità di fluorescenza rispetto al loro valore medio. Se la concentrazione delle molecole fluorescenti in soluzione e il volume di eccitazione sono sufficientemente piccoli (dell'ordine del femtolitri, fL), in modo tale che in media solo poche molecole si trovino all'interno del volume di rivelazione, il risultante segnale di fluorescenza fluttuerà significativamente rispetto al valore medio.

Fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza si manifestano quando le particelle fluorescenti entrano ed escono dal volume focale, a causa del moto browniano, del flusso, delle reazioni chimiche, dei processi fotochimici o fotofisici, ecc... Lo studio delle caratteristiche temporali delle fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza permettono l'analisi quantitativa di tali processi (Figure 1.8 e 1.9)^[37].

Il numero di molecole contenute, in ogni momento, all'interno del volume focale è governato dalla distribuzione Poissoniana, pertanto, la radice della fluttuazione quadratica media del numero di particelle N è data da^[39]:

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N \rangle)^2\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}$$

Dato che le fluttuazioni relative diventano più piccole all'aumentare del numero delle particelle misurate, è importante minimizzare il numero di molecole nel volume focale.

A concentrazioni troppo elevate (tipicamente $\gg 10^{-8}$ M), infatti, il contributo proveniente dai fotoni correlati, che scala con il numero N di molecole all'interno del volume di rivelazione, diviene molto piccolo rispetto al contributo dei fotoni non-correlati provenienti dalle differenti molecole, che scala invece con N^2 . Per evitare che il segnale di fluorescenza risulti meno intenso del background residuo, è tuttavia necessario che le molecole contenute nel volume focale non siano troppo poche.

La media temporale del numero di particelle dovrebbe essere compresa tra 0,1 e 1000 (Figura 1.10). Nei moderni set-up sperimentali per FCS la dimensione del volume focale cade nell'intervallo 0,1-1,0 fL. Ciò restringe l'intervallo di concentrazioni consentite a sub-nanomolare ($< 10^{-9}$ M) e micromolare (10^{-6} M), rendendo la tecnica altamente sensibile per misure con basse concentrazioni di analita.

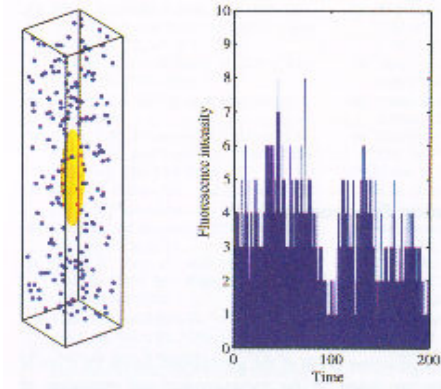


Figura 1.8 Tipico esperimento FCS. Le molecole fluorescente (puntini blu) diffondono dentro/fuori il piccolo volume di rivelazione (regione gialla) con conseguente fluttuazione dell'intensità di fluorescenza (a destra).

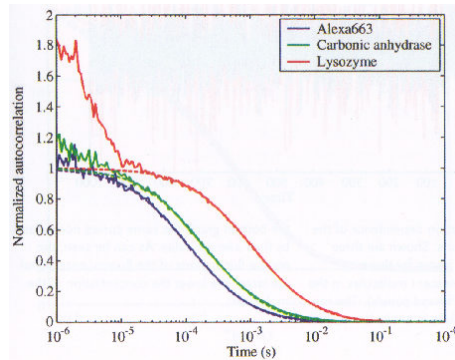


Figura 1.9 Tipiche curve FCS. I tre decadimenti temporali di ACF riflettono i differenti coefficienti di diffusione dei campioni, ovvero le loro differenti dimensioni molecolari.

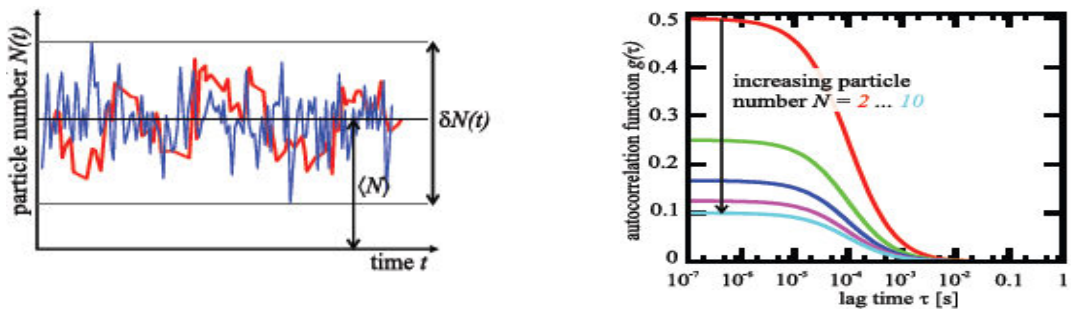


Figura 1.10 Fluttuazioni del numero di molecole fluorescenti presenti nel volume focale relativo a due gruppi di particelle con differenti coefficienti di diffusione: $D_{\text{blu}} > D_{\text{rosso}}$ (sinistra). Andamento delle curve FCS all'aumentare del numero di particelle fluorescenti nel volume osservato (destra).

1.5.1 Brillanza

Il dato registrato è tipicamente il numero di fotoni contati in un determinato intervallo temporale. L'intensità dipende dal numero di fotoni provenienti da ciascun fluoroforo in un preciso periodo temporale. Per FCS è conveniente utilizzare un parametro chiamato "brillanza", che è: $B=q\sigma Q$ dove q è l'efficienza quantica di rivelazione dei fotoni emessi, σ è la cross-section di assorbimento e Q è la resa quantica di emissione del fluoroforo^{[38][40]}.

La brillanza è pertanto definita come il numero di fotoni per secondo provenienti da un singolo fluoroforo osservati da un particolare set-up ottico.

Essa influenza il rapporto S/N della misura e quindi l'abilità di vedere il fluoroforo rispetto al background.

A differenza della resa quantica, la brillanza non è una proprietà molecolare del fluoroforo, ma dipende dalle precise condizioni ottiche, quali intensità della luce, efficienza di collezione da parte dello strumento e efficienza di conteggio dei fotoni del detector. Pertanto l'ottimizzazione dell'efficienza di collezione dei fotoni si realizza scegliendo composti fluorescenti fotostabili con elevata resa quantica e utilizzando rivelatori ad elevata efficienza quantica^[41].

1.5.2 La funzione di correlazione

Per ogni tempo t della misura si può misurare la fluttuazione della fluorescenze definita come:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle, \text{ dove } F \text{ è l'intensità di fluorescenza}^{[37]}.$$

Un efficiente mezzo per lo studio delle fluttuazioni dell'intensità sono le funzioni di correlazione definite come:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \tau \geq 0$$

$\langle \dots \rangle$ denota una media temporale sui tempi t e τ è definito come *lag time*.

Se i segnali di fluorescenza F sono registrati da un solo *detector*, la precedente equazione corrisponde alla **funzione di autocorrelazione** (ACF)^[38].

Quando lo stesso segnale è inviato a due *detectors* nello stesso intervallo spettrale si ottiene una **funzione di pseudo cross-correlazione** attraverso la quale è possibile rimuovere eventuali artefatti introdotti dal *detector*, quali l'*afterpulsing* tipico di un *avalanche photodiode* (Figura 1.11) o le fluttuazioni della sorgente di luce. In questo testo, tale funzione verrà chiamata per semplicità funzione di cross-correlazione.

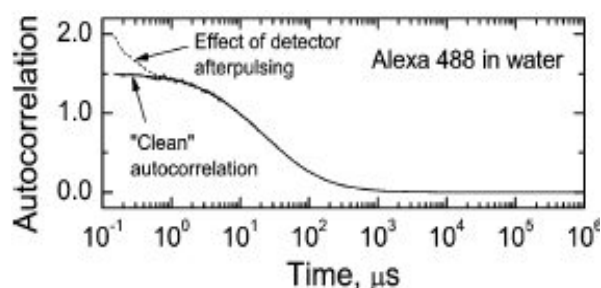


Figura 1.11 Effetto dell'afterpulsing del detector sulla forma della curva FCS e sua rimozione.

Qualora le fluttuazioni di intensità siano lente rispetto a τ , $F(t)$ e $F(t+\tau)$ saranno simili in grandezza e la funzione di correlazione è massima; viceversa, qualora siano veloci rispetto a τ , i valori di $F(t)$ e $F(t+\tau)$ saranno differenti e la relativa funzione di autocorrelazione decadrà più rapidamente a zero (Figura 1.12)^[38].

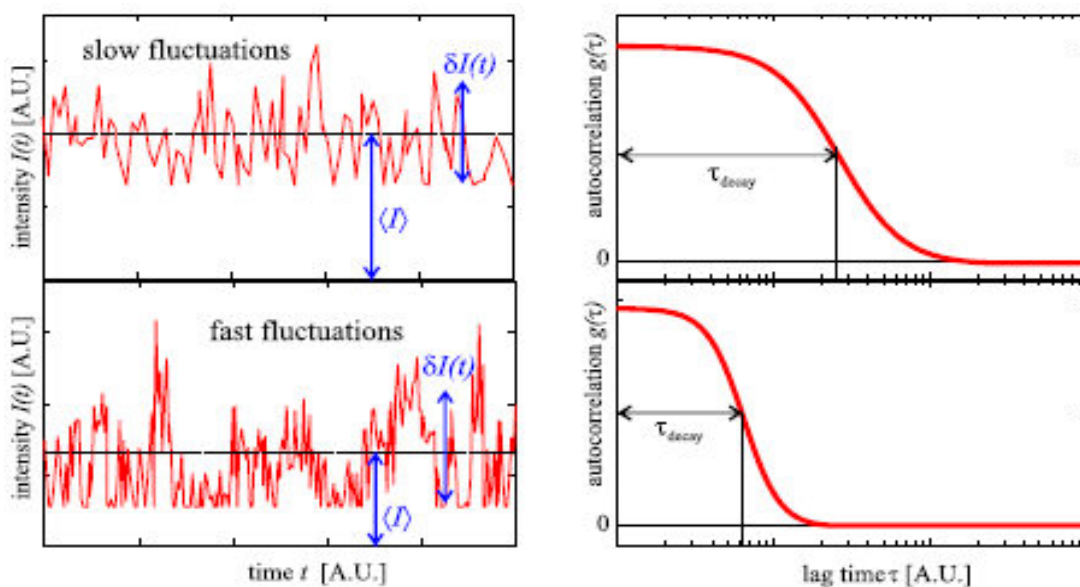


Figura 1.12 Fluttuazioni lente (in alto) e veloci (in basso).

Supponendo di avere una molecola posizionata nel centro del volume focale, si può immaginare che una sua continua eccitazione da parte della sorgente luminosa porti all'emissione di un gran numero di fotoni consecutivi di fluorescenza proveniente da questa stessa molecola; per questo sistema il segnale di fluorescenza risulterà altamente correlato nel tempo fino a quando la molecola, in seguito al fenomeno della diffusione, potrà uscire dal volume di rivelazione, e di conseguenza il segnale di correlazione decrescerà in funzione del tempo caratteristico di diffusione della molecola.

1.5.3 Caratteristiche della funzione di correlazione

La funzione di correlazione al tempo zero è per definizione la varianza normalizzata della fluttuazione del segnale di fluorescenza $\delta F(t)$. Combinando questa definizione con la statistica

Poissoniana, applicata ad un campione di poche molecole, risulta evidente come $G(0)$ corrisponda al reciproco del numero effettivo di molecole presenti nel volume di rivelazione:

$$G(0) = 1/\langle N \rangle$$

dove il numero effettivo di molecole, N , è determinato dalla concentrazione del fluoroforo e dal volume effettivo di rivelazione della fluorescenza:

$$\langle N \rangle = C V_{eff}$$

La particolare forma del volume di rivelazione dipende dalla geometria di eccitazione/rivelazione. Nel caso di rivelazione confocale, il volume di rivelazione della fluorescenza è approssimabile ad una ellissoide 3D Gaussiano. La dimensione del *volume efficace di emissione* (V_{eff}) è approssimata dalla relazione: $V_{eff} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$, dove r_0 è la semi-larghezza del volume focale nel piano xy e z_0 è la semi-altezza nel piano assiale.

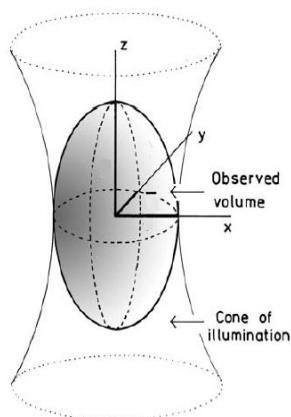


Figura 1.13 Volume di rivelazione approssimato ad una ellissoide.

Il decadimento temporale della funzione di autocorrelazione su diverse scale temporali, è determinato dalle differenti proprietà delle molecole fluorescenti. Il grafico in Figura 1.14 mostra alcuni dei più importanti processi che possono essere studiati mediante misure di FCS e verranno descritti più in dettaglio nei prossimi paragrafi.

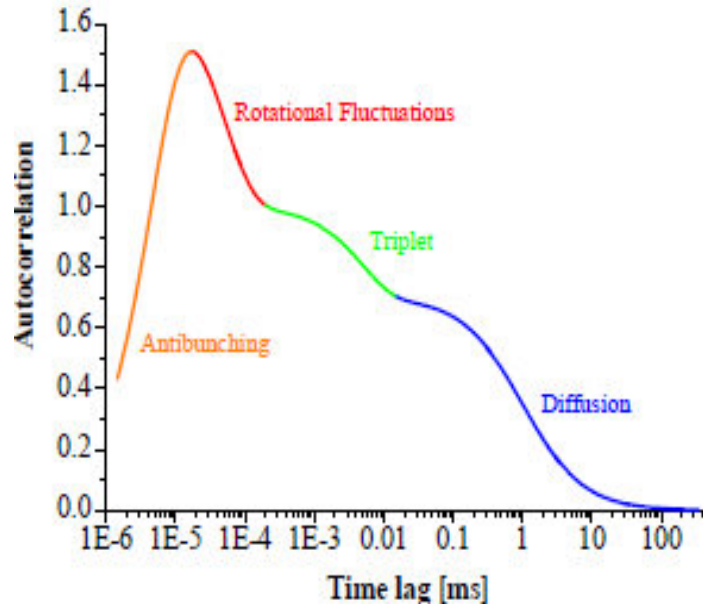


Figura 1.14 Scala temporale dei vari processi monitorati mediante analisi di correlazione.

1.5.4 Diffusione libera traslazionale

Uno dei più importanti processi indagati con la tecnica FCS è quello che coinvolge il moto diffusivo libero per cui una molecola può entrare e uscire dal volume focale con un tempo caratteristico definito dal coefficiente di diffusione D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)^{[37][39]}. Esso è dipendente dalle dimensioni e dal peso della particella che si muove in soluzione e descrive quanto rapidamente può muoversi una particella durante il moto diffusivo. Maggiore è il coefficiente di diffusione, più velocemente si muove la particella^[42].

Se si suppone che la molecola possa diffondere liberamente nelle tre direzioni spaziali, la probabilità di trovare la molecola ad una distanza $\vec{\rho}$ dalla sua posizione iniziale \vec{r}_i dopo un tempo τ è descritta da una funzione gaussiana:

$$g(\vec{\rho}, \tau) = \frac{1}{(4\pi D \tau)^{3/2}} \exp\left(-\frac{|\vec{\rho}|^2}{4D \tau}\right)$$

La funzione di correlazione misurata sperimentalmente è legata alla probabilità che la molecola emetta un fotone all'interno del volume focale al tempo τ e ad una distanza $\vec{\rho}$ dopo che ne ha emesso uno in posizione \vec{r}_i al tempo zero, sempre nel volume focale:

$$\langle i(t) i(t+\tau) \rangle = \frac{1}{V} \int d\vec{r}_i \int d\vec{\rho} U(\vec{r}_i + \vec{\rho}) g(\vec{\rho}, \tau) U(\vec{r}_i)$$

dove $U(\vec{r})$ è una funzione che descrive il volume esplorato nell'esperimento (volume focale) e V indica integrazione su tutto il volume che la molecola può esplorare. Nel caso più semplice, supponendo che il fascio utilizzato abbia forma gaussiana, $U(\vec{r})$ è descritto da un

ellissoide con due raggi r_0 e z_0 : r_0 ha le dimensioni del raggio del fascio laser focalizzato dall'obiettivo da microscopio nel piano focale (x,y) , mentre z_0 è la dimensione del raggio nella direzione z perpendicolare al piano focale. Le dimensioni di z_0 dipendono dalle caratteristiche dell'apertura confocale utilizzata nell'esperimento.

Utilizzando quindi:

$$U(\vec{r}) = \kappa \exp\left[-\frac{2}{r_0^2}(x^2 + y^2) - \frac{2}{r_0^2}z^2\right]$$

dove κ è una costante che tiene conto delle caratteristiche strumentali, sostituendo questa espressione nella precedente e integrando sul volume, si ha:

$$\langle i(t) i(t+\tau) \rangle = \left(\frac{\pi^{3/2}}{8}\right) \frac{\varepsilon^2 r_0^2 z_0}{(1+4D\tau/r_0^2)\sqrt{1+4D\tau/z_0^2}}$$

ε è una costante che tiene conto di tutti i parametri dell'esperimento come: l'efficienza globale di risposta del set-up strumentale, l'efficienza di fluorescenza della molecola, l'efficienza di assorbimento della molecola stessa, ecc...

Per considerare la presenza di più molecole nel volume focale si moltiplica l'espressione precedente per la concentrazione C di molecole fluorescenti nel campione e si ottiene un'espressione per la correlazione del segnale di fluorescenza da parte di tutte le molecole presenti nel volume focale:

$$\langle F(t) F(t+\tau) \rangle = \left(\frac{\pi^{3/2}}{8}\right) \frac{C \varepsilon r_0^2 z_0}{(1+4D\tau/r_0^2)\sqrt{1+4D\tau/z_0^2}}$$

La funzione di correlazione misurata sperimentalmente è normalizzata rispetto al quadrato del segnale di fluorescenza emesso in media dalle molecole presenti nel volume focale e questo è uguale a:

$$\langle F(t) \rangle^2 = [C \varepsilon \int d\vec{r} U(\vec{r})]^2 = \left(\frac{\pi^{3/2}}{8}\right)^2 C^2 \varepsilon^2 (r_0^2 z_0)^2$$

Per cui:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{C \varepsilon r_0^2 z_0 \left(\frac{\pi^{3/2}}{8}\right)} \frac{1}{(1+4D\tau/r_0^2)\sqrt{1+4D\tau/z_0^2}}$$

Ricordando che il volume efficace è definito da:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0 .$$

e definendo come *tempo di diffusione traslazionale* τ_D

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$$

la funzione di autocorrelazione per la fluorescenza risulta uguale a:

$$G(\tau) = \frac{8}{\epsilon V_{eff} C} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]^{-1/2} = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]^{-1/2}$$

Il valore di τ_D corrisponde al valore di τ assunto dalla curva $G(\tau)$ a metà altezza, misurata con un fluoroforo nella soluzione in condizione di diffusione libera. Il primo fattore, $G(0)$, è proporzionale alla funzione di responso strumentale e all'inverso del numero medio di particelle presenti nel volume focale ($N = CV_{eff}$). Le fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza, e quindi l'ampiezza della funzione di correlazione, sono maggiori per concentrazioni minori di molecole (Figura 1.15).

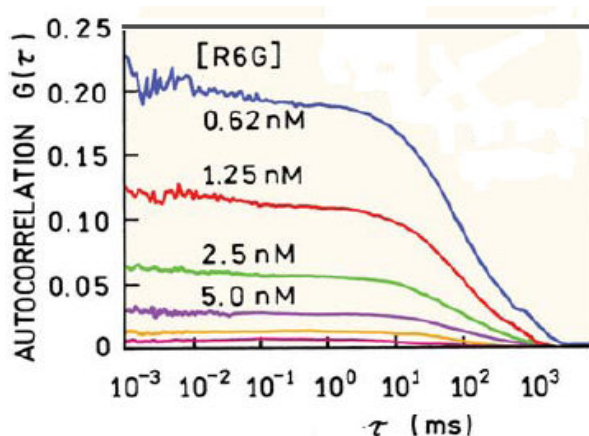


Figura 1.15 Ampiezza della funzione di correlazione a differenti concentrazioni di Rodamina6G.

Se il coefficiente di diffusione di una specie molecolare e le dimensioni del volume focale sono noti precisamente mediante misure indipendenti, è possibile stimare la concentrazione media delle particelle fluorescenti. Viceversa, è possibile in modo indiretto, dopo aver calibrato il volume di rivelazione attraverso misure di campioni standard con coefficiente di diffusione noto, determinare i coefficienti di diffusione delle specie analizzate ignote, mediante la misura del tempo τ_D .

La **relazione di Stokes-Einstein** correla il coefficiente di diffusione, D , al raggio idrodinamico R_H delle molecole:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

dove $k_B = 1,3806504 \cdot 10^{-23}$ J/K è la costante di Boltzman, T è la temperatura assoluta e η è la viscosità della soluzione^[42].

Le particelle sono descritte dal loro raggio idrodinamico R_H , cioè il raggio di una sfera

equivalente avente lo stesso coefficiente di diffusione della molecola analizzata; spesso risulta leggermente più grande del raggio fisico in quanto prende in considerazione l'effetto solvente e quindi la sfera di solvatazione.

Ricavando il tempo di diffusione traslazionale dal *fitting* della curva di autocorrelazione e applicando questa relazione è possibile monitorare variazioni del raggio idrodinamico dovute ad esempio al *binding* di biomolecole sulle particelle.

1.5.5 Triplet blinking

La precedente funzione di autocorrelazione si ottiene assumendo che le proprietà di fluorescenza del cromoforo non cambino durante l'attraversamento del volume focale. Sfortunatamente questa assunzione non è valida per fluorofori reali, soprattutto per le potenze di eccitazione più elevate.

Vari meccanismi causano fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza. Tra questi, il più comune è la transizione del fluoroforo al primo stato eccitato di tripletto (Figura 1.16).

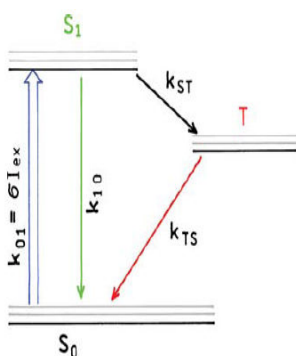


Figura 1.16 Diagramma di Jablonski con intersystem crossing dallo stato di singoletto a quello di tripletto.

Questa transizione risulta quanto-meccanicamente proibita pertanto il fluoroforo richiederà tempi relativamente lunghi (diversi microsecondi) per rilassare allo stato fondamentale.

Durante questi intervalli il fluoroforo non emette fotoni di fluorescenza con conseguente riduzione apparente del numero effettivo di fluorofori nel volume focale. Si può immaginare il processo di *intersystem crossing* come una serie di intervalli oscuri che interrompono l'emissione continua di fluorescenza delle molecole.

Questo processo porta al *blinking* (o *switching off*) del fluoroforo, con un tempo caratteristico τ_t , che corrisponde al tempo di vita medio dello stato di tripletto.

Il fenomeno del “*triplet blinking*”, che si genera da ciascun fenomeno fotofisico che comporti transizioni reversibili tra uno stato bright-fluorescente ed uno dark-non fluorescente, può essere descritto mediante un semplice decadimento esponenziale $G_{triplet}(\tau)$:

$$G_{triplet}(\tau) = 1 - T + T \cdot e^{-\tau / \tau_{triplet}}$$

Nel caso in cui i processi fotofisici siano indipendenti l'uno dall'altro, la funzione di autocorrelazione globale è ottenuta mediante il prodotto delle funzioni che descrivono i singoli processi. Pertanto nel caso di diffusione traslazionale libera e di *blinking* la G_{tot} è espressa da:

$$G_{tot}(\tau) = G_{triplet}(\tau) \cdot G_{diff.trasl}(\tau)$$

$$G_{tot}(\tau) = (1 - T + T \cdot e^{-\tau/\tau_t}) \left(\frac{1}{N}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]^{-1/2}$$

dove T è la frazione di molecole nello stato di tripletto e τ_t è il tempo di rilassamento singoletto-tripletto, che per un fluoroforo organico, a seconda dell'intensità di eccitazione, può assumere valori compresi fra 0.5 e 1 μ s.

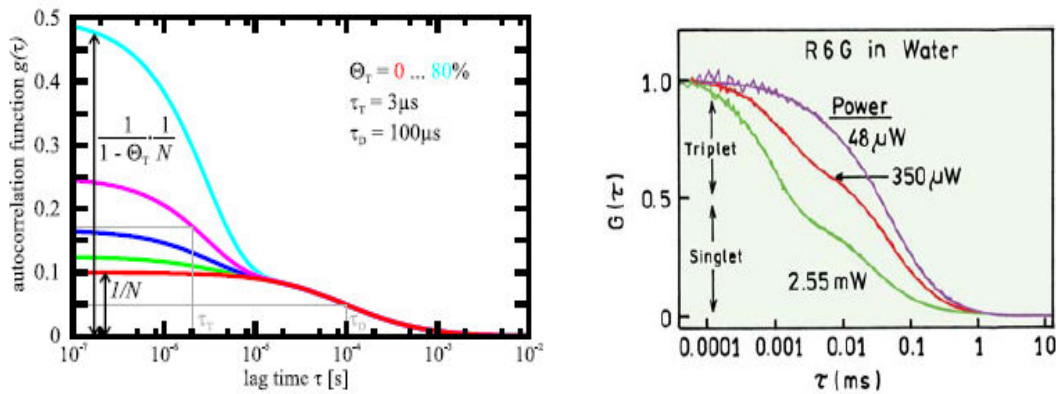


Figura 1.17 Curve di autocorrelazione con differenti frazioni di molecole nello stato di tripletto (sinistra). Effetto dell'intensità di eccitazione sulla curva di correlazione di Rodamina6G in acqua (destra).

1.5.6 Diffusione libera rotazionale

La diffusione rotazionale delle particelle fluorescenti porta ad ulteriori fluttuazioni nel segnale di fluorescenza rilevato.

Per piccole molecole fluorescenti in soluzione acquosa a temperatura ambiente, la diffusione rotazionale ha luogo nella scala dei nanosecondi per cui può essere non rilevabile in molti set-up sperimentali^[37]. Tuttavia, i fluorofori rigidamente legati a macromolecole biologiche manifestano uno spostamento della scala temporale rotazionale da poche decine di nanosecondi a microsecondi, dovuto alla dimensione totale: macromolecola + fluoroforo. La formula per il fitting delle curve FCS misurate in condizioni di diffusione traslazionale e rotazionale è la seguente:

$$G_{tot}(\tau) = [1 + C \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_r}\right)] \left(\frac{1}{N}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]^{-1/2}$$

Misure di diffusione rotazionale sono molto utili dato che i tempi di correlazione rotazionale sono direttamente proporzionali al peso molecolare, mentre i coefficienti di diffusione

traslazionale sono proporzionali a (peso molecolare)^{1/3}. Ciononostante esistono relativamente poche pubblicazioni riguardanti la diffusione rotazionale dato che sussistono alcune limitazioni. Per misurare il moto rotazionale utilizzando FCS è necessario tener conto del *photon antibunching* e del trasferimento agli stati bui, che possono aver luogo nella medesima scala temporale^[38].

Il fenomeno *photon antibunching* è una manifestazione del fatto che un singolo sistema quantico non può emettere un quanto di luce immediatamente dopo la transizione radiativa.

1.5.7 Flusso

Se è presente un flusso esterno che imprime una direzione preferenziale al moto dei fluorofori, le fluttuazioni di concentrazione delle specie fluorescenti sono descrivibili dalla seguente funzione di correlazione:

$$G_{flow}(\tau) = \left(\frac{1}{N}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]^{-1/2} \cdot e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_f}\right)^2 \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}}$$

valida nel caso in cui $\tau_f \ll \tau_D$, dove τ_f è il tempo di transizione attraverso il volume focale per effetto del flusso^[43]. Questa equazione permette di investigare simultaneamente la diffusione traslazionale e il flusso direzionato. In presenza di flusso direzionato le curve di correlazione decadono molto più rapidamente con conseguente riduzione dei tempi di residenza del fluoroforo all'interno del volume focale. La velocità di flusso attraverso il volume focale è così definita:

$$v = \frac{r_0}{\tau_{flow}}$$

In assenza di flusso si osserva l'usuale funzione di correlazione dominata dal moto diffusivo, mentre all'aumentare della velocità del flusso direzionato $G(\tau)$ decade più rapidamente (Figura 1.18), per cui si assiste ad uno spostamento delle curve di correlazione verso tempi più brevi. Lo spostamento è una conseguenza del fatto che i fluorofori vengono rimossi dal volume focale più rapidamente della semplice diffusione libera^[38].

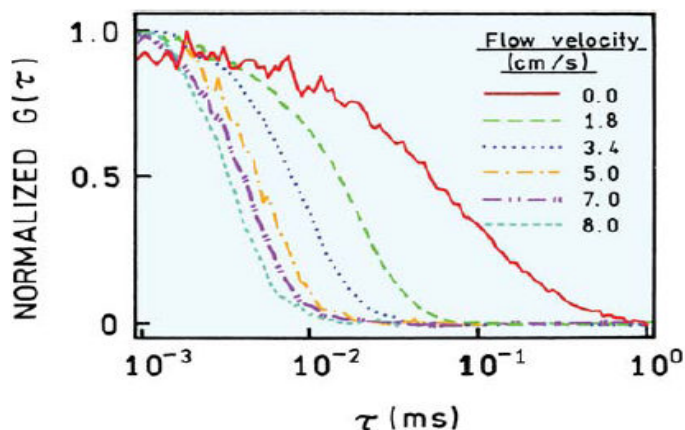


Figura 1.18 Curve di correlazione normalizzate della Rodamina6G in flusso all'interno di un capillare.

1.6 Fluorescence Correlation Spectroscopy di GNPs

Sfruttando le proprietà di fotoluminescenza delle GNPs eccitate da due fotoni è possibile studiare le loro proprietà di diffusione in soluzione acquosa attraverso analisi della funzione di correlazione delle fluttuazioni della fotoluminescenza. La Figura 1.19 riporta una tipica curva di correlazione per una soluzione di GNPs di diametro 20 nm, ricoperte con citrato, misurata

eccitando la risonanza plasmonica a due fotoni a 815 nm^[44]. Il segnale di correlazione presenta due regioni, temporalmente distinte, che sono attribuite ai due processi di diffusione rotazionale (1.5 μs) e diffusione traslazionale (544 μs) delle GNPs. Entrambi i tempi caratteristici sono ben correlati con le dimensioni effettive delle GNPs.

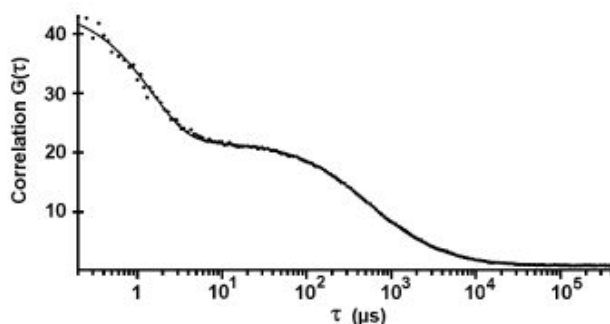


Figura 1.19 Curva di correlazione della luminescenza eccitata a due fotoni di sfere d'oro (diametro 20 nm, ricoperte di citrato) che diffondono all'interno del volume focale. Il fitting è costituito da una combinazione delle equazioni corrispondenti a diffusione traslazionale e diffusione rotazionale.

Loumaigne et al. nel 2010 hanno osservato che l'ampiezza del contributo traslazionale e rotazionale della curva di correlazione dipende dall'intensità con cui le particelle vengono eccitate. La Figura 1.20 evidenzia l'evoluzione delle curve di correlazione nell'intervallo di potenze 0.5 – 30 mW.

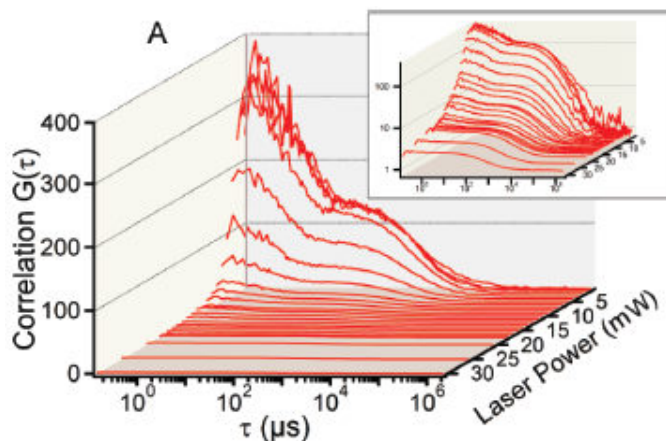


Figura 1.20 Curve di correlazione di GNPs sferiche di diametro 20 nm in funzione della potenza di eccitazione.

La diminuzione dell'ampiezza della parte di curva relativa alla diffusione traslazionale, $G(0)$, al crescere della potenza dimostra un aumento del segnale di fluorescenza, che è attribuito all'aumento delle “trappole fluorescenti”, N , sulle superficie delle GNPs. Infatti un'importante conseguenza dell'assorbimento di impulsi laser a intensità crescente è l'aumento della temperatura delle GNPs (seppur non quantificato a causa della mancanza di dati relativi alle sezioni d'urto di assorbimento a due fotoni delle particelle), la quale favorisce la migrazione del citrato sulla superficie attivando così nuovi siti superficiali di luminescenza. Anche l'ampiezza della parte di curva caratteristica del processo di diffusione rotazionale, che viene espressa come C , si abbassa suggerendo la scomparsa dell'anisotropia dell'emissione all'aumentare della potenza (Figura 1.21).

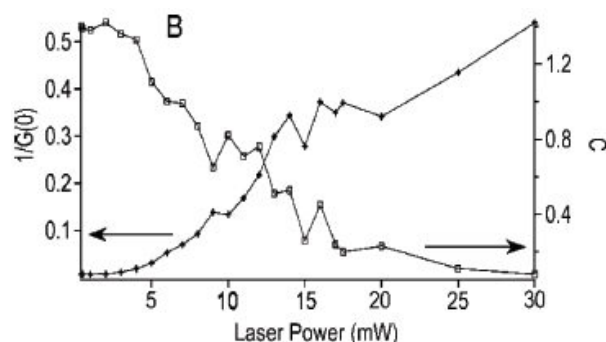


Figura 1.21 Evoluzione del numero di siti fluorescenti, $N = 1/G(0)$, e dell'ampiezza della parte rotazionale della curva di correlazione, C , con la potenza di eccitazione.

Questi risultati sperimentali mostrano come bisogna fare attenzione alle condizioni sperimentali utilizzate per eccitare il campione, dal momento che influenzano notevolmente il segnale di emissione delle nanoparticelle stesse.

Per quanto concerne le interazioni di NPs con ambienti biologici, si è notato che il tempo di diffusione delle GNPs che attraversano il volume focale cresce con la formazione di aggregati e con l'aumento delle dimensioni delle particelle stesse in seguito a formazione di protein-

corona (Figura 1.22)^[6].

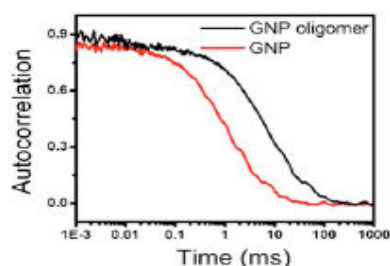


Figura 1.22 Funzione di correlazione di GNPs e oligomeri di GNPs (ricoperte di citrato). L'aumento del tempo di diffusione della nanoparticella da 1,8 a 2,4 ms indica un aumento del raggio idrodinamico da 42 a 56 nm.

1.7 Analisi del protein-corona per nanoparticelle metalliche mediante varie tecniche spettroscopiche

In letteratura sono apparsi molti articoli riguardanti le variazioni di volume idrodinamico e le proprietà di associazione e dissociazione di nanoparticelle quando adsorbono proteine.

Generalmente il processo di *binding* delle proteine con le NPs è razionalizzato empiricamente mediante l'equazione di Hill, che nella forma più generale è così espressa:

$$\theta = \frac{[P]^n}{K_D' + [P]^n} = \frac{[P]^n}{(K_D)^n + [P]^n} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_D}{[P]}\right)^n} \quad \text{Equazione 1.A}$$

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 proteina-NP (ed è la concentrazione di proteina che porta all'occupazione della metà siti di *binding*) mentre n è il coefficiente di Hill.

Il coefficiente di Hill descrive il grado di cooperatività di associazione della proteina con la NP. Secondo il modello di Hill quando $n > 1$ il *binding* è **cooperativo**, cioè l'interazione tra la proteina e la NP incrementa l'affinità tra le due specie favorendo l'ulteriore associazione, mentre quando $n < 1$ il *binding* è **anticooperativo**, cioè l'energia di associazione per particella decresce progressivamente in seguito all'ulteriore adsorbimento di proteina. Infine, se $n = 1$ il *binding* è **non cooperativo**, ovvero l'affinità delle proteine per le NPs è indipendente dalla presenza di altre proteine legate, e l'equazione di Hill si riduce all'equazione di Langmuir^[45].

Di seguito sono citati alcuni studi, effettuati mediante varie tecniche, relativi all'interazione di HSA/BSA con nanoparticelle di vario genere incluse GNPs.

Röcher et al. nel 2009 dimostrarono, attraverso misure di FCS, la formazione di un singolo monostrato di spessore 3.3 nm di HSA su NPs di FePt di raggio idrodinamico $R_H(0)=5.6$ nm,

rese fluorescente con il fluoroforo DY-636^[46].

La conformazione a "cuore" dell'HSA viene qui approssimata ad un prisma triangolare equilatero di lato ~ 8 nm e altezza ~ 3.4 nm (Figura 1.23).



Figura 1.23 HSA approssimata ad un prisma triangolo equilatero.

Per le misure FCS le soluzioni a concentrazione costante di NPs (~ 4 nM) furono mescolate a uguali volumi di soluzioni a differenti concentrazioni di HSA, ottenendo così soluzioni aventi concentrazioni effettive di BSA comprese tra 60 nM e 1 mM. Le misure furono effettuate in tampone PBS (tampone fosfato salino) alla temperatura di 22 °C.

Mediante analisi delle curve di autocorrelazione FCS delle soluzioni a concentrazione variabile di proteina, hanno ricavato τ_D , tempo di diffusione traslazionale, da cui hanno estratto il coefficiente di diffusione D per le NPs e, dalla relazione di Stokes-Einstein, il raggio idrodinamico R_H delle stesse. In questi esperimenti osservarono un aumento del valore del raggio R_H della NP all'aumentare della concentrazione di HSA.

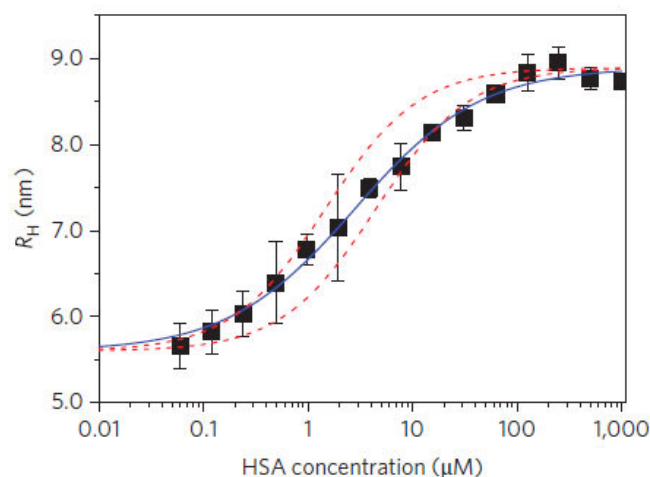


Figura 1.24 Associazione di HSA a NPs di FePt. Il raggio idrodinamico delle particelle è riportato in funzione della concentrazione di HSA. La curva continua rappresenta il fit dei dati mediante il modello di binding anti-cooperativo, mentre le curve tratteggiate rappresentano le isoterme di binding di Langmuir.

La Figura 1.24 rivela una limitata capacità di associazione della NP con la proteina. La saturazione fu raggiunta a concentrazioni di HSA fisiologiche (500-800 μ M). Il fitting della curva riportato nella stessa figura si basa sull'equazione di Hill:

$$N = N_{\max} \frac{1}{1 + (K_D / [HSA])^n} \quad \text{Equazione 1.B}$$

$$R_H(N) = R_H(0) + \Delta R = \sqrt[3]{\frac{3}{4p} (V_0 + NV_{HSA})} = R_H(0) \sqrt[3]{1 + cN} \quad \text{Equazione 1.C}$$

N e N_{\max} indicano rispettivamente il numero di HSA legate alla NP ad ogni concentrazione di HSA e alla saturazione, V_0 e V_{HSA} sono i volumi della NP nuda e dell'HSA mentre c è il rapporto tra V_{HSA} e V_0 . Dal fitting, eseguito mediante la seguente equazione:

$$\theta = \frac{1}{1 + (K_D / [HSA])^n} \quad \text{Equazione 1.Abis}$$

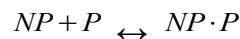
ricavarono la costante di binding $K_D = 5.1 \mu\text{M}$ e $n = 0.74$. Quest'ultimo, essendo inferiore all'unità, indica la presenza di un processo di binding anticooperativo. L'anticooperatività può derivare dall'ingombro sterico, il quale impone una certa penalità energetica alle proteine che cercano di legarsi a NPs già parzialmente ricoperte.

Inoltre notarono un incremento del raggio ΔR massimo di 3.3 nm, confrontabile con una delle dimensioni stimate per l'HSA nella forma a cuore.

Dell'Orco et al. nel 2010 svilupparono un modello matematico per la descrizione della formazione della corona attorno alla particella basato sulle costanti cinetiche di associazione e di dissociazione determinate sperimentalmente attraverso misure di Surface Plasmon Resonance^[47].

Questo modello fu applicato per lo studio dell'interazione tra NPs sintetiche di diametro 70 nm, quali NIPAM/BAM (N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide) e alcune proteine del plasma, quali HSA, High Density Lipoprotein (HDL) e Fibrinogeno (Fib).

Nell'articolo le dinamiche dell'interazione NP–proteina sono descritte da reazioni reversibili:



dove P rappresenta la proteina.

Gli autori furono in grado di predire sia l'evoluzione temporale sia la composizione della corona all'equilibrio sulla base di affinità, stechiometrie e costanti cinetiche. Le costanti di equilibrio furono determinate come rapporto tra la costante di associazione e quella di dissociazione.

Il risultato della simulazione è rappresentato dalla Figura 1.25.

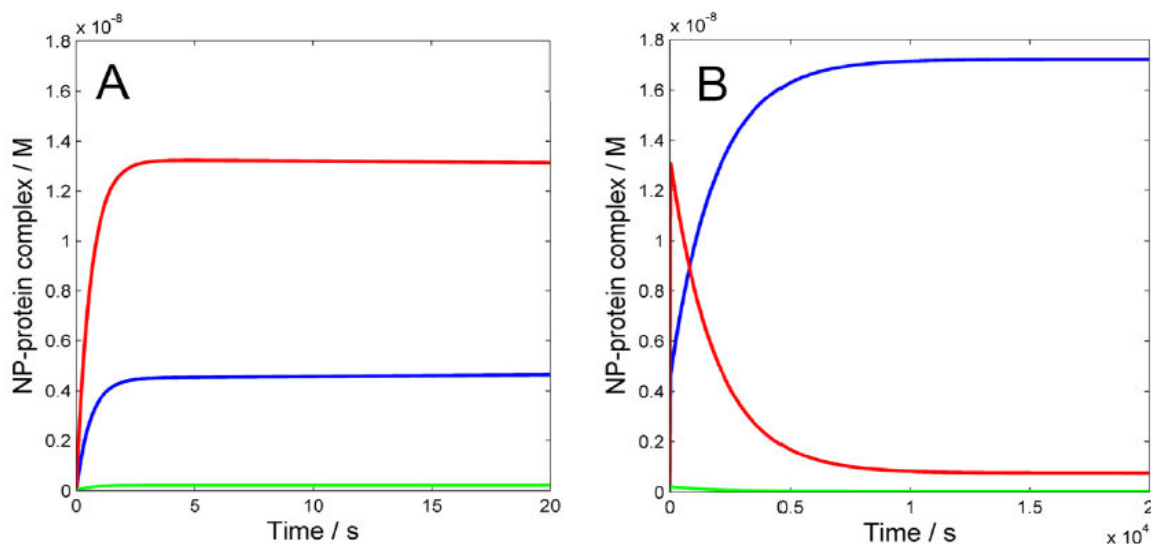


Figura 1.25 Simulazione numerica dell'evoluzione temporale dell'interazione tra 50:50 NIPAM/BAM NPs (diametro 70 nm) e le seguenti proteine del plasma: HSA (rosso), HDL (blu), Fibrinogeno (verde).

Monitorando l'evoluzione del sistema a tempi relativamente brevi hanno rilevato una rapida formazione del complesso NP-HSA. La concentrazione di questo complesso risulta stabile nei primi 20s. Tuttavia, proseguendo l'analisi per tempi maggiori, la composizione del proteincorona cambia. Dopo 3.9h il 93.6% della corona risulta formata principalmente da HDL e

P	$K_{equ} [M]^{-1}$
HDL	$1,0 \cdot 10^9$
HSA	$1,2 \cdot 10^6$
Fib	$1,0 \cdot 10^6$

solo per il 6.4% da HSA. Le costanti di equilibrio stimate per i complessi NP-P sono: che confermano l'andamento in Figura 1.25.

Infine, approssimando ciascuna proteina ad una sfera in contatto con la superficie della NP, hanno determinato il numero ideale di siti di binding, n_i , sulla NP da parte della proteina P come rapporto tra la superficie di nanoparticella estesa e la sezione della proteina:

$$n_i = \frac{4\pi(r_{NP} + r_i)^2}{\pi r_i^2} \quad \text{Equazione 1.D}$$

dove r_{NP} è il raggio della NP, ovvero 35 nm, mentre r_i è il raggio della proteina considerata sferica. Il numero ideale di siti di binding sulla superficie della particella NIPAM/BAM da parte della HSA è risultato essere 380.

Shang e altri nel 2012 investigarono l'interazione di *nanoclusters* d'oro (GNCs) con HSA. GNCs non esibiscono risonanza plasmonica dal momento che possiedono diametri inferiori a 2 nm^[48].

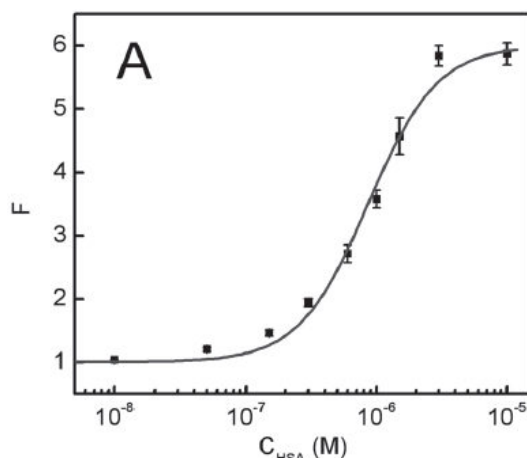
Il gruppo studiò gli effetti del binding di HSA sulla fotoluminescenza dei GNCs mediante

spettroscopia di fluorescenza di stato stazionario. In questi esperimenti osservarono un progressivo aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza all'aumentare della concentrazione di HSA da 0 a 3.0 μM (Figura 1.26). Questa dipendenza dalla concentrazione proteica fu analizzata quantitativamente mediante una variante dell'equazione di Hill:

$$F = F_0 + \frac{F_{\max} - F_0}{1 + (K_D/[HSA])^n}$$

dove F e F_0 sono le intensità di fluorescenza di GNCs rispettivamente in presenza e in assenza di HSA. F_{\max} è l'intensità massima di fluorescenza del complesso GNCs-HSA.

Dal fitting ottennero una K_D di 0.9 μM , valore nello stesso intervallo delle costanti di binding riportato in precedenza per NPs più grandi, quali GNPs ricoperte con citrato o NPs di FePt. Il coefficiente di Hill, $n=1.6$, superiore all'unità suggerisce binding cooperativo, ovvero un



aumento dell'affinità con il progressivo adsorbimento di proteine.

Figura 1.26 Intensità di fluorescenza di GNCs in funzione della concentrazione di HSA.

Lacerda e altri nel 2010 si focalizzarono sullo studio delle GNPs e del loro binding con le proteine del plasma umano^[29]. Impiegarono svariate tecniche fotofisiche per la caratterizzazione dell'interazione GNPs-proteine (assorbimento, *quenching* di fluorescenza, *dynamic light scattering*, dicroismo circolare, microscopia elettronica).

Misure di *quenching* di fluorescenza, possibili in quanto l'oro agisce da *quencher* nell'emissione di molti cromofori, evidenziarono un *blue shift* del picco massimo di emissione di fluorescenza delle proteine all'aumentare della concentrazione di oro, a testimonianza del fatto che i residui amminoacidici fluorescenti si trovano in ambienti più idrofobici e meno esposti al solvente. Attraverso queste misure gli autori quantificarono il *quenching* della fluorescenza mediante la relazione: $Q = (I^0 - I)/I^0$, in cui I^0 e I sono rispettivamente le intensità di fluorescenza in assenza e in presenza di GNPs e determinarono la costante di equilibrio K_D attraverso una seconda variante dell'equazione di Hill:

$$Q/Q_{MAX} = \frac{[GNP]^n}{(K_D^n + [GNP]^n)}$$

dove Q_{MAX} è il valore di Q alla saturazione.

Le costanti di associazione delle proteine del plasma, K, che sono i reciproci di K_D , sulle GNPs risultarono comprese nell'intervallo 10^4 - 10^7 M^{-1} . Infine, esplorarono come la dimensione delle NPs e l'identità della proteina influenzassero K e n. Di seguito sono riportati i parametri ottenuti per HSA all'aumentare del diametro delle GNPs:

HSA	5 nm	10 nm	20 nm	30 nm	60 nm	80 nm	100 nm
Q_{max}	1,27 ± 0,31	1,22 ± 0,04	1,94 ± 0,31	1,21 ± 0,08	1,33 ± 0,02	2,91 ± 0,27	2,88 ± 2,22
n	0,85 ± 0,02	0,84 ± 0,02	0,72 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,66 ± 0,06	0,66 ± 0,04
K_D	$1,00 \cdot 10^5 \pm 8,83 \cdot 10^7$	$3,30 \cdot 10^6 \pm 3,15 \cdot 10^7$	$2,45 \cdot 10^6 \pm 8,99 \cdot 10^7$	$3,01 \cdot 10^7 \pm 5,08 \cdot 10^8$	$7,74 \cdot 10^8 \pm 2,08 \cdot 10^9$	$3,54 \cdot 10^7 \pm 5,29 \cdot 10^8$	$2,74 \cdot 10^7 \pm 1,24 \cdot 10^8$
K	$1 \cdot 10^5$	$3,03 \cdot 10^5$	$4,08 \cdot 10^5$	$3,32 \cdot 10^6$	$1,29 \cdot 10^7$	$2,82 \cdot 10^6$	$3,65 \cdot 10^6$

L'articolo più rilevante ai fini di questo lavoro di tesi fu scritto nel 2012 dal gruppo di **Medina**, il quale effettuò misure di *Scattering Correlation Spectroscopy* (SCS) per analizzare variazioni del moto diffusivo delle GNPs in seguito all'adsorbimento di BSA^[49]. Le nanoparticelle impiegate avevano dimensioni comprese nell'intervallo 51-93 nm e erano stabilizzate mediante citrato. In Figura 1.27A, 1.27B e 1.27C sono riportate le curve FCS per GNPs ricoperte di citrato disperse in acqua in assenza e presenza di BSA in concentrazione 0.75 mM. Per tutte queste GNPs si osserva un aumento del tempo caratteristico di diffusione traslazionale τ_D rispetto a quello misurato per le GNPs nude. Questo aumento viene attribuito ad un incremento del raggio idrodinamico di una quantità $\Delta R_H = 4.6$ nm. Approssimando la BSA ad un prisma triangolare equilatero di lato 8 nm e altezza 3.4 nm, come fatto in precedenza, gli autori ipotizzarono che si fosse formato un singolo monolayer di BSA sulle particelle, in accordo con il lavoro di Röcher. Il monolayer completo si realizza a concentrazioni di albumina simili a quelle trovate nel sangue umano (~0.75 mM), indipendentemente dalle dimensioni delle GNPs. In Figura 1.27D sono riportate le curve FCS per GNPs ricoperte con PEG (polietilenglicole) in presenza e assenza di BSA. Come si può notare per questo sistema non si hanno variazioni del tempo caratteristico di diffusione in presenza di BSA, indice del fatto che lo strato di PEG ostacola l'adsorbimento della BSA sulla NP.

Dalle misure SCS effettuate a concentrazioni crescenti di BSA, gli autori ottengono una stima del raggio idrodinamico medio per le GNPs ricoperte di citrato che si associano con la BSA. Questi dati sono riportati in Figura 1.28. Utilizzando l'equazione di Hill (Equazione 1.1) gli autori hanno ottenuto K_D pari a 256 μM e n, coefficiente di Hill, pari a 0.4, dimostrando l'adsorbimento spontaneo di BSA sulle nanoparticelle mediante meccanismo di binding anti-

cooperativo, che implica una forte repulsione, crescente al diminuire del numero di siti superficiali liberi, tra molecole di BSA libere e legate.

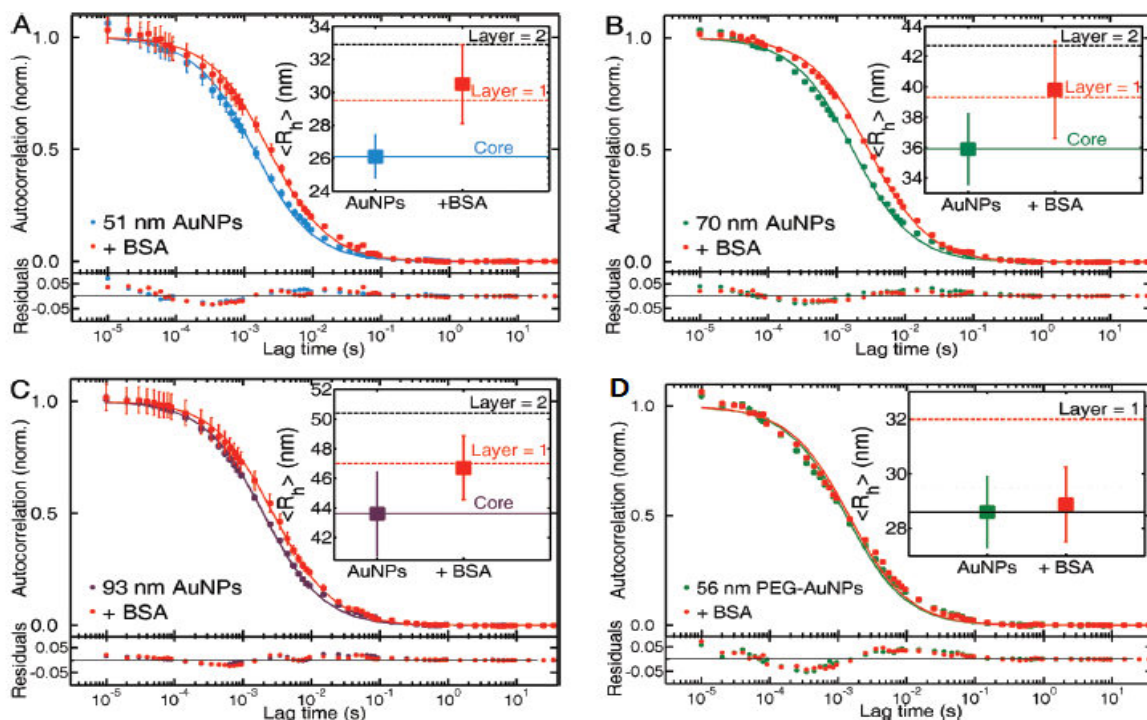


Figura 1.27 Curve di autocorrelazione di GNPs e GNPs + BSA (0.75 mM). (A) citrato-coated GNPs di diametro 51 nm, (B) citrato-coated GNPs di diametro 70 nm, (C) citrato-coated GNPs di diametro 90 nm, (D) PEG-coated GNPs di diametro 56 nm prima (verde) e dopo (rosso) l'aggiunta di BSA.

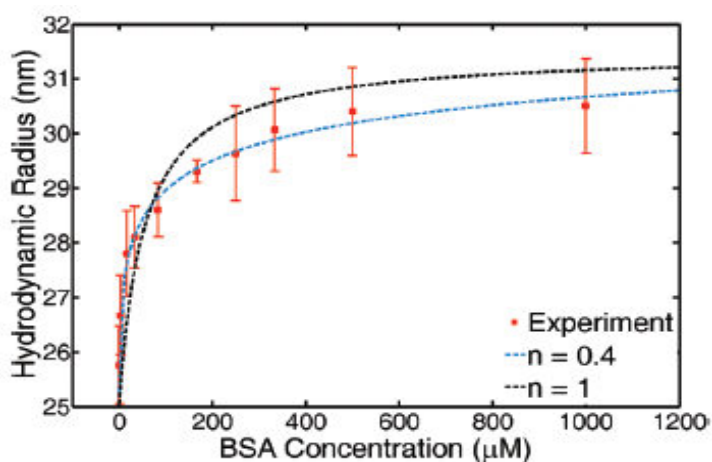
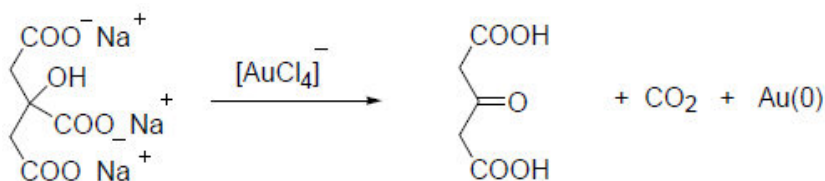


Figura 1.28 Isotherma di adsorbimento relativa all'aumento di R_H con la concentrazione di HSA. La curva nera mostra, per confronto, il modello di binding non-cooperativo ($n=1$).

CAPITOLO2: PARTE SPERIMENTALE

2.1 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle d'oro

GNPs sono state sintetizzate mediante il metodo di Turkevich basato sulla riduzione dell'acido tetracloroaurico con citrato di sodio^{[50][51][52]}.



Il citrato svolge la duplice funzione di agente *riducente*, convertendo il sale di oro in oro metallico, e di agente *stabilizzante*. Adsorbendosi sulla superficie, infatti, previene l'aggregazione delle particelle in soluzione grazie all'effetto di repulsione elettrostatica.

Prima di iniziare la sintesi è indispensabile lavare accuratamente la vetreria con acqua regia in modo tale da rimuovere eventuali residui di oro.

Si pone a riscaldare blandamente su piastra riscaldante il bagno di olio di silicone. In esso viene immerso il pallone di reazione contenente 36 mL di H₂O milliQ, 28 μL di acido tetracloroaurico (HAuCl₄) e un'ancoretta magnetica.

La soluzione è posta a riscaldare a riflusso e contemporaneamente in agitazione. Quando raggiunge i 100°C vengono aggiunti rapidamente 46 mg di sodio citrato diidrato (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) sciolti in 1 mL di H₂O. Il rapporto molare acido tetracloroaurico/citrato di sodio risulta 1:4. Si mantengono queste condizioni per circa 1h dopodiché è possibile interrompere il riscaldamento. La soluzione colloidale ottenuta viene successivamente posta a raffreddare a temperatura ambiente per 30 minuti circa mantenendo l'agitazione.

La formazione di GNPs si osserva mediante un viraggio del colore da giallo a rosso.

La caratterizzazione della sospensione colloidale può essere effettuata impiegando molteplici tecniche, le quali spesso portano a risultati anche in contrasto tra di loro, che richiedono un'attenta analisi per dare una corretta interpretazione alle singole misure.

2.1.1 UV-Vis

Mediante spettrofotometro UV-Vis (Cary5 della Varian) è stato registrato lo spettro di assorbimento in una cuvetta di quarzo di cammino ottico 1mm (Figura 2.1).

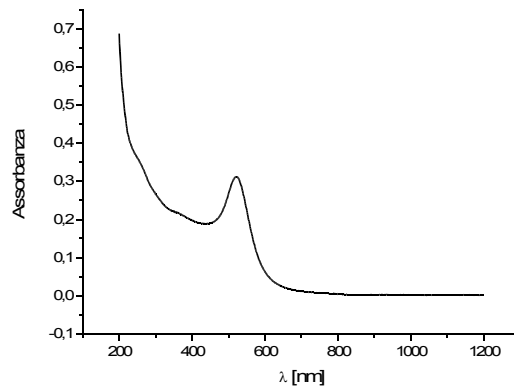


Figura 2.1 Spettro di assorbimento delle GNPs sintetizzate

La soluzione di GNPs presenta un picco massimo di assorbimento a 521 nm. Da questo valore e mediante il modello di Mie (vedi Appendice) si stima un raggio medio delle GNPs pari a 7 nm.

2.1.2 Dynamic Light Scattering e Z-Potential

Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) permettono di ottenere una stima del raggio idrodinamico medio di NPs attraverso misure di autocorrelazione dell'intensità della luce diffusa dalle NPs stesse. I principi su cui si basa questa tecnica sono simili a quelli su è fondata la *fluorescence correlation spectroscopy*. Misure di DLS, però, sono spesso descritte come caratterizzate dalla presenza di artefatti dovuti alla sovrastima delle particelle più grandi o agglomerate a causa della loro maggiore efficienza di scattering^[53].

In Figura 2.2 è riportato il grafico di distribuzione per le dimensioni della soluzione di GNPs sintetizzate, estrapolato dalle misure di DLS effettuate con lo strumento (Malvern) di proprietà del Prof. F. Mancin, che ci ha permesso di utilizzarlo. Il grafico mostra tre picchi ai quali sono assegnati dei valori medi. Lo strumento fornisce anche una stima del diametro medio basato su un'analisi di tutti i picchi rilevati, da cui si può ricavare il raggio medio delle GNPs. Il raggio medio stimato per le GNPs risulta di 23.4 nm, valore molto maggiore di quello ricavato dal fitting dello spettro di assorbimento UV-Visibile basato sul modello di Mie. La misura DLS effettuata su nanoparticelle d'oro risulta spesso difficoltosa a causa della necessità di individuare la concentrazione ottimale, compromesso tra l'evitare un eccessivo assorbimento e uno scattering troppo debole. Si ipotizza che il valore osservato con l'analisi DLS sia influenzato anche da contributi provenienti da qualche aggregato di GNPs, dal momento che l'intensità di scattering aumenta all'aumentare delle dimensioni delle particelle. Tuttavia, sarebbero necessari ulteriori esperimenti per affinare le condizioni operative.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 46,77	Peak 1: 81,09	93,4	70,82
Pdi: 0,457	Peak 2: 3465	4,4	1254
Intercept: 0,911	Peak 3: 1,544	1,4	0,3691
Result quality : Good			

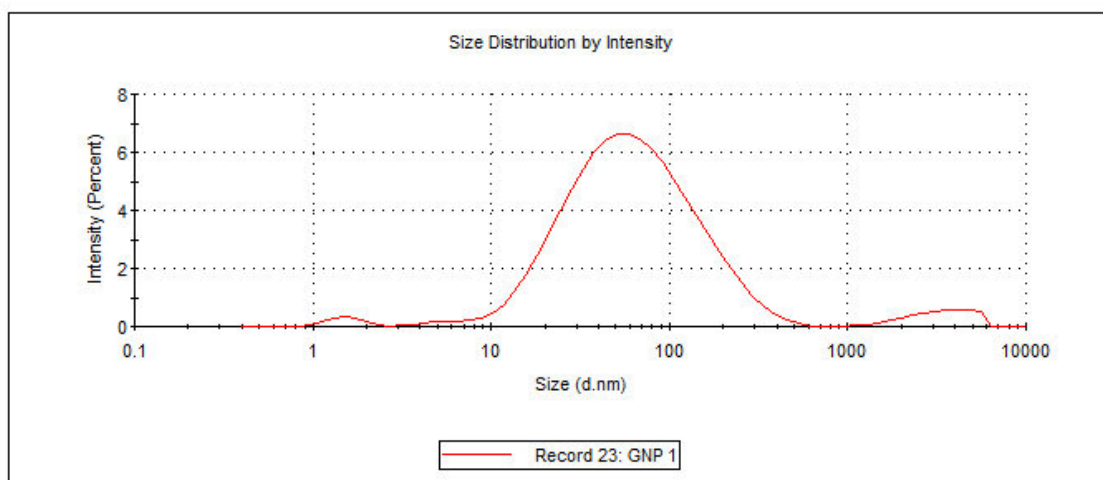


Figura 2.2 Dynamic light scattering delle GNPs sintetizzate

Lo stesso strumento utilizzato per le misure di DLS permette di effettuare anche misure di *Z-potential* dal momento che è equipaggiato con un apposito dispositivo per l'applicazione di una differenza di potenziale. La modalità *Z-potential* permette di misurare la carica elettrostatica sulla superficie della particella che è a sua volta correlata alla stabilità delle NPs in soluzione.

Il potenziale *Z* medio per la soluzione di GNPs risulta essere $-41 \text{ mV} \pm 8,1 \text{ mV}$, indice di una elevata stabilità delle nanoparticelle.

2.2 Set-up ottico per l'imaging confocale e misure di FCS

Per analizzare i campioni preparati è stato utilizzato un microscopio confocale a fluorescenza (Olympus FV300). Lo schema della testa di scansione del microscopio e la foto dell'intero strumento sono riportati in Figura 2.3.

Il fascio laser di eccitazione è focalizzato nel campione fluorescente mediante un obiettivo da microscopio. L'utilizzo di obiettivo ad immersione in acqua ad elevata apertura numerica ($NA=1.2$) garantisce un'elevata risoluzione spaziale, utile sia per la raccolta di immagini in fluorescenza con buona risoluzione sia per misure di FCS, il cui requisito è quello di avere piccoli volumi di eccitazione^{[36][38][42]}.

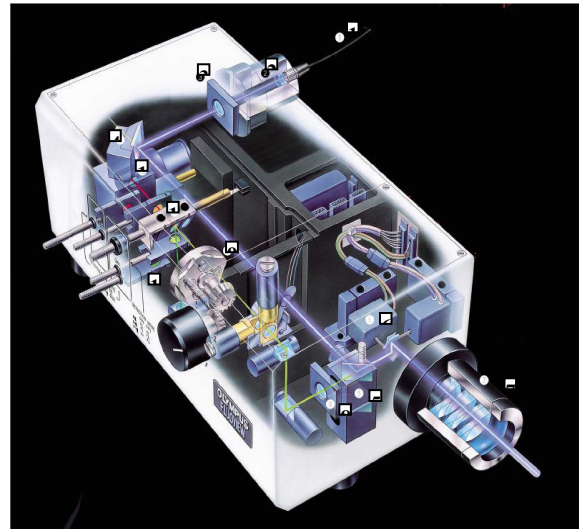


Figura 2.3 Foto dello strumento (a destra) e immagine della testa confocale costituita da: 1) Ingresso fibra ottica; 2) Collimatore; 3) Polarizzatore; 4) Specchio; 5) Specchio dicromatico; 6) Specchi galvanometrici; 7) Ingresso al microscopio con beam expander che ingrandisce il fascio di 3,3; 8) Lenti di raccolta; 9) Torretta dei *pinhole*; 10) Selettore dei rivelatori; 11) Filtri; 12) Tubo fotomoltiplicatore. Nel nostro set-up lo specchio 4 è sostituito da un dicroico, e il laser impulsato entra nel sistema attraverso un foro praticato nella parete alle spalle del dicroico stesso.

All'interno della testa confocale è presente anche una coppia di specchi galvanometrici, i quali permettono l'eccitazione dei fluorofori in un'area del campione consentendo misure di imaging di fluorescenza.

L'emissione di fluorescenza è raccolta dal medesimo obiettivo e trasmessa dallo specchio dicromatico, che ha la funzione di deviare dal ramo di raccolta della fluorescenza il residuo della radiazione incidente e focalizzare la fluorescenza nell'apertura confocale. Lo scopo dell'apertura confocale, posta nel piano coniugato del piano immagine, è quello di rigettare efficacemente la fluorescenza generata dai piani fuori fuoco del campione, aumentando pertanto la risoluzione nella direzione trasversale del campione. Tale configurazione è utile per le immagini 3D di campioni spessi ottenute dalla ricostruzione 3D di una sequenza di immagini raccolte a profondità diverse del campione.

La fluorescenza è inviata ai *detectors* per la rivelazione. Per le misure di *imaging* di fluorescenza al microscopio confocale si usa un tubo fotomoltiplicatore (PMT), mentre per le misure di FCS si usano dei fotodiodi a valanga (APD).

I *detectors* APDs, collegati ad una elettronica veloce, permettono una rilevazione di tipo *time-correlated single-photon counting*, consentono una rapida rivelazione di singoli fotoni, in modo tale che si possano osservare scale temporali nell'intervallo sub-microsecondi-secondi.

Per eliminare l'artefatto dell'*afterpulsing*, dovuto ad un segnale spurio di autocorrelazione generato dallo stesso *detector*, nelle misure FCS, il segnale di fluorescenza è diviso in due parti attraverso un *beam splitter* e inviato a due APD (Figura 2.4)

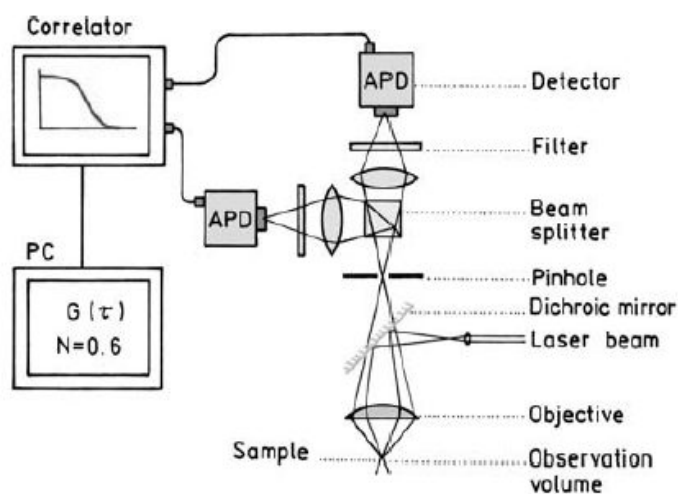


Figura 2.4 Tipico strumento FCS

A seconda del tipo di eccitazione si utilizzano laser differenti.

Nell'eccitazione ad un fotone è stato impiegato il laser ad Argon in continuo caratterizzato da due linee di emissione centrate a 488 nm e 514 nm. Per l'eccitazione di fluorofori organici quali l'Alexa488 (Invitrogen) e la fluoresceina è stata sfruttata la linea a 488 nm. L'Alexa488 è un derivato della fluoresceina caratterizzato da una maggiore fotostabilità sotto irraggiamento prolungato; grazie a questa sua proprietà è ampiamente usato come standard per misure di FCS. L'emissione dell'Alexa488 è raccolta nell'intervallo di lunghezze d'onda 500 - 550 nm.

Per l'analisi FCS delle GNPs è stato utilizzato un laser impulsato Ti:Zaffiro (Coherent, modello Mira 900-F) pompato da un laser a diodo in continuo (Coherent, modello Verdi, V-5). Il laser Mira 900-F emette radiazioni in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 700 e 1000 nm; tuttavia per questo lavoro di tesi è stata impiegata un'unica lunghezza d'onda di 820 nm. Il segnale di emissione delle GNPs è raccolto nell'intervallo 550 – 590 nm. Come standard per le misure FCS a 820 nm, è stata usata una soluzione di Rodamina B in acqua.

L'utilizzo di una sorgente laser impulsata nel NIR permette l'eccitazione del fluoroforo mediante un processo di assorbimento a due fotoni, le cui caratteristiche verranno brevemente descritte nel successivo paragrafo.

2.3 Eccitazione mediante un processo di assorbimento a due fotoni

Il processo di assorbimento a due fotoni (TPA) consiste nell'assorbimento da parte di un fluoroforo di due fotoni simultaneamente, ciascuno dei quali contribuisce con un'energia pari alla metà di quella richiesta per indurre l'eccitazione a singolo fotone (Figura 2.5)^{[54][55]}. Pertanto, per i fluorofori che mostrano un assorbimento nella regione del visibile, sono usate tipicamente radiazioni con lunghezza d'onda nel NIR.

Dato che questo processo comporta l'assorbimento simultaneo di due fotoni, la probabilità di assorbimento di due fotoni da parte di molecole fluorescenti è una funzione quadratica dell'intensità di eccitazione^[56].

Per ottenere un'elevata densità di fotoni nel volume focale, in modo tale da garantire un segnale di fluorescenza rilevabile, è necessario ricorrere a laser impulsati a femtosecondi o picosecondi, i quali concentrano il loro output in un breve impulso ad elevata potenza istantanea. I laser più comunemente impiegati sono Ti-zaffiro e Nd:YLF.

Per effetto della dipendenza quadratica dell'assorbimento dall'intensità di eccitazione, la fluorescenza indotta da un processo TPA è localizzata solamente nello spot focale dell'obiettivo del microscopio, dove l'intensità di eccitazione è massima (Figura 2.5).

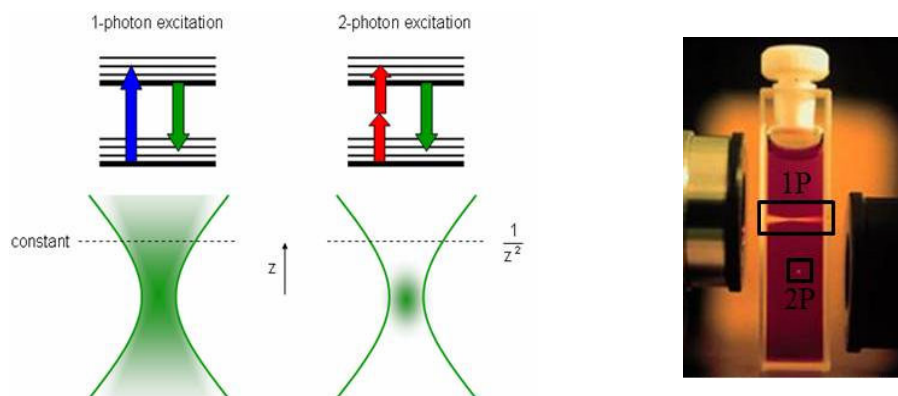


Figura 2.5 Processi di assorbimento ad uno e a due fotoni (immagine a sinistra). Fluorescenza della Rodamina B eccitata ad un fotone (immagine a destra, in alto) e a due fotoni (immagine a destra, in basso)

La risoluzione lungo l'asse z risulta migliorata rispetto a quella ottenuta con eccitazione a un fotone per un microscopio confocale dato che il volume di eccitazione è meno elongato e dipende essenzialmente dall'intensità con cui viene eccitato il campione^[38].

Le principali proprietà delle tecniche di microscopia basate sull'assorbimento a due fotoni sono le seguenti:

1) Nei tessuti biologici il *light scattering* da parte delle particelle (principalmente organelli) decresce all'aumentare della lunghezza d'onda eccitatrice e l'assorbimento da parte di emoglobina e di altre proteine è minimizzato a lunghezze d'onda maggiori^[38]. Di

conseguenza, le lunghezze d'onda corrispondenti all'infrarosso (700-1200 nm, “finestra della pelle”), usate per *imaging* a due fotoni, permettono *profondità di penetrazione* di diverse centinaia di μm nei tessuti superiori rispetto alla microscopia confocale basata sull'assorbimento a un fotone. Questa capacità di *imaging* in tessuti intatti e complessi, come ad esempio i linfonodi, è cruciale nello studio di cellule e delle loro interazioni localizzate entro strutture presenti a centinaia di micrometri al di sotto della superficie del substrato biologico (ad esempio la superficie cutanea).

2) Lunghezze d'onda nell'infrarosso provocano foto-danneggiamento e foto-tossicità relativamente trascurabili. Malgrado una maggiore probabilità di *photobleaching* del fluoroforo nel volume di eccitazione, la probabilità di *bleaching* dell'intera cellula o dell'intero tessuto è sostanzialmente ridotta dato che i processi di foto-danneggiamento sono *confinati* nelle immediate vicinanze del piano focale^{[38][56]}.

3) Gli spettri di eccitazione a due fotoni di molti fluorofori sono allargati rispetto all'eccitazione mediante singolo fotone. L'eccitazione ad una determinata lunghezza d'onda può essere pertanto impiegata per eccitare efficientemente e simultaneamente fluorofori diversi caratterizzati da differenti lunghezze d'onda di emissione.

Eccitazione a uno e a due fotoni sono processi quantomeccanici non equivalenti. Nelle molecole dotate di centro di inversione le transizioni elettroniche permesse per assorbimento a un fotone sono invece proibite per assorbimento di due fotoni e viceversa. Questo fa sì che in questi sistemi molecolari gli spettri di assorbimento a uno e due fotoni siano diversi. D'altra parte la maggior parte dei fluorofori organici, che emettono nel visibile, sono molecole dotate di bassa simmetria e le transizioni elettroniche sono permesse sia attraverso processi di assorbimento a uno che a due fotoni. Dopo l'eccitazione il sistema rilassa non radiativamente allo stato elettronico di più bassa energia, che è lo stato da cui ha origine l'emissione di fluorescenza, per cui le proprietà di emissione non cambiano, sia che il fluoroforo sia eccitato da un singolo fotone sia che lo sia da due.

Fluorofori designati all'eccitazione a singolo fotone non sono necessariamente dotati di un efficiente assorbimento a due fotoni. Molecole π -coniugate con struttura dipolare o quadrupolare possiedono *cross-sections* di assorbimento a due fotoni di due ordini di grandezza superiori rispetto ai fluorofori non coniugati^[56]. La teoria FCS basata sull'eccitazione multifotonica è molto simile a quella che impiega eccitazione mediante fotone singolo. Tuttavia, a causa della dipendenza quadratica dall'intensità nel caso di eccitazione TPA, la forma del volume di eccitazione è differente e fortemente influenzata dall'efficienza di assorbimento del fluoroforo stesso, come pure dall'intensità della radiazione eccitatrice. Per

l'eccitazione a due fotoni il tempo di diffusione che un fluoroforo impiega ad uscire dal volume focale per diffusione libera Browniana è:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{8D}$$

Tale tempo di diffusione è generalmente più piccolo di quello relativo all'eccitazione mediante singolo fotone, essendo più piccolo il volume efficace^[38].

Tuttavia l'uso della spettroscopia FCS con TPA presenta maggiori difficoltà sperimentali, dovute ad un maggiore effetto di danneggiamento dei fluorofori, qualora sia necessario aumentare la potenza di eccitazione per aumentare il numero dei fotoni emessi, con conseguente effetto di allargamento del volume focale. Per ogni fluoroforo, va valutata correttamente la potenza massima utilizzabile per evitare la saturazione di eccitazione ottica.

2.4 Canali microfluidici: preparazione e funzionalizzazione

Con il termine “microfluidica” si intende la tecnologia dei sistemi che manipolano liquidi in quantità 10^{-8} - 10^{-9} litri utilizzando canali polimerici di dimensioni di decine e centinaia di micrometri^[57].

I sistemi microfluidici fanno parte di una classe di sistemi miniaturizzati (i MEMS, Micro Electro Mechanical Systems) capaci di svolgere un gran numero di funzioni (sensori, attuatori, reattori).

All'inizio degli anni '90 fu introdotto il concetto di Lab-On-a-Chip (LOC) che consiste nell'integrare su uno stesso *chip* microfluidico un vero e proprio laboratorio capace di svolgere in sequenza diverse tappe di un processo chimico. Grazie alla miniaturizzazione infatti è divenuto possibile prendere in considerazione sistemi in cui migliaia di reazioni possono essere eseguite in parallelo in maniera automatizzata.

Opportune configurazioni sono state studiate al fine di migliorare il meccanismo di miscelazione di reagenti, altrimenti sfavorito dal regime di flusso laminare che si instaura nei canali di dimensioni micrometrica. La tecnica FCS può essere utilizzata proficuamente per caratterizzare le velocità di flusso di nanoparticelle fluorescenti all'interno di canali microfluidici e permettere in questo modo di caratterizzare le proprietà di flusso all'interno degli stessi dispositivi microfluidici. Nel seguito sono descritti i materiali e i metodi utilizzati per fabbricare i canali microfluidici^{[58][59][60]}.

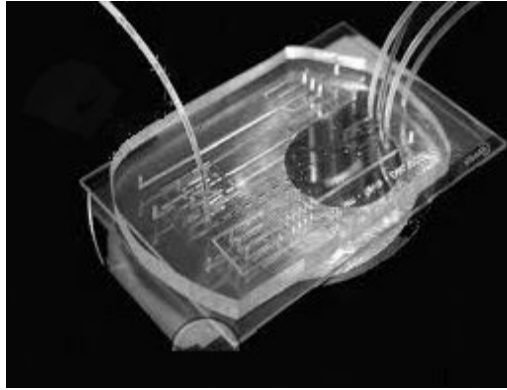


Figura 2.6 Canale microfluidico

2.4.1 PDMS

Polydimethylsiloxane (PDMS) è il materiale polimerico più largamente utilizzato per la realizzazione di prototipi di canali microfluidici nei laboratori di ricerca grazie alle sue utili proprietà, quali trasparenza ottica, resistenza al calore, facile fabbricazione, permeabilità all'ossigeno, oltre al suo basso costo (Figura 2.6).

La superficie di PDMS è caratterizzata, a differenza di quella della silice, da una bassa densità di gruppi silanolici e dalla presenza di gruppi metili (-CH₃). Entrambi i fattori implicano una maggiore idrofobicità e una minore carica superficiale^[61].

L'idrofobicità e il rapido ristabilirsi della stessa, in seguito all'idrofilizzazione superficiale, attribuito alla sua bassa temperatura di transizione vetrosa (inferiore a -120°C), hanno un impatto negativo sulle performance dei canali microfluidici ottenuti con PDMS. L'idrofobicità rende difficoltosa l'introduzione di soluzioni acquose nei microcanali, soprattutto quando le sezioni dei canali sono molto piccole, e comporta l'adsorbimento di analiti idrofobici sulla superficie del PDMS interferendo con l'analisi^{[62][63]}.

2.4.2 Preparazione dei canali microfluidici

La tecnica di microfabbricazione impiegata in questo lavoro di tesi è la litografia di tipo “imprinting”, che consiste nel trasferire un disegno in rilievo precedentemente creato su un supporto rigido, detto *master*, in un sottile strato di polimero^{[57][64]}.

Il primo passaggio nella fabbricazione del circuito microfluidico consiste nella preparazione del master in una resina commerciale fotosensibile (SU-8, MicroChem) depositato su un wafer di silicio, che funge da templatato per la formazione della *replica*. La struttura dei due canali impiegati nel presente lavoro è piuttosto semplice: Y e T (Figura 2.7)

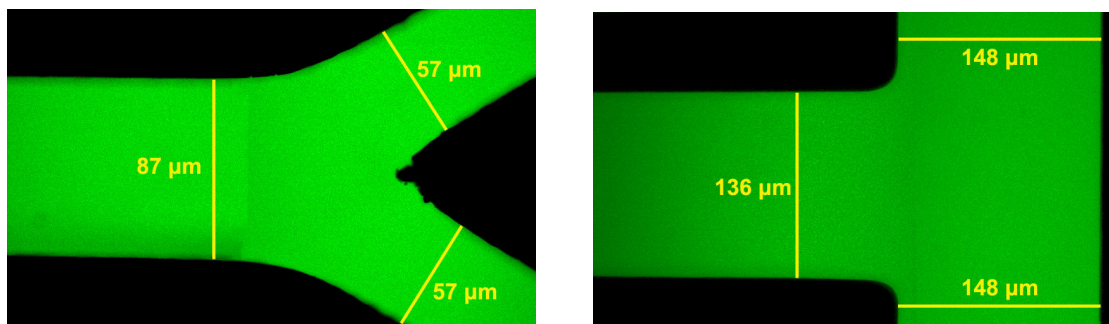


Figura 2.7 Struttura dei due canali microfluidici impiegati in questo lavoro di tesi

Successivamente si prepara la miscela del PDMS pre-polimero ottenuta mescolando il PDMS e il *curing agent* in proporzione 10:1 in peso (Sylgard184, Dow Corning). Dopo aver degasato la miscela con una pompa da vuoto, è sufficiente versarla sul master e procedere con il riscaldamento del sistema a circa 130 °C per favorire il processo di polimerizzazione termica, fino all'ottenimento della replica.

Si stacca la replica in PDMS dal *master* con l'aiuto di una pinzetta, poi con un ago si effettuano dei piccoli fori in corrispondenza delle posizioni in cui si inietterà (inlet) e si scaricherà il liquido (outlet) nel dispositivo finale. Il passaggio successivo consiste nel far aderire la replica di PDMS su un substrato di vetro (Figura 2.8). Questa procedura è stata effettuata mediante *UVO-Cleaner* che consente la rimozione dei residui organici dalle superfici di PDMS e vetro e l'attivazione essenziale delle due superfici affinché aderiscano tra loro, oltre a rendere la superficie di PDMS idrofila. Nel dettaglio il trattamento UVO consiste nell'esposizione ad un'atmosfera di ozono del substrato di vetro per 20 minuti, mentre del PDMS per 3 minuti.

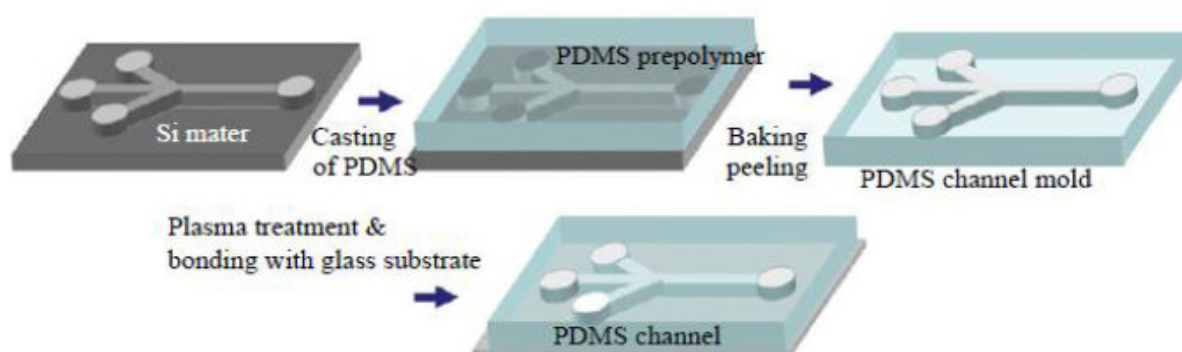


Figura 2.8 Preparazione del microcanale fluidico

Per effettuare misure FCS in flusso, gli *inlet* del canale microfluidico sono collegati ad una pompa a siringa su cui sono inserite e bloccate, nel nostro caso, due siringhe dal contenuto differente, mentre all'*outlet* è collegata una fiala *ependorf* per la raccolta dello scarico.

La pompa a siringa permette la regolazione della velocità del flusso di liquidi nel circuito. Le portate impiegate sono comprese tra 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.4.3 Funzionalizzazione dei canali microfluidici

I canali microfluidici sono stati utilizzati per sondare l'effetto di interazione dinamica tra un flusso di GNPs ed uno della proteina BSA. L'elevata idrofobicità del PDMS provoca però un facile adsorbimento di proteine sulla superficie interna del microcanale. La causa di questo adsorbimento non-specifico è attribuibile principalmente alle proprietà della superficie di PDMS e alla natura delle proteine impiegate. Un accumulo di proteina sulle pareti interne del PDMS comporta una modificazione delle condizioni di lavoro nel sistema, alterando la concentrazione di BSA all'interno del canale.

L'inibizione di questo processo risulta critica soprattutto in sistemi, come quello microfluidico, in cui le dimensioni ridotte del dispositivo (dell'ordine delle decine di micrometri), fanno sì che modificazioni superficiali abbiano un forte impatto sul comportamento globale del sistema.

In letteratura sono riportati innumerevoli metodi di modificazione della superficie di PDMS per evitare adesione di proteine; tra questi i più noti sono trattamento al plasma, trattamento UV, CVD, coating con metalli, silanizzazione, adsorbimento deliberato di proteine^{[62][63][64][65][66][67][68]}.

Whitesides e il suo gruppo hanno recentemente valutato le caratteristiche che i gruppi funzionali o i polimeri legati alle superfici devono possedere per inibire l'adsorbimento di proteine:

- essere idrofilici,
- contenere accettori di legami a idrogeno,
- non contenere donatori di legami a idrogeno,
- possedere carica elettrica globale neutra.

Numerosi studi riportano che la deposizione di poly(ethylen glycol), PEG, su PDMS riduce efficacemente l'adsorbimento non-specifico di proteine.

Il PEG è un poli-etero neutro, lineare o ramificato, disponibile in varietà di differenti pesi molecolari, solubile in acqua e in molti solventi organici (Figura 2.9).

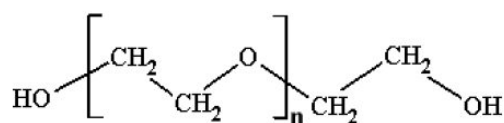


Figura 2.9 Struttura molecolare di poly(ethylen glycol)

Esistono due scuole di pensiero circa la resistenza alle proteine delle superfici ricoperte con PEG. Secondo i modelli *fisici* questa resistenza deriva dalla combinazione di due effetti: lunghezza delle catene polimeriche e densità superficiale di *grafting*. Tuttavia, questi modelli non tengono in considerazione la chimica interfacciale né la struttura molecolare; per di più peccano nel mancato riconoscimento del ruolo dell'acqua nel sistema.

I modelli *chimici* propongono la teoria delle forze di idratazione tra le superfici. Le molecole di acqua possiedono, infatti, siti elettrondonatori (ossigeno) ed elettronnattrattori (idrogeni), mentre il PEG manifesta uno spiccato carattere di base di Lewis dovuto al doppietto di elettroni liberi sugli atomi di ossigeno. Ne consegue che l'interazione tra il PEG e l'acqua risulti molto forte. A causa di questa interazione le proteine vengono respinte dalla superficie del canale ricoperta di PEG perché la sostituzione comporterebbe una penalizzazione entalpica rispetto all'adesione di molecole di acqua^[65].

Sono state eseguite prove di funzionalizzazione a diversi tempi con Fluorescein Isothiocyanate (50nM), m-PEG-CM (2 mg/mL) e PEG 6000 (2 mg/mL).

CAPITOLO3: RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Misure preliminari per la calibrazione del set-up

Preliminarmente ad ogni sessione di misura di FCS, è necessario ottimizzare il set-up ottico sperimentale. Di seguito verrà descritta brevemente la procedura di calibrazione e saranno riportati alcuni parametri critici ottenuti per una soluzione acquosa di Alexa488 (Figura 3.1). Gli spettri di assorbimento ed emissione di questo fluoroforo presentano un picco centrato a 488 e 517 nm rispettivamente. Tali valori sono molto simili a quelli della fluoresceina, tuttavia l'Alexa488 viene preferita per la sua maggiore brillantezza, migliore fotostabilità e bassa sensibilità alle variazioni del pH.

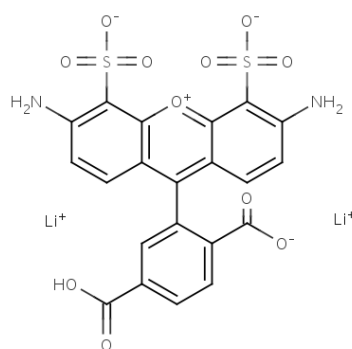


Figura 3.1 Alexa488.

Una soluzione 50 nM di Alexa488 è stata eccitata a $\lambda = 488$ nm, la sua fluorescenza è stata raccolta nell'intervallo 500 – 550 nm. In questa modalità sono state registrate quattro misure in serie per l'ottimizzazione delle condizioni sperimentali. Il tempo di acquisizione per ciascuna misura è di 60 secondi.

I dati riportati nell'intero capitolo sono le medie delle varie misure effettuate in serie e gli errori sono calcolati come semidispersione tra il valore massimo e il valore minimo.

L'ottimizzazione del set-up consiste principalmente nella massimizzazione dell'efficienza della raccolta del segnale di fluorescenza, in modo da rilevare il maggiore segnale dal più piccolo volume efficace. Le accortezze necessarie sono: la centratura dell'emissione raccolta dall'obiettivo nell'apertura confocale e all'ingresso della fibra ottica, l'utilizzo di un'apertura confocale sufficientemente piccola e l'aggiustamento del collare dell'obiettivo.

La *centratura del fascio* si effettua solamente all'accensione dello strumento, prima ad aperture confocali grandi (150 e 200 μm), ottimizzando poi a piccole aperture (100 o 60 μm).

La scelta di un'apertura confocale piccola permette di rigettare efficacemente la fluorescenza generata dai piani fuori fuoco del campione e di ridurre pertanto il volume efficace di emissione.

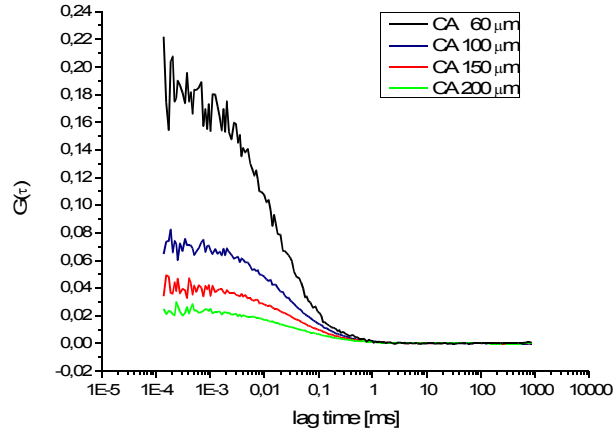


Figura 3.2 Curve di cross-correlazione dell'Alexa488 registrate a differenti aperture confocali: 60, 100, 150, 200 μm .

In Figura 3.2 sono riportate le curve di cross-correlazione registrate con una potenza di eccitazione pari al 3.2% della potenza massima del laser (circa 2 μW sul campione), al variare delle dimensioni dell'*apertura confocale*. Eseguendo il fitting delle curve di cross-correlazione attraverso la seguente equazione si ottengono i dati riportati in Tabella 1:

$$G_{tot}(\tau) = (1 - T + T \cdot e^{-\tau/\tau_i}) \left(\frac{1}{N} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \right] \quad \text{Equazione 3.1}$$

Per l'analisi dei dati, il coefficiente di diffusione dell'Alexa488 in acqua alla temperatura operativa di 22 $^{\circ}\text{C}$ è di 400 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Alle potenze di eccitazione, il contributo delle molecole allo stato di tripletto è piccolo ($T \sim 15\%$). Si può concludere che all'aumentare della dimensione dell'apertura confocale crescano tutti i parametri che definiscono la dimensione del volume focale ($V_{eff} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$). In particolare, l'aumento del tempo di diffusione τ_D è una conseguenza dell'incremento del volume focale nel piano xy (r_0), mentre l'effetto dell'aumento del volume focale anche nella direzione assiale porta all'incremento del numero globale di molecole (N).

CA	N	τ_D [ms]	r_0 [μm]	z_0 [μm]	V [μm^3]
60 μm	5,44	$1,45 \cdot 10^{-2}$	$1,50 \cdot 10^{-1}$	0,89	0,12
100 μm	15,99	$3,05 \cdot 10^{-2}$	$2,21 \cdot 10^{-1}$	1,20	0,32
150 μm	26,28	$3,95 \cdot 10^{-2}$	$2,51 \cdot 10^{-1}$	1,45	0,51
200 μm	57,43	$6,57 \cdot 10^{-2}$	$3,24 \cdot 10^{-1}$	1,83	1,07

Tabella 1

Nelle successive misure verrà impiegata sempre l'apertura confocale di diametro 100 μm . Infine un corretto aggiustamento del *collare dell'obiettivo* da microscopio permette di correggere le aberrazioni indotte dallo spessore del vetrino coprioggetto, posto tra l'obiettivo

e la soluzione di fluoroforo. E' possibile impostare la correzione per il corretto spessore del vetrino attraverso una ghiera posta nella parte terminale dell'obiettivo. L'intervallo di spessori disponibili è compreso tra 160 (posizione 16) e 190 μm (posizione 19). Tale procedura permette l'ottimizzazione dell'efficienza di raccolta e più in generale la maggiore risoluzione delle immagini raccolte in microscopia a fluorescenza. In Figura 3.3 sono riportate le curve di cross-correlazione relative alle diverse posizioni del collare, mentre la Tabella2 fornisce i valori ottenuti dal fitting.

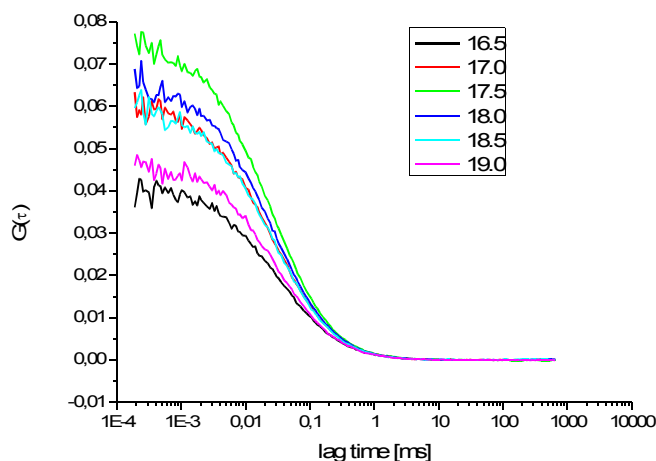


Figura 3.3 Curve di cross-correlazione dell'Alexa488 registrate a differenti posizioni del collare dell'obiettivo.

Posizione Mirino	N	τ_D [ms]	cps	cpm
16,5	29,56	$0,45 \cdot 10^{-1}$	230	7,78
17,0	19,87	$0,36 \cdot 10^{-1}$	244	12,28
17,5	15,48	$0,32 \cdot 10^{-1}$	244	15,80
18,0	17,25	$0,32 \cdot 10^{-1}$	250	14,53
18,5	19,56	$0,35 \cdot 10^{-1}$	230	11,82
19,0	26,17	$0,41 \cdot 10^{-1}$	204	7,91

Tabella2

I valori di *cps* e *cpm* sono rispettivamente il “counts per second” (o intensità di fluorescenza media) e il “counts per second per molecule”, noto anche come brillantezza, ovvero l'efficienza di collezione dei fotoni. Questi parametri risultano correlati secondo la relazione:

$$cpm = cps \cdot G(0) = \frac{cps}{N} \quad \text{Equazione 3.2}$$

A parità di concentrazione di fluoroforo e dimensione dell'apertura confocale, l'efficienza di raccolta per l'esperimento in corso è massimizzata quando è massima la brillantezza registrata.

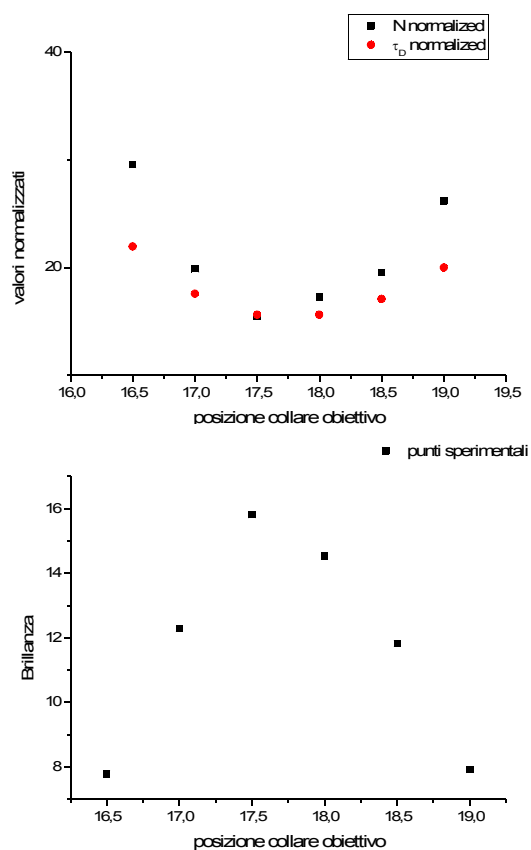


Figura 3.4 Andamenti di τ_D e N (sopra) e della brillantezza (sotto) a differenti posizioni del collare.

In Figura 3.4 sono mostrati gli andamenti di τ_D , N e della brillantezza alle diverse posizioni del collare dell'obiettivo. Analizzando questa figura si può notare come la brillantezza abbia andamento a campana con un massimo nella posizione 17.5 e sia inversamente proporzionale al numero effettivo di molecole N nel volume focale. Alla medesima posizione corrisponde anche il minimo di N e τ_D , indice di una minimizzazione del volume efficace di raccolta di fluorescenza, e verrà pertanto impostata per le successive misure.

Per concludere, sono mostrati i dati ottenuti dalle le curve di cross-correlazione di alcune soluzioni di Alexa488 a differenti concentrazioni (Figura 3.5).

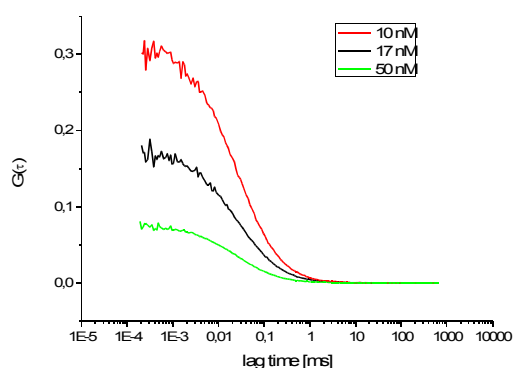


Figura 3.5 Curve di cross-correlazione dell'Alexa488 a differenti concentrazioni.

Al diminuire della concentrazione si verifica un aumento dell'ampiezza di correlazione $G(0)$ essendo inversamente proporzionale al numero di fluorofori N . Di seguito si riportano i valori di N ottenuti dal fitting delle curve alle diverse concentrazioni (Tabella3).

Concentrazione nominale [nM]	Concentrazione misurata [nM]	N
50	49,27	15,48
17	15,98	7,19
10	9,31	3,96

Tabella3

Nella stessa tabella sono annotate sia le concentrazioni nominali sia quelle calcolate mediante l'analisi FCS, ottenute dalla relazione $C = \langle N \rangle / V_{eff}$. Le concentrazioni calcolate sono in perfetto accordo con i valori nominali; tale risultato sperimentale evidenzia la potenzialità della tecnica FCS per l'analisi di soluzioni a concentrazioni nanomolari.

3.2 Misure FCS di GNPs in acqua

Nei prossimi paragrafi verrà valutata la variazione del raggio idrodinamico delle GNPs in seguito all'interazione con BSA a differenti concentrazioni. Essendo il coefficiente di diffusione delle GNPs ignoto, è stato necessario effettuare delle misure preliminari per la calibrazione di alcuni parametri utili alla successiva analisi e interpretazione delle curve di FCS registrate per le soluzioni GNPs-BSA. Nel caso delle GNPs prima del calcolo delle curve di cross-correlazione è importante eliminare dalla traccia dell'intensità di fluorescenza gli *spikes* più intensi e allargati associati alla presenza di aggregati.

3.2.1 Eccitazione delle GNPs a varie potenze

I primi esperimenti FCS consistono nello studio della luminescenza delle GNPs nell'intervallo 550 – 590 nm in seguito all'assorbimento di due fotoni a 820 nm. Lo stesso intervallo di raccolta dell'emissione è stato impiegato anche per le misure di calibrazione del set-up sperimentale con il fluoroforo RodaminaB.

Per queste misure sono state utilizzate GNPs il cui raggio stimato mediante fitting di Mie degli spettri di assorbimento UV-Visibile risulta essere pari a 7 nm.

In primo luogo sono state effettuate serie di misure a potenze di eccitazione comprese tra 17.9 e 25.5 mW. In Figura 3.6 sono riportate alcune curve di correlazione relative a quattro differenti potenze. Ciascuna di queste è caratterizzata dal contributo di diffusione traslazionale a tempi lunghi (ms) e da quello di diffusione rotazionale a tempi brevi (μ s).

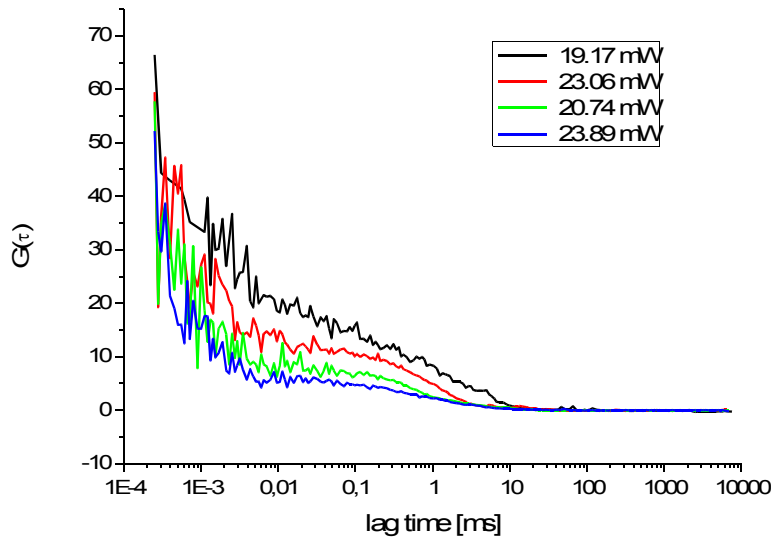


Figura 3.6 Curve di cross-correlazione di nanoparticelle d'oro a differenti potenze di eccitazione.

Assumendo che i due processi siano indipendenti tra loro, la formula usata per il fitting delle curve è data dal prodotto delle relative funzioni di correlazione:

$$G_{tot}(\tau) = \left[1 + C \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_r}\right) \right] \left(\frac{1}{N} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D} \right) \right]^{-1/2}$$

Equazione 3.3

dove τ_r e τ_D sono rispettivamente i tempi di diffusione rotazionale e traslazionale, mentre C ed $1/N$ sono le ampiezze della parte rispettivamente rotazionale e traslazionale.

Dai rispettivi fitting si ricavano i valori medi riportati in Tabella4:

Potenza di eccitazione [mW]	C	Tr·10 ⁻⁴ [ms]	N·10 ⁻¹	Td·10 ⁻¹ [ms]
17,87	8,94 ± 0,98	3,81 ± 0,36	0,73 ± 0,06	2,93 ± 0,98
19,17	6,59 ± 0,61	4,41 ± 0,37	0,68 ± 0,05	5,36 ± 0,11
20,74	7,83 ± 0,76	4,47 ± 0,42	1,17 ± 0,08	2,88 ± 0,92
21,94	10,14 ± 1,03	4,14 ± 0,33	1,13 ± 0,09	3,11 ± 0,91
23,06	5,22 ± 0,35	6,53 ± 0,50	0,96 ± 0,41	4,40 ± 0,82
23,89	8,51 ± 0,67	4,05 ± 0,32	1,31 ± 0,07	3,37 ± 0,86
24,72	9,25 ± 0,92	2,95 ± 0,21	1,30 ± 0,08	3,01 ± 0,08
25,46	7,09 ± 0,48	3,92 ± 0,28	1,30 ± 0,06	4,08 ± 0,09

Tabella 4

Risulta interessante graficare i parametri N e C in funzione della potenza di eccitazione (Figura 3.7).

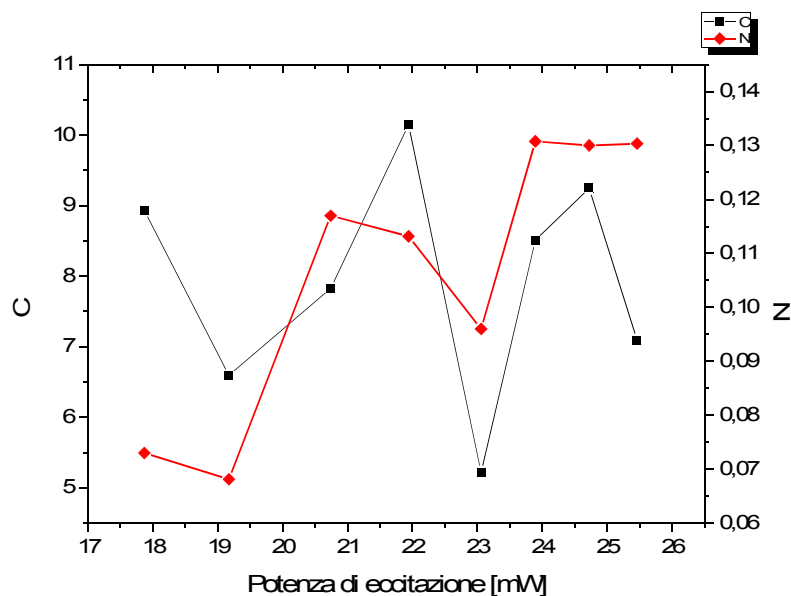


Figura 3.7 Evoluzione dei parametri C e N all'aumentare della potenza di eccitazione.

All'aumentare della potenza di eccitazione è confermato lo stesso andamento crescente di N, come riportato da *Loumagne* nel 2010^[44] (Figura 1.20). In Figura 3.7 si vede che a basse potenze il numero di particelle fluorescenti è basso per cui si può ipotizzare la presenza di pochi siti attivi luminescenti sulla superficie delle GNPs. Come suggerito dallo stesso autore, probabilmente ad elevate potenze è favorita la migrazione degli ioni citrato sulla superficie della particella con conseguente formazione di un numero maggiore di “trappole fluorescenti”. Il numero di siti fluorescenti all'interno del volume focale risulta infatti aumentato, con conseguente diminuzione dell'ampiezza $G(0)$.

L'ampiezza della parte rotazionale, che viene quantificata con il parametro C, risulta abbastanza costante al variare della potenza suggerendo che non vi sia perdita di anisotropia nella luminescenza delle particelle.

3.2.2 Calibrazione del volume focale mediante eccitazione a due fotoni della RodaminaB

Come anticipato nel Capitolo 1 mediante la relazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta \cdot R_H} \quad \text{Equazione 3.4}$$

(dove $k_B = 1,3806504 \cdot 10^{-23}$ J/K è la costante di Boltzman, T è la temperatura assoluta e η è la viscosità della soluzione) è possibile correlare il coefficiente di diffusione D del fluoroforo analizzato con il suo raggio idrodinamico R_H . Il coefficiente di diffusione delle GNPs però non è noto, essendo incognito il loro raggio idrodinamico. Un espediente per la risoluzione di questo problema consiste nell'applicare l'equazione di Stokes-Einstein in combinazione con la

definizione di tempo di diffusione traslazionale, che nel caso di eccitazione a due fotoni è:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{8D} \quad \text{Equazione 3.5}$$

Sostituendo l'espressione per D ricavata dalla precedente relazione nell'equazione 3.4, si ottiene una relazione per la stima del raggio idrodinamico incognito R_D :

$$R_D = \frac{k_B T \cdot 8\tau_D}{6\pi\eta \cdot r_0^2} \quad \text{Equazione 3.6}$$

Per poter applicare quest'equazione è necessario, oltre a misurare il tempo di diffusione traslazionale per il campione incognito, determinare l'esatta forma del volume focale, in particolare il valore di r_0 , semi-larghezza del volume nel piano xy. Tale calibrazione viene effettuata mediante misure FCS di un campione di riferimento avente coefficiente di diffusione noto. Per i nostri esperimenti, come standard per la calibrazione è stata utilizzata una soluzione 100 nM di RodaminaB (Figura 3.8), cromoforo della famiglia degli xanteni.

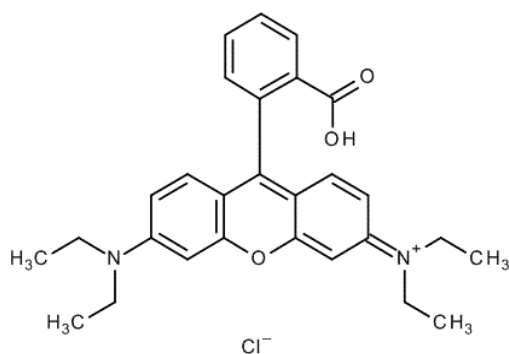


Figura 3.8 RodaminaB.

Il fluoroforo è stato eccitato a due fotoni alla stessa lunghezza d'onda delle GNPs, 820 nm, e ne è stata raccolta la fluorescenza in una serie di quattro misure.

La Figura 3.9 esibisce la curva di cross-correlazione relativa alla soluzione di RodaminaB eccitata alla potenza 24.2 mW.

Nella curva di correlazione della RodaminaB non è visibile il contributo di diffusione rotazionale, che probabilmente, a causa delle sue piccole dimensioni, cade nell'intervallo temporale dei nanosecondi come avviene per altri fluorofori organici. La RodaminaB è interessata dalla diffusione traslazionale, nella scala dei millisecondi, e dal processo di *blinking*, cioè di trasferimento allo stato di tripletto nella scala dei microsecondi.

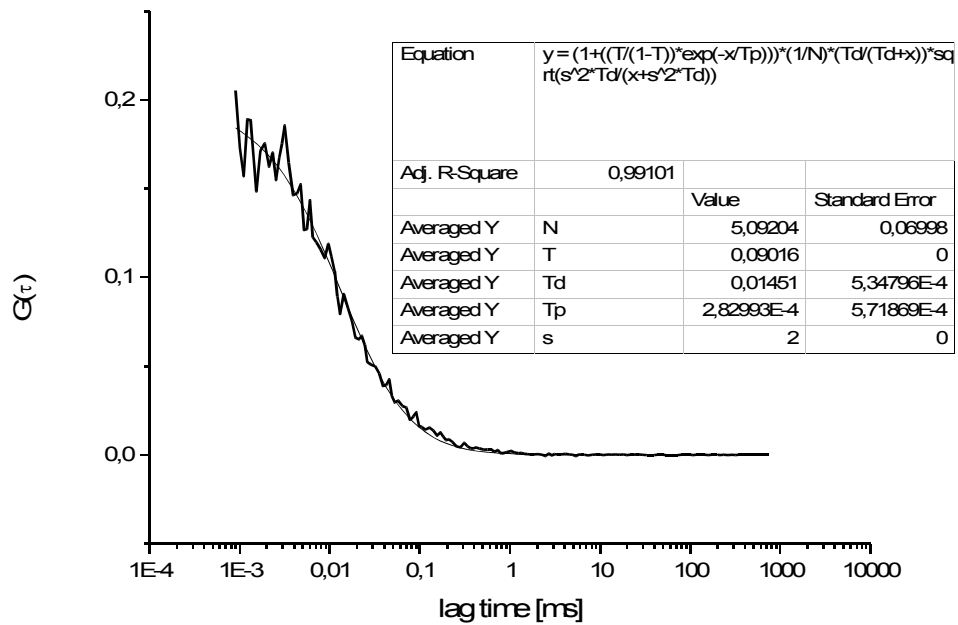


Figura 3.9 Curva di cross-correlazione di RodaminaB eccitata alla potenza 24.2 mW.

Nell'ipotesi in cui i due processi siano indipendenti tra loro è possibile eseguire il fitting della curva utilizzando l'Equazione 3.1 data dal prodotto delle due funzioni di correlazione relative a diffusione e *blinking*, qui riproposta:

$$G_{tot}(\tau) = (1 - T + T \cdot e^{-\tau/\tau_t}) \left(\frac{1}{N}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]^{-1/2}$$

dove τ_t è il tempo di vita medio dello stato di tripletto.

Dal fitting si ottengono i valori medi dei tempi caratteristici per i due processi:

$$\tau_D = (1.41 \pm 0.11) \cdot 10^{-2} \text{ ms}$$

$$\tau_t = (2.72 \pm 0.26) \cdot 10^{-4} \text{ ms}$$

Assumendo che la soluzione di RodaminaB abbia la medesima viscosità dell'acqua alla temperatura di 22 °C, ovvero $\eta = 0.001 \text{ Ns/m}^2$, il suo coefficiente di diffusione nelle stesse condizioni è stimato essere $(400 \pm 15) \mu\text{m}^2/\text{s}$. Inserendo all'interno dell'Equazione 3.5 i valori di D e di τ_D appena ricavati si può ottenere la semi-larghezza del volume focale nel piano xy:

$$r_0 = 0.218 \pm 0.008 \mu\text{m}.$$

3.2.3 Determinazione del raggio idrodinamico delle GNPs in acqua

Le misure FCS per il raggio idrodinamico delle GNPs in acqua sono state effettuate diluendo la soluzione nativa 1:2 in acqua. Questo permette di avere un confronto diretto con le

successive misure FCS di soluzioni preparate mescolando uguali volumi di particelle e BSA. In Figura 3.10 è riportata la curva sperimentale di correlazione e il fitting basato sull'Equazione 3.3 per le GNPs eccitate alla potenza di 23.9 mW.

Dal fitting della curva sperimentale si ottengono i seguenti tempi di diffusione medi:

$$\tau_D = (4.45 \pm 0.57) \cdot 10^{-1} \text{ ms}$$

$$\tau_r = (6.25 \pm 0.45) \cdot 10^{-4} \text{ ms}$$

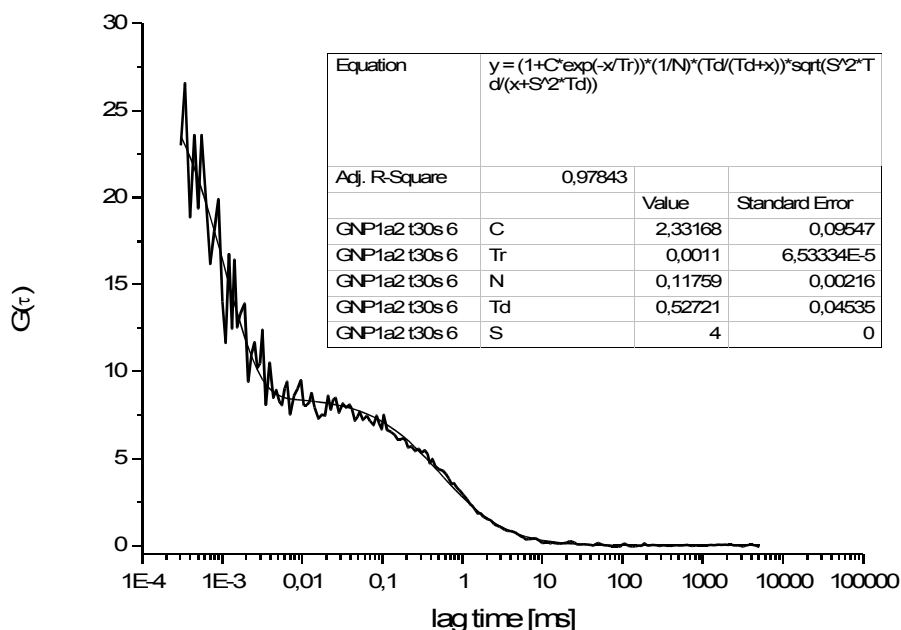


Figura 3.10 Curva di cross-correlazione della soluzione di GNPs diluita 1:2 in acqua con eccitazione alla potenza 23.9 mW.

Usando questi due tempi di diffusione, si possono ottenere due stime indipendenti del raggio idrodinamico delle GNPs. Per il contributo di diffusione traslazionale si usa l'Equazione 3.6,

$$R_D = \frac{k_B T \cdot 8 \tau_D}{6 \pi \eta \cdot r_0^2}$$

dove r_0 è il volume focale precedentemente calibrato con la RodaminaB alla medesima potenza di eccitazione.

E' possibile altresì determinare il raggio idrodinamico dal contributo rotazionale della curva di correlazione^[38] attraverso la definizione di τ_r (Equazione 3.8):

$$\tau_r = \frac{V \eta}{k_B T} = \frac{4 \pi R^3 \eta}{3 k_B T} \quad \text{Equazione 3.8}$$

dove V è il volume della particella approssimato ad una sfera. Da questa si ottiene il raggio

idrodinamico R_r :

$$R_r = \left(\frac{3k_B T \cdot \tau_r}{4\pi\eta} \right)^{1/3} \quad \text{Equazione 3.9}$$

Approssimando la viscosità della soluzione delle GNPs a quella dell'acqua ($\eta = 0.001 \text{ Ns/m}^2$) e applicando le Equazioni 3.6 e 3.9 si ricavano i seguenti raggi:

$$R_D = 16.19 \pm 1.05 \text{ nm}$$

$$R_r = 8.47 \pm 0.61 \text{ nm}$$

Non esiste alcun motivo per il quale i raggi ricavati dai due contributi di diffusione debbano differire. Dalla relazione 3.9 si può osservare come il contributo rotazionale sia indipendente dai parametri del set-up ottico, al contrario di quello traslazionale che è invece proporzionale a r_0 , e risulta pertanto meno affetto da artefatti sperimentali derivanti in particolare dalla calibrazione del volume focale. Inoltre la parte di curva corrispondente alla diffusione rotazionale nei microsecondi non risulta affetta dall'eventuale presenza di aggregati di GNPs: ad esempio, per un aggregato avente dimensione di 50 nm il tempo τ_r calcolato è di circa 0.1 ms sovrapponendosi pertanto alla componente di diffusione traslazionale della curva FCS. Per questi motivi si preferisce effettuare il calcolo del raggio prendendo in considerazione solamente la componente di diffusione rotazionale.

Sulla base di queste considerazioni si può concludere che le misure di FCS forniscono un raggio medio delle GNPs ricoperte di citrato pari a $R_H = 8.47 \pm 0.61 \text{ nm}$, in buon accordo con il valore di 7 nm stimato dallo spettro di assorbimento.

La stima del raggio da τ_D è circa doppia rispetto a quella calcolata con τ_r . L'approssimazione fatta per R_D è che il volume focale possa essere calibrato usando un fluoroforo diverso dalle GNPs. Nonostante entrambi i fluorofori siano sottoposti ad assorbimento di due fotoni alla medesima lunghezza d'onda e potenza d'irraggiamento simili, le proprietà fotofisiche cambiano per i due campioni. Le sezioni d'urto di assorbimento delle GNPs e della RodaminaB sono sicuramente differenti per cui non è corretto trattare i due sistemi come se fossero analoghi. Inoltre le soglie per il processo di *photobleaching* per i due composti possono variare. La sovrastima del raggio R_D infatti potrebbe derivare da una sottostima del raggio focale r_0 calibrato con la misura di τ_D per la RodaminaB, indice probabilmente di un processo di danneggiamento delle molecole fluorescenti in seguito all'alta intensità incidente. In modo indiretto, è possibile ricalibrare la dimensione di r_0 utilizzando come riferimento la stima del raggio idrodinamico ottenuta dall'analisi del contributo rotazionale. Per la potenza di eccitazione e nelle condizioni sperimentali utilizzate, r_0 così stimato risulta pari a 0.30 μm .

3.3 Stima delle viscosità delle soluzioni a diverse concentrazioni di BSA

Per una corretta determinazione del raggio idrodinamico, attraverso misure di FCS, è necessario definire con precisione le viscosità delle soluzioni esaminate, in particolare quando il solvente è diverso dalla sola acqua. La viscosità di qualunque soluzione è fortemente dipendente dalla temperatura e dalle caratteristiche di soluto e solvente. Un metodo classico di misura della viscosità consiste nel misurare il tempo che un fluido impiega a transitare attraverso un capillare di vetro di lunghezza nota, confrontandolo con il tempo impiegato da una soluzione a viscosità nota. Purtroppo i viscosimetri in nostro possesso richiedono volumi sostanziosi di proteina, superiori alle quantità a nostra disposizione, pertanto si propongono due alternative. La prima consiste nella determinazione della viscosità della BSA mediante una retta di taratura ricavata da misure FCS usando come *tracer* un fluoroforo standard solubilizzato in soluzioni acquose a concentrazioni crescenti di BSA, la seconda nel calcolo della viscosità basandosi su dati riportati in letteratura.

3.3.1 Misure FCS

Al fine di determinare in maniera indiretta la viscosità delle soluzioni di GNPs e albumina sono state preparate quattro soluzioni mescolando volumi uguali di un fluoroforo e di una soluzione di BSA a differente concentrazione. Le concentrazioni di BSA nelle soluzioni finali sono comprese nell'intervallo 0.5 μM –500 μM .

La calibrazione è stata effettuata con la RodaminaB utilizzando eccitazione a due fotoni a 820 nm e con l'Alexa488 eccitando il campione ad un fotone a 488 nm.

Nell'ipotesi in cui la RodaminaB e l'Alexa488 non interagiscano con la BSA, e quindi i loro raggi idrodinamici non varino, le eventuali variazioni dei tempi di diffusione misurati sono dovute solo all'aumento della viscosità delle soluzioni contenenti BSA.

Innanzitutto sono stati eseguiti i *fitting* delle curve di cross-correlazione (Equazione 3.1) di entrambi i fluorofori in acqua. Non essendo presente la componente rotazionale nelle curve di cross-correlazione, per il calcolo del raggio viene analizzata la componente di diffusione traslazionale.

Dal *fitting* si ricavano i seguenti valori medi (Tabella5):

Dye	$\tau_D \cdot 10^{-2}$ [ms]	$r_0 \cdot 10^{-1}$ [μm]
Rodamina B	1,41 \pm 0,11	2,18 \pm 0,51
Alexa488	3,59 \pm 0,13	2,39 \pm 0,02

Tabella5

Non è possibile effettuare confronti diretti tra fluorofori sottoposti a differenti processi di

assorbimento, dato che anche le definizioni di tempo di diffusione traslazionale differiscono di un fattore $\frac{1}{2}$, tuttavia si può osservare che il τ_D della RodaminaB risulta leggermente inferiore rispetto a quello dell'Alexa488 probabilmente a causa della, seppur minima, differenza di volume focale nei due set-up.

Trattandosi di soluzioni acquose di fluorofori si approssima la viscosità della soluzione a quella dell'acqua alla temperatura di 22 °C ($\eta = 0,001 \text{ Ns/m}^2$). Utilizzando per la RodaminaB l'Equazione 3.6, di seguito riproposta:

$$R_D = \frac{k_B T \cdot 8 \tau_D}{6 \pi \eta \cdot r_0^2} \quad \text{Equazione 3.6}$$

e per l'Alexa488 l'Equazione 3.6bis:

$$R_D = \frac{k_B T \cdot 4 \tau_D}{6 \pi \eta r_0^2} \quad \text{Equazione 3.6bis}$$

dai rispettivi valori di τ_D e r_0 si calcolano i raggi idrodinamici medi:

$$R_D (\text{RodaminaB}) = 0.515 \pm 0.008 \text{ nm}$$

$$R_D (\text{Alexa488}) = 0.522 \pm 0.002 \text{ nm}$$

Invocando l'ipotesi iniziale secondo la quale i due fluorofori non interagiscono con la BSA è possibile mantenere costanti i raggi idrodinamici e procedere con le misure FCS delle soluzioni di fluoroforo e BSA per la determinazione delle rispettive viscosità. Inoltre trattandosi di misure eseguite in serie nell'arco di qualche ora senza apportare modifiche nell'allineamento ottico, sembra corretto ritenere che il volume focale non subisca alcuna variazione, pertanto, nei successivi calcoli verranno utilizzati i valori di r_0 ricavati dai fitting dei fluorofori diluiti in acqua riportati in tabella 5.

Le Figure 3.11 e 3.12 riportano le curve di correlazione relative alla RodaminaB/Alexa488 e alla BSA alle seguenti concentrazioni: 0.5 μM , 5 μM , 50 μM e 500 μM . Per entrambi i fluorofori, le curve manifestano un evidente spostamento a tempi maggiori all'aumentare della concentrazione di BSA.

Attraverso lo stesso fitting utilizzato per i fluorofori in acqua (Equazione 3.1), si ricavano i valori medi dei tempi di diffusione traslazionale riportati in Tabella 6:

Concentrazione BSA [μM]	$\tau_D \cdot 10^{-2}$ RodaminaB-BSA [ms]	$\tau_D \cdot 10^{-2}$ Alexa488-BSA [ms]
0,5 μM	1,22 \pm 0,16	3,97 \pm 0,14
5 μM	2,60 \pm 0,49	7,56 \pm 0,34
50 μM	2,08 \pm 0,46	12,77 \pm 1,12
500 μM	5,39 \pm 0,81	15,15 \pm 0,22

Tabella6

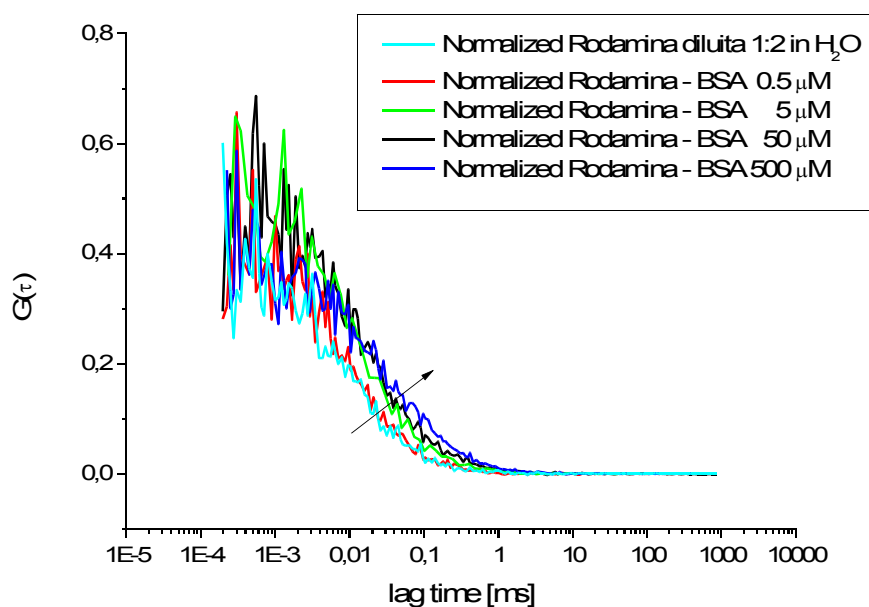


Figura 3.11 Curve di cross-correlazione normalizzate della RodaminaB diluita in acqua (curva azzurra) e della RodaminaB mescolata a soluzioni di BSA aventi concentrazioni 0.5 μM , 5 μM , 50 μM e 500 μM .

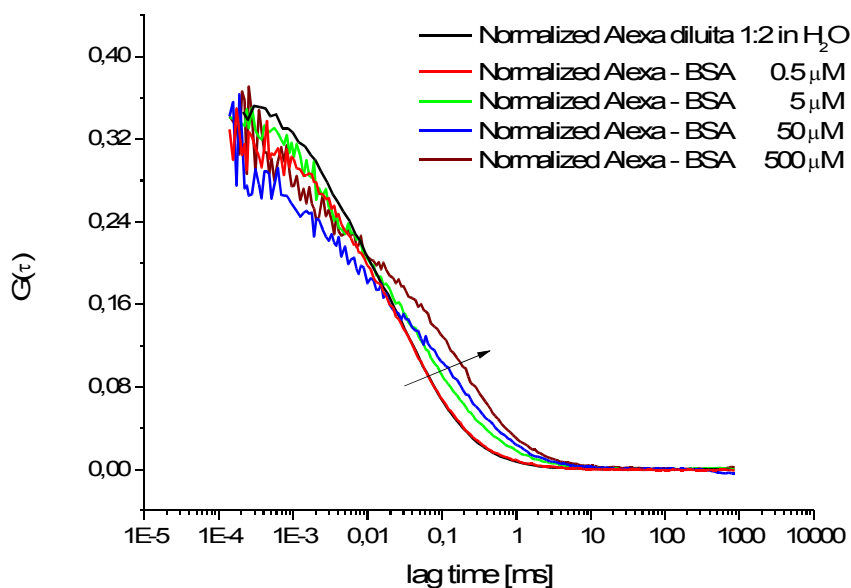


Figura 3.12 Curve di cross-correlazione normalizzate dell'Alexa488 diluita in acqua (curva nera) e dell'Alexa488 mescolata a soluzioni di BSA aventi concentrazioni 0.5 μM , 5 μM , 50 μM e 500 μM .

Ad eccezione del caso della soluzione di RodaminaB e BSA alla concentrazione 50 μM , che può rappresentare un errore di misura, per entrambi i fluorofori si osserva una progressiva crescita del tempo di diffusione, τ_D , all'aumentare della concentrazione di BSA.

Dalle Equazioni 3.9 e 3.9bis si può esplicitare l'incognita viscosità, ottenendo per la RodaminaB:

$$\eta = \frac{k_B T \cdot 8\tau_D}{6\pi R_D \cdot r_0^2} \quad \text{Equazione 3.10}$$

e per l'Alexa488:

$$\eta = \frac{k_B T \cdot 4\tau_D}{6\pi R_D \cdot r_0^2} \quad \text{Equazione 3.10bis}$$

Le viscosità calcolate per le soluzioni del fluoroforo con la BSA a varie concentrazioni sono riportate in Tabella7:

Concentrazione BSA [μM]	η Rodamina B-BSA [Ns/m^2]	η Alexa488-BSA [Ns/m^2]
0,5 μM	$(8,67 \pm 2,22) \cdot 10^{-4}$	$(1,15 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$
5 μM	$(1,84 \pm 0,78) \cdot 10^{-3}$	$(2,19 \pm 0,01) \cdot 10^{-3}$
50 μM	$(1,47 \pm 0,42) \cdot 10^{-3}$	$(3,70 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$
500 μM	$(3,81 \pm 0,33) \cdot 10^{-3}$	$(4,39 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$

Tabella7

L'errore della misura FCS della soluzione contenente la BSA alla concentrazione 50 μM si è propagato nel calcolo della relativa viscosità che risulta pertanto inferiore rispetto all'andamento crescente. Si nota un maggiore aumento della viscosità nelle soluzioni di Alexa488 e BSA.

3.3.2 Letteratura

Quando una soluzione di BSA è addizionata ad una soluzione acquosa si assiste ad un aumento della viscosità. Questo effetto dovuto alla presenza della proteina è solitamente espresso come *viscosità specifica* η_{sp} :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \quad \text{Equazione 3.11}$$

in cui η ed η_0 sono le viscosità rispettivamente della soluzione finale e della soluzione acquosa iniziale. La viscosità specifica dipende fortemente dalla concentrazione e dalla natura dell'interazione tra la BSA e la soluzione iniziale^{[69][70][71]}. La sua dipendenza dalla concentrazione di BSA viene comunemente espressa con la seguente espansione in serie:

$$\eta_{sp} = [\eta]C + k_1[\eta]^2 C^2 + k_2[\eta]^3 C^3 + \dots \quad \text{Equazione 3.12}$$

dove C è la concentrazione di BSA (g/dL), mentre k_1, k_2 sono costanti adimensionali.

Dividendo entrambi i termini dell'Equazione 3.12 per C e troncando l'espressione di destra al secondo termine, possibile nel caso in cui la soluzione sia diluita, si ottiene l'**equazione di Huggins**:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C \quad \text{(Equazione 3.13)}$$

k_H è chiamata costante di Huggins e dipende dalle condizioni di solvatazione^{[72][73]}.

Una quantità relativa a η_{sp} ma indipendente dalla concentrazione è la *viscosità intrinseca* η_{intr} . Quest'ultima è espressa in dL/g ed è definita come il valore che assume η_{sp}/C per concentrazioni tendenti a zero:

$$[\eta]_{intr} = \lim_{C \rightarrow 0} \left[\frac{\eta_{sp}}{C} \right] \quad \text{(Equazione 3.14)}$$

Il calcolo della viscosità delle soluzioni di BSA si effettua combinando le Equazioni 3.11, 3.13 e 3.14 ed ottenendo la seguente relazione:

$$\eta = \eta_0 (1 + [\eta]_{intr} C + k_H [\eta]_{intr}^2 C^2) \quad \text{(Equazione 3.15)}$$

Il valore della costante di Huggins k_H riportato in letteratura [*Colloidal Polym Sci*, **2008**] per la BSA è compreso tra 0.89 e 1.42, mentre la viscosità intrinseca η_{intr} è riportata nel foglio di specifiche che accompagna il prodotto ed è pari a 0.0413 dL/g.

Nel prossimo paragrafo si riporteranno i risultati relativi allo studio dell'interazione GNP - BSA effettuato attraverso misure FCS. Le concentrazioni di BSA presenti nelle soluzioni da misurare sono riportate in Tabella8 con il corrispondente valore di viscosità calcolato mediante l'Equazione 3.15 assumendo η_0 pari alla viscosità dell'acqua, 0.001 Ns/m², e scegliendo il valore $k_H = 0.9$. Le concentrazioni riportate in Tabella8 sono quelle della BSA presente nelle soluzioni finali.

C_{BSA} [μM]	$\eta \cdot 10^{-3}$ [Ns/m ²]
0,05	1,000
0,25	1,000
0,37	1,000
0,5	1,000
2,5	1,000
3,7	1,001
5	1,001
25	1,007
50	1,010
250	1,070
375	1,112
500	1,153

Tabella8

I valori delle viscosità calcolate con l'equazione 3.15 sono concordi con quelli riportati in alcuni studi in letteratura [K. Monkos, *International Journal of Biological Macromolecules*, **1996**, 18, 61-68; M. Heinen, F. Zanini, F. Roosen-Runge, D. Fedunov, F. Zhang, M. Hennig, T. Seydel, R. Schweins, M. Sztucki, M. Antalík, F. Schreiber and G. Nagele, *Soft Matter*, **2012**, 8, 1404-1419].

È importante osservare come i valori calcolati non siano in accordo con quelli misurati precedentemente per le soluzioni Alexa488-BSA e RodaminaB-BSA, a parità di concentrazione di proteina. In particolare, i valori della viscosità misurati sono sempre superiori a quelli calcolati.

Questi valori di viscosità sono stati determinati ipotizzando che la BSA non interagisca con i due fluorofori, cosa alquanto inverosimile dato che sia la RodaminaB sia Alexa488 sono cariche per cui è probabile che formino legami con i residui amminoacidici carichi della BSA. Pertanto, per le successive analisi verranno usati i valori calcolati per la viscosità, piuttosto che quelli misurati sperimentalmente.

3.4 Misure FCS di GNPs e BSA

In questo paragrafo verranno riportati i dati relativi alle misure FCS effettuate su GNPs e BSA con lo scopo di determinare il raggio idrodinamico medio delle particelle quando sono mescolate a concentrazioni crescenti di albumina.

Pochi μL di soluzione nativa di GNPs sono stati mescolati con volumi uguali delle soluzioni di BSA precedentemente preparate in modo tale da ottenere nelle soluzioni finali le seguenti concentrazioni di BSA: 0.05, 0.25, 0.37, 0.5, 2.5, 3.7, 5, 25, 50, 250, 375 e 500 μM .

Così facendo si mantiene la diluizione 1:2 rendendo possibile il confronto con i risultati delle misure FCS dei fluorofori con la BSA. Prima di effettuare le misure sono stati attesi 10 minuti affinché le soluzioni di GNPs e BSA fossero stabilizzate.

Come nel caso della RodaminaB e delle GNPs in acqua, tutte le soluzioni di GNPs-BSA sono state sottoposte ad assorbimento di due fotoni a 820 nm. Per ottenere un vero confronto dei dati è stata impiegata, entro i limiti dell'errore sperimentale, la stessa potenza di eccitazione delle precedenti misure, ovvero 23.9 mW. La Figura 3.13 riporta le curve di cross-correlazione relative ad alcune soluzioni esaminate. Nelle curve di correlazione sono presenti a differenti scale temporali il contributo di diffusione rotazionale (nei microsecondi) e quello di diffusione traslazionale (nei millisecondi), esattamente come riscontrato per le nanoparticelle in acqua nel paragrafo 3.2.1. L'effetto più evidente nelle curve è lo spostamento della diffusione a tempi maggiori all'aumentare della concentrazione di albumina.

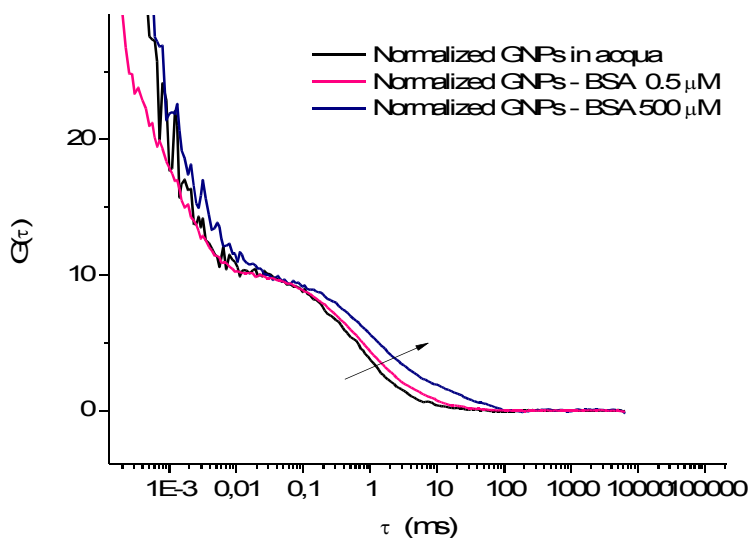


Figura 3.13 Curva di cross-correlazione delle soluzioni di GNPs e BSA alle concentrazioni 0, 0.5 e 500 μM

Il *fitting* delle curve di correlazione è stato eseguito utilizzando l'equazione 3.3, di seguito riproposta:

$$G_{tot}(\tau) = \left[1 + C \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_r}\right) \right] \cdot \left(\frac{1}{N}\right) \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \right]$$

In Tabella9 sono riportati i valori medi dei tempi τ_D e τ_r ottenuti dai *fitting* delle curve a diverse concentrazioni:

$C_{BSA} [\mu\text{M}]$	$\tau_D [\text{ms}]$	$\tau_r [\text{ms}]$
0	$(4,45 \pm 0,57) \cdot 10^{-1}$	$(6,25 \pm 0,45) \cdot 10^{-4}$
0,05	$(6,82 \pm 0,47) \cdot 10^{-1}$	$(9,36 \pm 0,43) \cdot 10^{-4}$
0,25	$(6,82 \pm 0,38) \cdot 10^{-1}$	$(1,26 \pm 0,51) \cdot 10^{-3}$
0,37	$(7,42 \pm 0,36) \cdot 10^{-1}$	$(1,29 \pm 0,50) \cdot 10^{-3}$
0,5	$(7,50 \pm 0,55) \cdot 10^{-1}$	$(1,39 \pm 0,21) \cdot 10^{-3}$
2,5	$(6,66 \pm 0,45) \cdot 10^{-1}$	$(1,36 \pm 0,38) \cdot 10^{-3}$
3,7	$(6,98 \pm 0,27) \cdot 10^{-1}$	$(1,35 \pm 0,36) \cdot 10^{-3}$
5	$(7,03 \pm 0,22) \cdot 10^{-1}$	$(2,10 \pm 0,49) \cdot 10^{-3}$
25	$(6,40 \pm 0,25) \cdot 10^{-1}$	$(2,09 \pm 0,18) \cdot 10^{-3}$
50	$(6,60 \pm 0,45) \cdot 10^{-1}$	$(1,91 \pm 0,37) \cdot 10^{-3}$
250	$1,18 \pm 0,30$	$(3,34 \pm 0,28) \cdot 10^{-3}$
375	$1,38 \pm 0,54$	$(2,84 \pm 0,43) \cdot 10^{-3}$

Tabella9

Come si può notare entrambi i tempi di diffusione seguono un andamento mediamente crescente. Soprattutto alle massime concentrazioni di BSA, a causa della plausibile presenza di aggregati, risulta più difficile eseguire il *fitting* della curva sulla parte caratteristica della diffusione traslazionale, che pertanto può fornire un dato non molto affidabile.

Ora è possibile procedere con la determinazione dei raggi idrodinamici R_D e R_r a partire da entrambi i contributi diffusivi. Per poterlo fare è necessario ricorrere alle Equazioni 3.6 e 3.9, che per chiarezza vengono di seguito riscritte:

$$R_D = \frac{k_B T \cdot 8\tau_D}{6\pi\eta \cdot r_0^2} \quad \text{Equazione 3.6}$$

$$R_r = \left(\frac{3k_B T \cdot \tau_r}{4\pi\eta} \right)^{1/3} \quad \text{Equazione 3.9}$$

In entrambe le equazioni a denominatore compare la viscosità della soluzione misurata. Per ogni concentrazione di BSA, sono stati usati i valori riportati in Tabella 8.

I raggi idrodinamici derivanti dai contributi di diffusione traslazionale delle curve di correlazione si calcolano inserendo nell'Equazione 3.6 i corrispondenti valori di τ_D ottenuti dai fitting, quelli di η calcolati alle differenti concentrazioni di BSA e il valore di r_0 ricavato dalla calibrazione con la RodaminaB, che risultava 0.218 μm . I raggi derivanti dai contributi di diffusione rotazionale delle medesime curve di correlazione si calcolano, invece, con l'equazione 3.9 introducendo i corrispondenti valori di τ_r e di η . Le medie dei raggi idrodinamici sono riepilogati in Tabella10:

C_{BSA} [μM]	R_D [nm]	R_r [nm]
0	16,19	8,47
0,05	24,81	9,67
0,25	24,83	10,83
0,37	27,00	10,77
0,5	27,29	11,04
2,5	24,22	10,94
3,7	25,36	10,92
5	25,55	12,65
25	23,12	12,44
50	26,47	12,00
250	39,91	14,27
375	45,13	13,50
500	47,84	13,89

Tabella10

Nelle Figure 3.14 e 3.15 sono rappresentati gli andamenti dei raggi idrodinamici delle GNPs in funzione della concentrazione di BSA in soluzione.

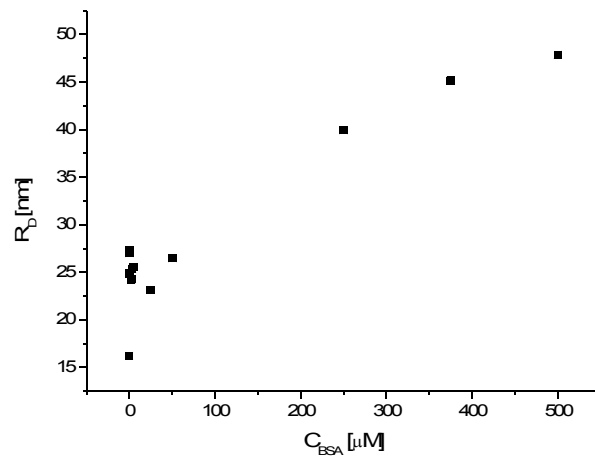


Figura 3.14 Andamento di R_D delle GNP in funzione della concentrazione di BSA.

Entrambe queste figure evidenziano un progressivo aumento delle dimensioni medie delle GNP all'aumentare della concentrazione di BSA con cui sono in contatto. L'aumento risulta più accentuato nel caso di R_D , mentre si osserva il raggiungimento di un plateau alle massime concentrazioni a valori di R_r di circa 14 nm (Figura 3.15). L'aumento osservato per R_D non ha alcuna correlazione con le dimensioni stimate per la BSA, a meno di ipotizzare che si formi più di uno strato di proteine sulla superficie della nanoparticella.

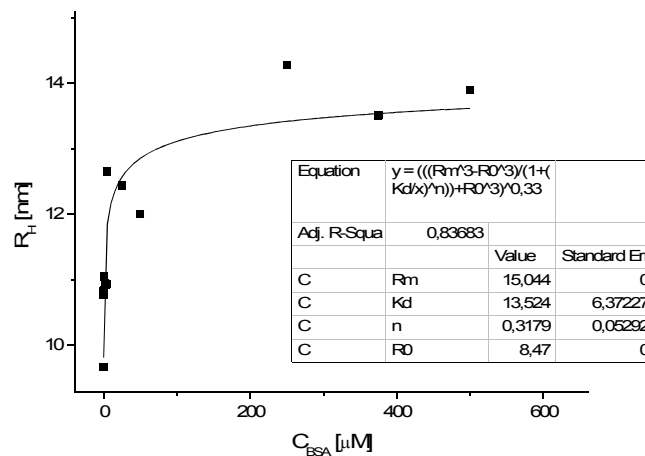


Figura 3.15 Andamento di R_r delle GNP in funzione della concentrazione di BSA.

Studi riportati in letteratura per GNP che interagiscono con BSA^[49], riportano la formazione di un singolo strato di proteine, e quindi sono in totale contrasto con i dati da noi osservati. L'andamento dei nostri risultati sperimentali è da attribuire a errori insiti nella stima del volume effettivo quando si utilizza eccitazione a due fotoni.

Sulla base di queste considerazioni è preferibile ignorare i valori R_D ed esaminare il contributo di diffusione rotazionale che non dipende da parametri del set-up strumentale, che

possono essere affetti da errori.

Dall'analisi degli R_r si può concludere che le GNPs messe a contatto con la BSA subiscono un incremento del loro raggio medio da 8.47 nm (GNPs in acqua) a circa 14 nm attribuibile alla formazione di un protein-corona di albumina dello spessore di circa 6 nm intorno alle particelle. Il raggio della nanostruttura raggiunge il valore massimo già a 200 μM e non aumenta più per le concentrazioni maggiori di BSA, indice di una completa copertura della GNP con un monostrato di BSA.

In figura 3.15, la traccia continua è la curva del *fitting* ottenuto usando il modello di Hill combinando le Equazioni 1.Abis e 1.C:

$$R_H = \sqrt[3]{\left[\frac{R_m^3 - R_0^3}{1 + (K_D/[BSA])^n} + R_0^3 \right]}$$

I parametri ricavati dal *fitting* sono: $K_D = 13 \pm 6 \mu\text{M}$ e $n = 0.32 \pm 0.05$. I valori ottenuti sono confrontabili con quelli riportati in letteratura per GNPs^[49], confermando l'ipotesi di *binding* anticooperativo per il sistema GNPs e BSA.

3.5 Misure FCS in flusso

In questo ultimo paragrafo saranno presentate brevemente le prime misure relative alla caratterizzazione: (i) della velocità di flusso di una soluzione acquosa di GNP in un canale microfluidico, utilizzando le GNPs come traccianti per stimare la velocità stessa e (ii) dell'interazione tra BSA e GNP in un canale microfluidico in condizioni di flusso.

Nel primo caso la tecnica di FCS permette di ottenere una mappatura nelle tre dimensioni delle velocità del flusso all'interno dei canali microfluidici di PDMS e vetro, che possono essere usati come sistemi modello per mimare il trasporto all'interno dei vasi sanguigni di tali nanoparticelle. Nel secondo caso invece, ci si propone di utilizzare un circuito microfluidico con due *inlet* che permettono di iniettare separatamente una soluzione di GNPs e una di BSA. All'interno del canale il flusso laminare garantisce una lenta miscelazione delle due specie, per cui si può ipotizzare che il processo di mescolamento avvenga solo nella zona centrale del canale all'interfaccia delle due soluzioni. Il dispositivo microfluidico, in questo caso, ha lo scopo di monitorare la dinamica del processo di formazione del monostrato proteico sulla GNP.

3.5.1 Funzionalizzazione dei canali

La prima cosa da controllare quando si utilizza un dispositivo microfluidico è che la BSA non si adsorba sulla superficie del canale microfluidico in quanto questo processo comporterebbe un'alterazione delle condizioni operative e della concentrazione di BSA all'interno del microcanale. Dato che la BSA non è fluorescente e risulterebbe impossibile dimostrare che si lega al PDMS, con la strumentazione in nostro possesso sono state registrate alcune immagini del canale *idrofobico* riempito con BSA marcata con *Fluorescein Isothiocyanate* (Sigma Aldrich) 50 nM, comunemente nota come FITC-BSA. In Figura 3.16 (A) si vede sulla sinistra il canale idrofobico contenente la FITC-BSA e sulla destra lo stesso canale dopo essere stato svuotato con flusso di acqua per 5 minuti. Come si può notare dalla fluorescenza residua sulle pareti del canale l'albumina rimane legata al PDMS.

La Figura 3.16 (B) mostra le stesse immagini (soluzione di FITC-BSA e sistema lavato per 5 minuti con acqua) per un canale reso *idrofilico* dal trattamento UVO. Anche in questo caso si nota l'adsorbimento della FITC-BSA sulle pareti. Si può pertanto concludere che il solo trattamento UVO in atmosfera di ozono non risolve il problema e che è necessario funzionalizzare il canale microfluidico come spiegato nel paragrafo 2.4.2.

Di seguito sono descritti i tentativi di funzionalizzazione effettuati immediatamente dopo l'attivazione e la chiusura del canale.

Successivamente il canale è stato riempito con una soluzione acquosa 2mg/mL di polietilenglicole sostituito con gruppi carbossimetile (*mPEG-CM*) di peso molecolare medio pari a 2000 g/mol. In Figura 3.16 (C) si possono osservare le immagini di fluorescenza per FITC-BSA nelle stesse condizioni usate nei test A e B. Anche in questo caso si osserva fluorescenza residua sulle pareti del canale indice dell'adsorbimento della FITC.

Infine il canale è stato sottoposto a funzionalizzazione con il polietilenglicole di peso molecolare medio pari a 6000 (*PEG6000*). In Figura 3.16 (D) è riportata l'immagine di fluorescenza del canale microfluidico nelle stesse condizioni dei test precedenti. In questa immagine la fluorescenza sulle parti dei canali è praticamente scomparsa, quindi il PEG6000 risulta la scelta più adatta per evitare l'adsorbimento della BSA sulle pareti del canale microfluidico e pertanto tutti i canali microfluidici impiegati per le misure in flusso sono stati funzionalizzati in questo modo.

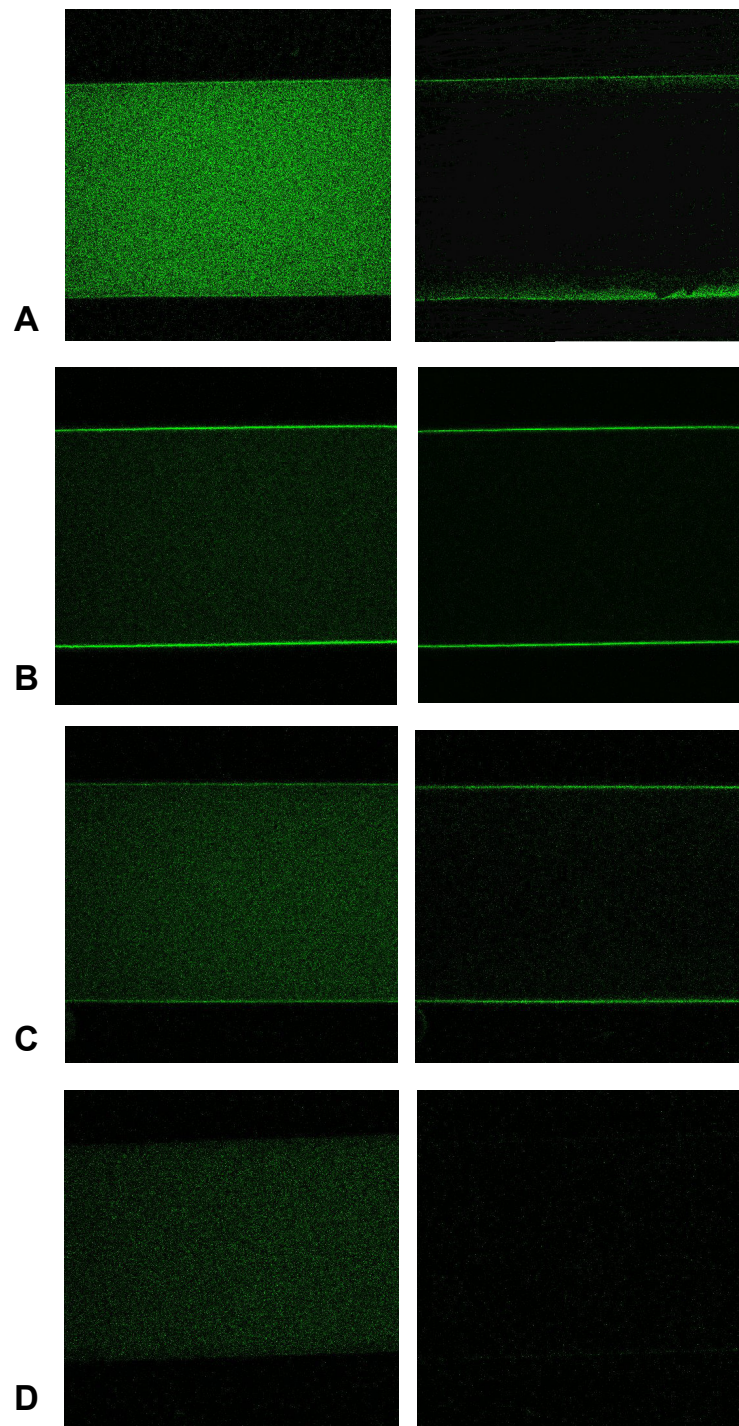


Figura 3.16 Immagini ottenute per i canali contenenti FITC BSA (a sinistra) e in seguito allo svuotamento degli stessi con acqua (a destra). A: canale idrofobico; B: canale idrofilico; C: canale funzionalizzato con mPEG-CM; D: canale funzionalizzato con PEG6000.

3.5.2 Considerazioni relative alle misure in flusso

In questo paragrafo si riportano i risultati preliminari relativi alle misure di FCS effettuate nei canali microfluidici. Le prime misure di FCS per soluzioni acquose di GNPs in presenza di un flusso direzionato nel canale microfluidico sono state effettuate utilizzando il canale a T e iniettando da una parte la soluzione nativa di GNPs e dall'altra acqua. La portata del flusso per entrambe i liquidi impostata nella misura è di 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Queste misure hanno lo scopo di verificare se le GNPs possono essere utilizzate come traccianti della velocità di flusso (definita come $v = r_0 / \tau_{flow}$) all'interno del microcanale e in secondo luogo possono essere utilizzate per una calibrazione della velocità del flusso stessa all'interno del canale da utilizzare quando si analizzano i dati ottenuti mescolando una soluzione di GNPs con una soluzione contenente la BSA.

Le curve di cross-correlazione registrate a differenti distanze dall'*inlet* (identificato con $x = 0$) nel centro del canale a T sono riportate in Figura 3.17 (sopra).

Le curve di correlazione fino a distanze di 500-1000 μm dall'*inlet* risultano sostanzialmente differenti. Tale differenza rispecchia un comportamento discontinuo della velocità di flusso dovuto con molta probabilità, alla forma a T del canale, che porta ad una collisione iniziale delle due soluzioni con conseguente variazione non continua della velocità di flusso nel canale principale. Per questo motivo sono state tralasciate le ulteriori analisi in questo tipo di dispositivo per passare a circuiti microfluidici a Y.

Le stesse misure sono state effettuate nelle medesime condizioni operative con il canale a Y (Figura 3.17 sotto). In questo secondo caso le curve alle diverse distanze dall'*inlet* risultano abbastanza simili, ad eccezione della posizione $x = 100 \mu\text{m}$. Si presume che la forma ad Y favorisca una confluenza più blanda dei flussi delle soluzioni di GNPs e H_2O .

I dati FCS registrati nel canale a Y sono stati simulati utilizzando la seguente equazione:

$$G_{flow}(\tau) = [1 + C \cdot \exp(\frac{-\tau}{\tau_r})] (\frac{1}{N}) (1 + \frac{\tau}{\tau_D})^{-1} [1 + (\frac{r_0}{z_0}) (\frac{\tau}{\tau_D})]^{-1/2} \cdot e^{[-(\frac{\tau}{\tau_f})^2 \cdot (1 + \frac{\tau}{\tau_D})^{-1}]}$$

Equazione 3.17

dove τ_f è il tempo di transizione attraverso il volume focale per effetto del flusso.

Questo dato potrebbe essere utilizzato come parametro fisso negli esperimenti successivi, in cui si aggiunge una soluzione di BSA e non solo acqua. Un altro dato fornito dal *fitting* è la concentrazione di GNPs all'interfaccia tra i due liquidi che scorrono nel canale.

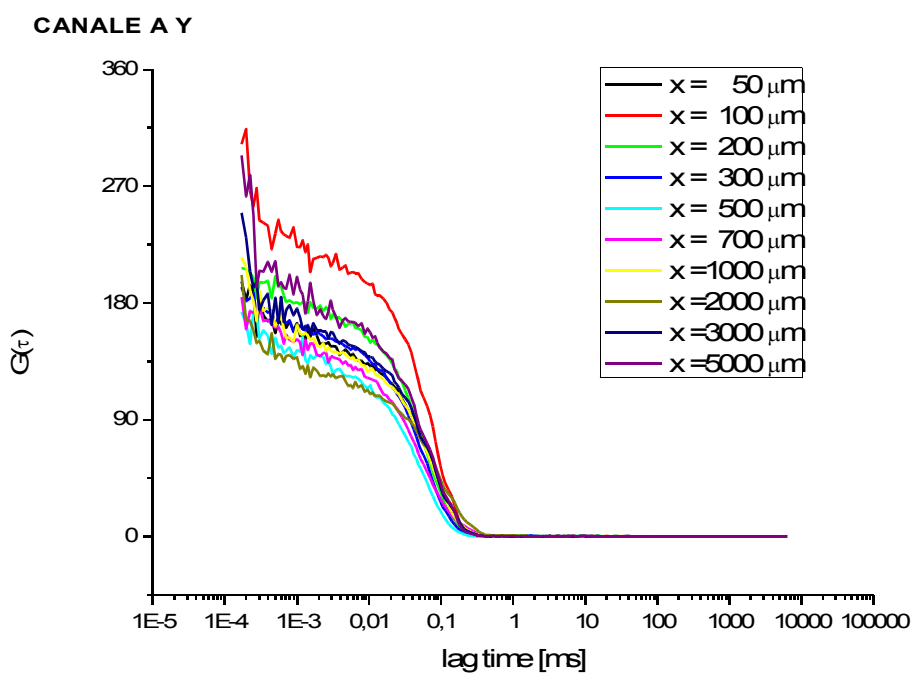
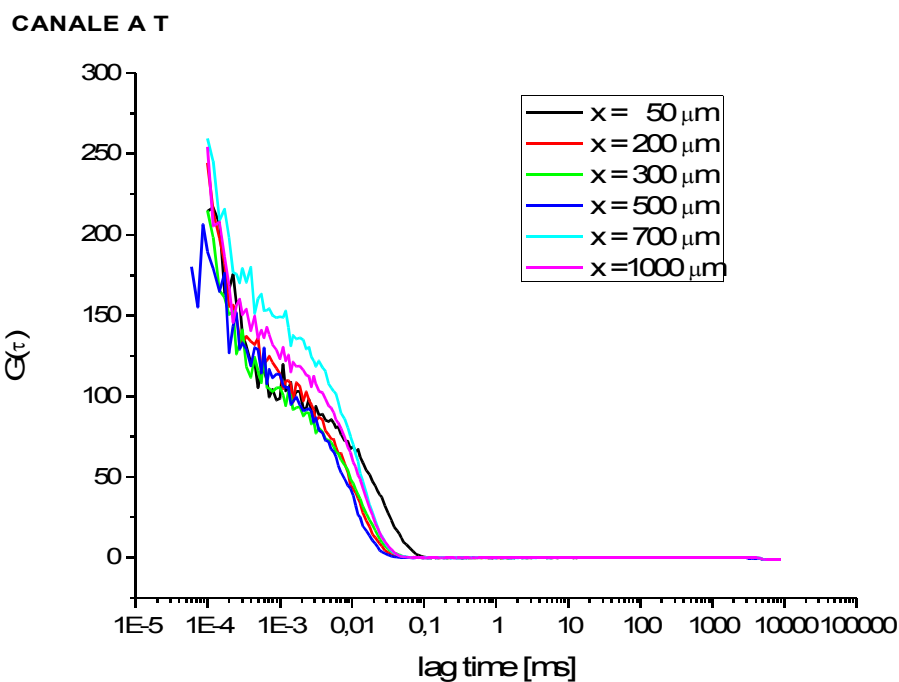


Figura 3.17 Curve di cross-correlazione registrate all'interfaccia tra le GNPs e l'acqua a differenti posizioni lungo il canale a T (sopra) e lungo il canale a Y (sotto).

Al momento attuale non si è riusciti ad effettuare un'analisi completa dei dati in nostro possesso, per cui di seguito si forniscono solamente alcune considerazioni di tipo qualitativo. La Figura 3.18 riporta il confronto tra le curve di cross-correlazione relative ai sistemi GNPs–H₂O (curve continue) e GNPs–BSA 500 μM (curve tratteggiate) misurate al centro del canale, in corrispondenza dell'interfaccia tra le due soluzioni, a differenti distanze dall'*inlet*.

A qualsiasi distanza dall'inlet si nota una maggiore ampiezza della curva di correlazione misurata all'interfaccia GNP_s-H₂O (Figure 3.18 e 3.19).

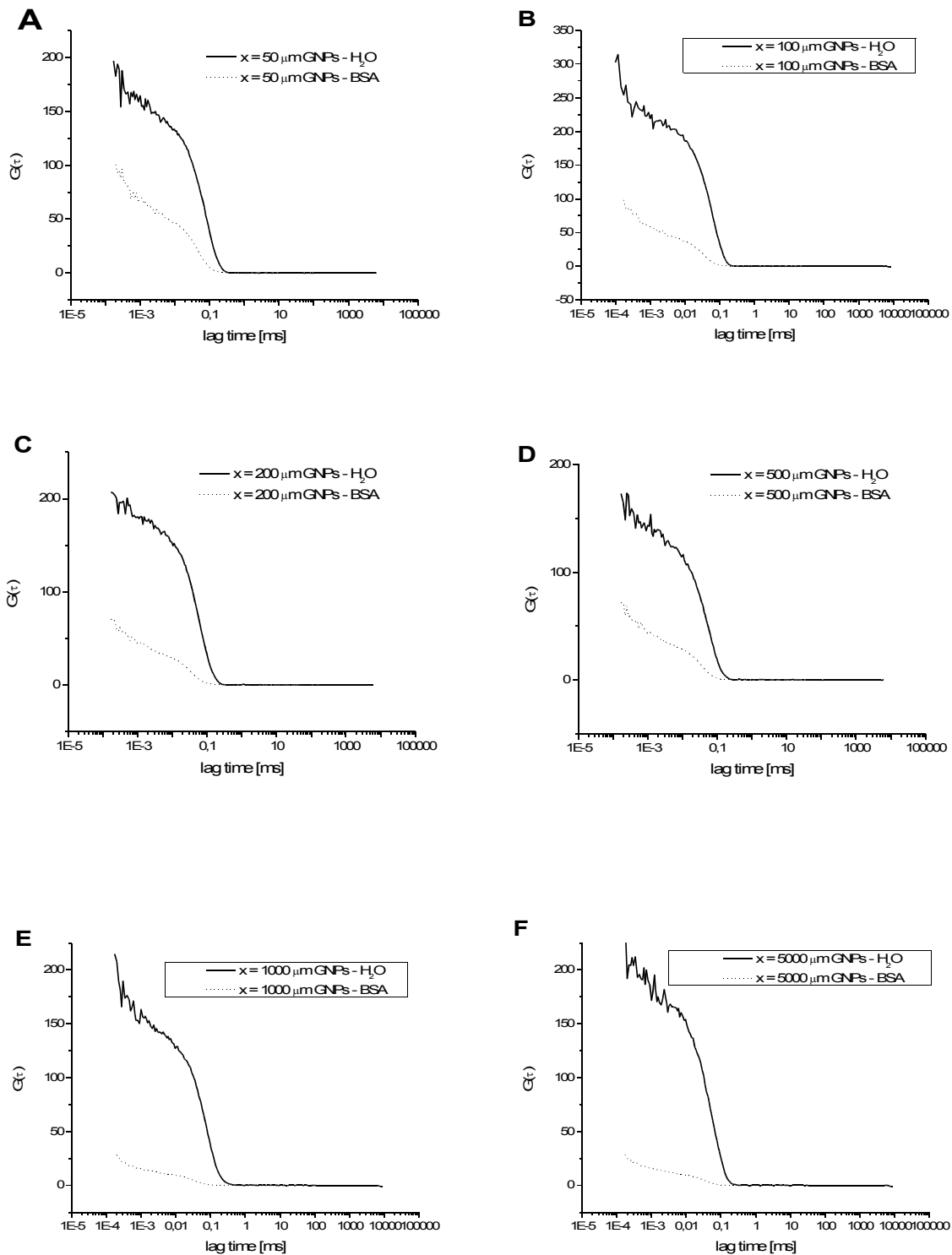


Figura 3.18 Confronto tra le curve di cross-correlazione all'interfaccia GNP_s – H₂O e quelle all'interfaccia GNP_s–BSA a distanze dall'inlet 50 μ m (A), 100 μ m (B), 200 μ m (C), 500 μ m (D), 1000 μ m (E), 3000 μ m (F).

L'ampiezza della curva di correlazione, come già detto, è inversamente proporzionale al numero di “siti” fluorescenti presenti nel volume focale, per cui esaminando visivamente le Figura 3.20 si può concludere che tale numero, misurato in qualunque punto del canale microfluidico, risulta maggiore nel caso GNP_s–BSA.

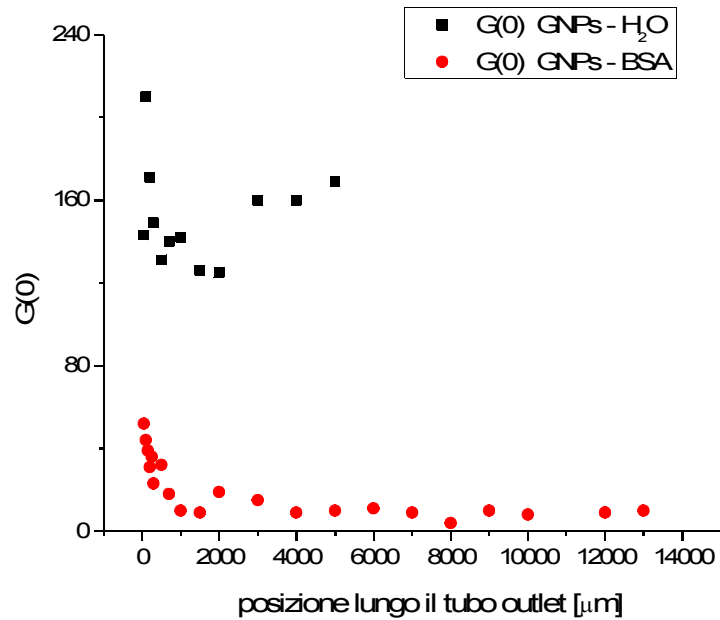


Figura 3.19 Ampiezza delle curve di cross-correlazione di GNP_s e H₂O (nero) e di GNP_s e BSA (rosso) a differenti distanze dall'inlet.

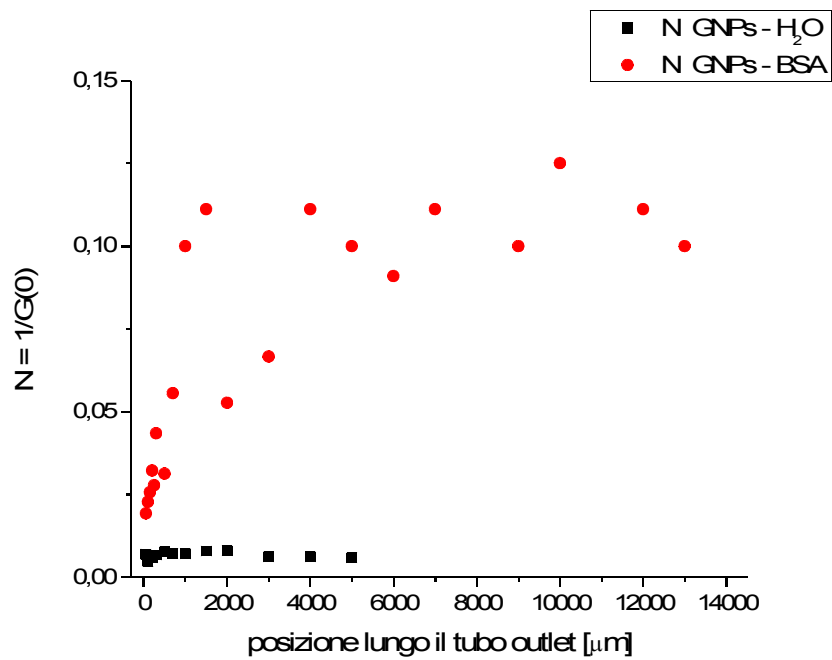


Figura 3.20 Numero di particelle fluorescenti (N) relative ai sistemi GNP_s – H₂O (nero) e GNP_s – BSA (rosso) a differenti distanze dall'inlet.

In prima approssimazione si ipotizza che questo andamento sia imputabile all'interazione che ha luogo tra le GNPs e la BSA. L'adsorbimento di BSA sulla superficie delle GNPs provoca un aumento della fluorescenza che potrebbe essere attribuito ad un aumento dei siti trappola superficiali che sono luminescenti. Questa ipotesi è consistente con la diminuzione osservata nelle misure in statica per le ampiezze delle curve di cross-correlazione all'aumentare della concentrazione di BSA aggiunta alla soluzione di GNPs.

Si può altresì notare in Figura 3.20 come il parametro N rimanga praticamente costante nel caso di GNPs e acqua, indice che la diffusione delle GNPs nel canale microfluidico è lenta. Nel caso in cui invece si inetti la soluzione con BSA si osserva un'evidente crescita per questo parametro fino alla distanza $1500\ \mu\text{m}$ per poi raggiungere la saturazione.

In futuro cercheremo di effettuare un'attenta analisi di questi dati per ottenere informazioni sulla cinetica di formazione del monostrato di proteine sulle GNPs.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata indagata l'interazione delle nanoparticelle d'oro con la BSA attraverso misure di *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS), eccitando le particelle a due fotoni con una sorgente laser impulsata nel NIR. Per effetto della dipendenza quadratica dell'assorbimento dall'intensità di eccitazione, la fluorescenza è localizzata nello spot focale dell'obiettivo. Questa modalità di eccitazione minimizza il processo di *photobleaching* all'esterno del volume focale, rendendola adatta ad esempio all'*imaging* di tessuti biologici intatti.

Con questa tecnica sono state registrate le curve di cross-correlazione relative alle nanoparticelle d'oro in assenza e in presenza di BSA. Il raggio idrodinamico delle nanoparticelle d'oro in acqua, ottenuto dalla componente di diffusione rotazionale della funzione di correlazione, risulta in buon accordo con il raggio stimato dallo spettro di assorbimento, evidenziando la potenzialità della tecnica FCS per questo genere di analisi. Il raggio idrodinamico delle nanoparticelle d'oro mescolate a concentrazioni crescenti di BSA si rivela in aumento confermando la formazione di un *protein-corona* di BSA dello spessore di circa 6 nm attorno alle particelle. I dati acquisiti sono stati razionalizzati empiricamente attraverso l'equazione di Hill, con conferma dell'ipotesi di binding anticooperativo visto in precedenza in nanoparticelle d'oro più grandi sempre con BSA.

Infine sono stati realizzati e funzionalizzati i dispositivi microfluidici in PDMS e vetro per esplorare le possibilità di usare le nanoparticelle d'oro come sensori locali della velocità di flusso, ma soprattutto per effettuare una caratterizzazione cinetica del processo di formazione del *protein-corona* tra nanoparticelle d'oro e BSA. Sono stati utilizzati dispositivi a Y con due *inlet* separati che permettono di iniettare nanoparticelle d'oro e BSA indipendentemente, per poi farle confluire in un canale centrale dove si mescolano. All'interno dei canali microfluidici il flusso laminare assicura un lento mescolamento delle specie introdotte. Grazie a questo dispositivo, perciò, risulta possibile studiare la cinetica di formazione del *protein-corona*, effettuando misure FCS all'interfaccia dei due flussi. Per quanto riguarda queste ultime misure, si riportano solo risultati preliminari e ci si limita a fornire un'interpretazione solo parziale dei dati ottenuti dalle curve di cross-correlazione registrate.

Eventuali futuri sviluppi prevedono innanzitutto una completa interpretazione dei dati in nostro possesso per poi puntare alla possibilità di effettuare misure FCS con nanoparticelle d'oro e altre proteine meno abbondanti nel plasma ma con affinità superiori e cinetiche più lente dell'albumina, con lo scopo finale di osservare l'interazione di nanoparticelle con l'intero plasma.

APPENDICE: TEORIA DI MIE

Il fenomeno della risonanza plasmonica per le nanoparticelle sferiche è stato spiegato per la prima volta nel 1908 da Mie^[11]. Egli risolse in modo esatto le equazioni di Maxwell per l'estinzione e lo *scattering* di un'onda elettromagnetica interagente con piccole sfere aventi la stessa costante dielettrica macroscopica, dipendente della frequenza, del metallo *bulk*. La soluzione di questi calcoli elettrodinamici, effettuati con le appropriate condizioni a contorno, hanno portato alla descrizione di oscillazioni multipolari per la sezione d'urto di estinzione e di *scattering*.

Tuttavia il problema può essere trattato secondo due distinti regimi: il regime quasi statico è valido quando il raggio della particella sferica è molto più piccolo della lunghezza d'onda della radiazione incidente, mentre quello dinamico si applica quando raggio e lunghezza d'onda sono confrontabili.

Per il regime quasi statico ($2r \ll \lambda$) solo le oscillazioni di dipolo contribuiscono alla sezione d'urto di *scattering* come se la particella risentisse di un unico campo elettrico omogeneo. Questo è il modello dell'approssimazione dipolare che ha portato alle seguenti espressioni per la sezione d'urto di *scattering* e di estinzione:

$$\sigma_{sca}(\omega) = 2 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 V \left[\frac{\epsilon_1(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m} \right]^2 \quad \text{Equazione A.1}$$

$$\sigma_{ext}(\omega) = 9 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right) \epsilon_m^{3/2} V \left[\frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \right] \quad \text{Equazione A.2}$$

in cui ω è la frequenza angolare della radiazione incidente, V è il volume della particella, c è la velocità della luce nel vuoto, mentre ϵ_m e $\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$ sono le funzioni dielettriche rispettivamente del mezzo circostante e del metallo. Mentre la prima è assunta indipendente dalla frequenza, la seconda è una funzione complessa e dipende dalla frequenza.

Dalla relazione $\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca}$ si può calcolare la sezione d'urto di assorbimento.

La condizione di risonanza, nel caso in cui ϵ_2 sia solo debolmente dipendente dalla frequenza ω , è soddisfatta per $\epsilon_1(\omega) = -2\epsilon_m$.

Come si vede dall'Equazione A.2 la sezione d'urto di estinzione dipende dalle dimensioni della particella. Tuttavia, l'assorbimento plasmonico risulta solo debolmente influenzato dalla dimensione nel caso delle particelle di diametro inferiore a circa 20 nm. Sperimentalmente, però, si osserva che nelle particelle di circa 9 nm l'assorbimento plasmonico è fortemente attenuato e che la banda si allarga fino a scomparire nel caso di particelle di circa 2 nm^[74].

Questo comportamento è dovuto al fatto che il cammino libero medio degli elettroni, che per

l'oro *bulk* è di 40-50 nm, risulterebbe più grande della particella stessa. Per particelle molto piccole gli elettroni diffondono sulla superficie in modo elastico e completamente casuale inducendo una rapida perdita di coerenza dell'oscillazione plasmonica: più piccola è la particella, più celermente gli elettroni raggiungono la superficie, più rapida sarà la perdita di coerenza con conseguente allargamento della banda plasmonica. Questo fenomeno è definito *intrinsic size effect* e se ne può tenere conto modificando la teoria di Mie assumendo che la costante dielettrica del materiale sia dipendente dalle dimensioni del sistema studiato $\epsilon(\omega, r)$ al di sotto dei 20 nm di diametro. Nell'Equazione A.2 è infatti presente la costante dielettrica del materiale *bulk*, che per le dimensioni in esame non può essere giustificata. La costante dielettrica viene pertanto riscritta come una combinazione di due termini, di questi uno rende conto degli elettroni di core, $\epsilon_B(\omega)$, l'altro degli elettroni di conduzione, $\epsilon_D(\omega)$:

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_B(\omega) + \epsilon_D(\omega) \quad \text{Equazione A.3}$$

dove $\epsilon_D(\omega)$ è definita come segue:

$$\epsilon_D(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad \text{Equazione A.4}$$

dove γ è un parametro fenomenologico di attenuazione, mentre ω_p è la frequenza caratteristica di oscillazione del plasmon nel caso *bulk*:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{4\pi ne^2}{\epsilon_0 m_e}} \quad \text{Equazione A.5}$$

n è la densità elettronica di conduzione, e e m_e sono rispettivamente la carica e la massa dell'elettrone ed ϵ_0 è la permittività elettrica nel vuoto.

Per particelle di dimensioni maggiori (superiori ai 20 nm nel caso dell'oro), confrontabili con la lunghezza d'onda incidente, l'approssimazione dipolare non è valida. La risonanza plasmonica diventa esplicitamente dipendente dalla dimensione della particella. I modi di oscillazione di ordine superiore diventano sempre più importanti all'aumentare della dimensione delle particelle che quindi non possono più essere polarizzate omogeneamente dalla radiazione elettromagnetica. Questo fenomeno è chiamato *extrinsic size effect*.

I modi di ordine maggiore sono caratterizzati da energie minori pertanto la banda plasmonica subisce un *red shift* all'aumentare della dimensione della particella. Contemporaneamente, anche la larghezza di banda aumenta con le dimensioni.

La larghezza della banda plasmonica può essere associata al defasamento dell'oscillazione elettronica coerente. Un'ampia larghezza di banda corrisponde ad una rapida perdita di coerenza dell'oscillazione degli elettroni. I tempi di defasamento si aggirano attorno ai femtosecondi, indicando che i principali processi di rilassamento siano dovuti a collisioni

elettrone-elettrone.

La larghezza di banda Γ è legata al tempo totale di defasamento T_2 secondo la relazione:

$$\frac{1}{T_2} = \pi c \Gamma = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2^*} \quad \text{Equazione A.6}$$

in cui T_1 è il tempo di rilassamento energetico, che include sia processi radiativi che non radiativi, mentre T_2^* è il tempo di rilassamento puro, risultante dalle collisioni che modificano il vettore d'onda del plasmone ma non la sua energia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W.; Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1542-1550
- [2] Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilani, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1721-1730
- [3] Alkilany, A. M.; Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The gold standard: gold nanoparticle libraries to understand the nano-bio interface. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 650-661
- [4] Xia, Y.; Li, W.; Cogley, C. M.; Chen, J.; Xia, X.; Zhang, Q.; Cho, E. C.; Brown, P. K. Gold nanocages: from synthesis to theranostic applications. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 914-24
- [5] Lee, J.; Hasan, W.; Stender, C. L.; Odom, T. W. Pyramids: a platform for designing multifunctional plasmonic particles. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1762-71
- [6] Chen, J.; Wang, C.; Irudayaraj, J. Ultrasensitive protein detection in blood serum using gold nanoparticles by single molecule spectroscopy. *JBO Letters*, **2009**, *14*
- [7] Murphy, C. J.; San, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J. X.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly and optical applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857-13870
- [8] Skrabalak, S. E.; Chen, J. Y.; Sun, Y. G.; Lu, X. M.; Au, L.; Cogley, C. M.; Xia, Y. N. Gold nanocages: synthesis, properties and applications. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1587-1595
- [9] Jain, P. K.; Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578-1586
- [10] Alkilany, A. M.; Murphy, C. J.; Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learning so far? *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, 2313-2333
- [11] Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Reviews in Physical Chemistry*, **2000**, *19*, 3, 409-453
- [12] Niidone, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidone, Y.; PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 343-347
- [13] Sperling, R. A.; Rivera Gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1896-1908
- [14] Huang, X.; Peng, X.; Wang, Y.; Shin, D. M.; El-Sayed, M. A.; Nie, S.; A reexamination

of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS Nano* **2010**, 4, 5887-96

[15] Cho, E. C.; Liu, Y.; Xia, Y. A simple spectroscopic method for differentiating cellular uptakes of gold nanospheres and nanorods from their mixture. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1976-1980

[16] Giljohann, D.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 3280-3294

[17] Nel, A. E.; Maedler, L.; Veledol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M.; Somasundaran, P.; Klaessing, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nanobio interface. *Nat. Mater.* **2009**, 8, 543-557

[18] De Paoli Lacerda, S. H.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristiniski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano*, **2010**, 4, 365,379

[19] Cedervall, T.; Lynch, I.; Berggerd, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S.; Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *PNAS* **2007**, 104, 2050-2055

[20] Casaals, E.; Pfaller, T.; Duschi, A.; Oostingh, G.; Puntès, V. Evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano* **2010**, 4, 3623-32

[21] Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. What the cell "sees" in bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5761-8

[22] Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. A. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles.

[23] Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *NANOTODAY*. **2008**, 3, 40-47

[24] Klein, J. Probing the interactions of proteins and nanoparticles. *PNAS*. **2007**, 104, 2029-2030

[25] Qiu, Y.; Liu, Y.; Whang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* **2010**, 31, 7606-7619

[26] Cedervall, T.; Lynch, I.; Foy, M.; Berggad, T.; Donnelly, S. C.; Cagney, G.; Linse, S.; Dawson, K. A.; Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 5754-5756

[27] Mout, R.; Moyano, D. F.; Rana, S.; Rotello, V. M. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2539-2544

- [28] Yang, Y.; Burkhard P. Encapsulation of gold nanoparticles into self-assembling protein nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, **2012**, 10, 42
- [29] De Paoli Lacerda, S. H.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristinski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano*, **2010**, 4, 365-379
- [30] Ferrer, M. L.; Duchowicz, R.; Carrasco, B.; Garcia de la Torre, J.; Acuña A. U.; The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. *Biophysical Journal*, **2001**, 80, 2422-2430
- [31] Wright A. K.; Thomson, M. R.; Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophysical Journal*, **1975**, 15, 137-141
- [32] Product Information "Albumin from bovine serum" Sigma-Aldric
- [33] Pabbathi, A.; Patra, S.; Samanta, A; Structural transformation of bovine serum albumin induced by dimethyl sulfoxide and probed by fluorescence correlation spectroscopy and additional methods. *ChemPhysChem*, **2013**, 14, 2441-2449
- [34] Anand, U.; Mukherjee, S. Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, 5394-5404
- [35] Brewer, S. H.; Glomm, W. R., Johnson, M. C.; Knag, M. K.; Franzen, S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*, **2005**, 21, 9303
- [36] Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging. From single molecules to ensembles. Wiley-vch, **2011**
- [37] Petrov, E. P.; Schwille, P. State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. *Springer*, **2008**, 6, 145-197
- [38] Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer*, **2006**, 798-840
- [39] Schwille, P.; Haustein, E. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications
- [40] Ries, J.; Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy. *Bioessays*, **2012**, 34, 361-368
- [41] Mütze, J.; Ohrt, T.; Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy in vivo. *Laser Photonics Rev.* **2011**, 1, 52-67
- [42] Krieger, J.; Tóth, K.; Langowski, J. Practical course biophysics: absorption and fluorescence spectroscopy, fluorescence correlation spectroscopy. Biophysics of macromolecules (<http://www.dkfz.de/Macromo/>)
- [43] Kuricheti, K. K.; Buschmann, V.; Weston, K. D. Application of fluorescence correlation spectroscopy for velocity imaging in microfluidic devices. *Applied Spectroscopy*, **2004**, 58, 10, 1180-1186

- [44] Loumaigne, M.; Richard, A.; Laverdant, J.; Nutarelli, D.; Débarre, A. Ligand-induced anisotropy of the two-photon luminescence of spherical gold particles in solution unraveled at the single particles level. *Nano Lett.* **2010**, 10, 2817-2824
- [45] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. Fondamenti di biochimica. *Zanichelli*, **2007**
- [46] Röcher, C.; Pötzl, M.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *NNano*, **2009**, 4, 577-580
- [47] Dell'Orco, D.; Lundqvist, M.; Oslakovic, C.; Cedervall, T.; Linse, S. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *Plos One*, 2010, 5, 10949
- [48] Shang, L.; Brandholt, S.; Stockmar, F.; Trouillet, V.; Bruns, M.; Nienhaus, G. U. Effect of protein adsorption on the fluorescence of ultrasmall gold nanoclusters. *Small*, **2012**, 8, 661-665
- [49] Medina, S. D.; McDonough S.; Swanglap, P.; Landes, C.; Link, S. In situ measurement of bovine serum albumin interaction with gold nanospheres. *Langmuir*, **2012**, 28, 9131-9139
- [50] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55
- [51] Chow, M. K.; Zukoski, C. F. Gold sol formation mechanisms: role of colloidal stability. *J. Colloid Interface Sci.*, **1994**, 165, 97-109
- [52] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich method for gold nanoparticles synthesis revisited. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 15700-15707
- [53] Treuel, L.; Malissek, M.; Gebauer, J. S.; Zellner, R. The influence of surface composition of nanoparticles on their interactions with serum albumin. *ChemPhysChem*, **2010**, 11, 3093-3099
- [54] http://parkerlab.bio.uci.edu/microscopy_construction/build_your_own_twophoton_microscope.htm
- [55] Thompon, N.L.; Lieto, A. M; Allen, N. W. Recent advance in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical methods*, **2002**, 12, 634-641
- [56] So, P. TC, Two-photon Fluorescence Light Microscopy
- [57] www.lafsi.com Laboratorio di fisica delle superficie e interfacce dell'Università di Padova
- [58] Vecchioni Vecchioni, R. Dispositivi di microfluidica: fabbricazioni & applicazioni
- [59] Kuricheti, K. K.; Buschmann, V.; Brister, P.; Weston, K. D.; Velocity imaging in microfluidic devices using fluorescence correlation spectroscopy. *SPIE*, **2004**, 5345, 194-205
- [60] Brister, P. C.; Kuricheti, K. K.; Buschmann, V.; Weston, K. D. Fluorescence correlation spectroscopy for flow rate imaging and monitoring – optimization, limitations and artifacts.

Lab Chip, **2005**, 5, 758-791

- [61] Cademartini, L.; Ozin, G. A. Concepts of nanochemistry. *Wiley-vch*, **2009**
- [62] Zhou, J.; Ellis, A. V.; Voelcker, N. H. Recent developments in PDMS surface modification of microfluidic devices. *Electroforesis*, **2010**, 31, 2-16
- [63] Ibarlucea, B.; Fernández-Sánchez, C.; Demming, S.; Büttgenbach, S.; Llobera, A. Biofunctionalization of PDMS-based microfluidic systems. *Nature*, **2013**
- [64] Wong, I.; Ho, C. M. Surface modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidic Nanofluid*, **2009**
- [65] Dhruv, H. D. Controlling nonspecific adsorption of proteins at bio-interfaces for biosensor and biomedical applications. **2009**. All graduate theses and dissertations. Paper 276
- [66] Ostuni, E.; Chen, C. S.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. Selective deposition of proteins and cells in arrays of microwells. *Langmuir*, **2001**, 17, 2828-2834
- [67] Xia, Y. M.; Hua, Z. S.; Srivannavit, O.; Ozel, A. B.; Gulari, E. Minimizing the surface effect of PDMS-glass microchip on polymerase chain reaction by dynamic polymer passivation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, 82, 33-38
- [68] Chan-Yen, D. A.; Myszka, D. G.; Gale, B. K. A novel PDMS microfluidic spetter for fabrication of protein chips and microarrays. *Journal of Microelectromechanical systems*, **2006**, 15, 5, 1145-1151
- [69] Masuello, M.A. Study of bovine serum albumin solubility in aqueous solutions by intrinsic viscosity measurements. *Advances in Physical Chemistry*, **2013**
- [70] Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. Viscosity analysis of high concentration bovine serum albumin aqueous solutions. *Springer*, **2011**, 28, 1973-1983
- [71] Genovese, D. B.; Lozano, J. E.; Rao, M. A. The thorology of colloidal and non colloidal food dispersions, *J. Food Science*, **2007**, 72, 2
- [72] Richards, J. L. Viscosity and the shapes of macromolecules. *J. Chem. Edu*, **1993**, 70, 3, 685-689
- [73] Pedemonte, E. Fondamenti di struttura, proprietà e tecnologia dei polimeri. *Edizioni Nuova Cultura*
- [74] Alvarez, M. M.; Khoury, J. T.; Schaaff, G.; Shafigullin, M. N.; Vezmar, I.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 3706-3712

RINGRAZIAMENTI

Nove mesi sono ormai trascorsi ed ora sono d'obbligo i ringraziamenti.

Grazie alla Prof.ssa Camilla Ferrante, mia relatrice, e al Prof. Fabrizio Mancin, mio controrelatore, per i loro consigli e la loro disponibilità nel seguirmi.

In particolar modo vorrei ringraziare la Dott.ssa Ilaria Fortunati per avermi seguita, sostenuta ed aiutata giorno per giorno con competenza e tanta pazienza!

Un doveroso ringraziamento va a Verena per avermi svelato i segreti della sintesi di nanoparticelle d'oro meravigliose, ma anche per le nostre chiacchiere e risate in laboratorio.

Grazie ai miei compagni di ufficio: Fabrizio, Andrea e Stefano...con loro è impossibile annoiarsi!!

Grazie a tutti i dottorandi, assegnisti e ricercatori del gruppo di Spettroscopia Ottica: Nicola (che spesso è accorso in mio aiuto!), Maria Chiara, Alessandro, Lucio, Alessia, Luca, Elisabetta e Roberto. Siete stati il mio punto di riferimento in questi mesi.

Grazie alla mia Famiglia per avermi sempre incoraggiata, ma anche sopportata, in questi lunghi anni di studio...mia madre e mia sorella, alle quali voglio un mondo di bene, e mio padre, che mi manca tanto.

Grazie a Giovanni, che è al mio fianco da due anni e che contribuisce a rendere migliore la mia vita.

Grazie agli amici di sempre, alle new entries e alle mie coinquiline.

Un ringraziamento speciale a Romeo.