

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Nanoparticelle d'oro funzionalizzate con
derivati piridinici e N-alchilpiridinici
come host supramolecolari per
applicazioni di sensing NMR**

Relatore: Prof Fabrizio Mancin

Controrelatore: Prof.ssa Alberta Ferrarini

Laureando: Remigio Biancardi

Anno Accademico 2023/2024

Glossario	III
1. Introduzione	1
1.1. Chemosensori.....	2
1.1.1. Sensori intrinseci.....	3
1.1.2. Sensori coniugati e sensori autoassemblati.....	4
1.1.3. Problemi dei chemosensori.....	5
1.2. Nanoparticelle d'oro funzionalizzate	7
1.3. NMR Chemosensing.....	9
1.4. NOE pumping	10
1.5. Saturation Transfert Difference (STD).....	11
1.6. Water Saturation Transfert Difference (wSTD)	13
1.7. Neuroblastoma	15
2. Scopo della tesi	16
3. Risultati e discussione	18
3.1. Sintesi di nanoparticelle d'oro.....	18
3.2. Caratterizzazione delle nanoparticelle	20
3.3. Sintesi dei tioli.....	22
3.3.1. Sintesi del tiolo RB04.....	23
3.3.2. Prove di sintesi del tiolo con legame etero.....	24
3.3.3. Sintesi del tiolo RB39.....	31
3.4. Caratterizzazione e stabilità delle AuNPs monostrato con tiolo RB04.....	32
3.5. AuNPs con coating misto RB39 e PEG	37
3.6. Chemosensing delle AuNPs con HVA	40
3.7. AuNPs con coating RB39/PEG seconda sintesi.....	44
3.8. Chemosensing AuNPs N2 con HVA.....	46
4. Conclusioni	47
5. Parte sperimentale	49
5.1. Strumentazione e metodi.....	49
5.2. Materiali	50
5.3. Sintesi dei tioli.....	50
5.3.1. Sintesi dell'acido 8-(trilitio)ottanoico	50
5.3.2. Sintesi del N-(piridin-4-il)-8-(trilitio)ottanammide.....	51
5.3.3. Sintesi 1-metil-4-(8-(trilitio)ottanamido)piridin-1-io	52
5.3.4. Sintesi 4-(8-mercaptottanamido)-1-metilpiridin-1-io	52
5.3.5. Sintesi del 4-(oct-7-en-1-ilossi)piridina	53
5.3.6. Sintesi del 1-metil-4-(oct-7-en-1-ilossi)piridin-1-io	54

5.3.7.	Sintesi 4-((8-(acetiltio)ottile)ossi)-1-metilpiridin-1-io.....	54
5.3.8.	Sintesi 4-((8-(acetiltio)ottile)ossi)-1-metilpiridin-1-io.....	55
5.3.9.	Sintesi del 8-(triltio)ottan-1-olo	55
5.3.10.	Sintesi del 4-((8-(triltio)ottile)ossi)piridina	56
5.3.11.	Sintesi del 4-((8-(triltio)ottile)ossi)piridina	56
5.3.12.	Sintesi della 4-(trifenilfosfo)piridina.....	57
5.3.13.	Sintesi del 4-((8-(triltio)ottile)ossi)piridina	58
5.3.14.	Sintesi della 4-(metossi)piridina.....	58
5.3.15.	Sintesi della 4-(pentilossi)piridina.....	59
5.3.16.	Sintesi del S-(8-idrossiottile)etanetioato	59
5.3.17.	Sintesi del 8,8-disolfanedilbis(ottan-1-olo)	60
5.3.18.	Sintesi 1,2-bis(8-(piridin-4-ilossi)ottile)disolfano.....	60
5.3.19.	Sintesi 1,2-bis(8-(piridin-4-ilossi)ottile)disolfano.....	61
5.3.20.	Sintesi del 4-((8-(triltio)ottile)ossi)piridina	62
5.3.21.	Sintesi del 8-(piridina-4-ilossi)ottan-1-tiolo.....	63
5.3.22.	Sintesi 8-mercapto-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossido)etil)ottanamide... 63	
5.4.	Sintesi e caratterizzazioni delle AuNPs	64
5.4.1.	Sintesi delle AuNPs con monostrato di RB04 (M1).....	64
5.4.2.	Sintesi delle AuNPs con coating misto RB39/PEG (N1).....	65
5.4.3.	Caratterizzazione delle AuNPs N1	66
5.4.4.	Sintesi delle AuNPs con coating mistro RB39/PEG (N2).....	69
5.4.5.	Caratterizzazione delle AuNPs N2.....	70
6.	Appendice.....	73
7.	Bibliografia	85

Glossario

AuNPs	Nanoparticelle d'oro
AuNPs M1	Nanoparticelle d'oro con tiolo RB04
AuNPs N1	Nanoparticelle d'oro con tiolo 9%RB39 e 91%PEG
AuNPs N2	Nanoparticelle d'oro con tiolo 45%RB39 e 55%PEG
Composto 1	acido 8-(triltio)ottanoico
Composto 2	N-(piridin-4-il)-8-(triltio)ottanammide
Composto 3	1-metil-4-(8-(tiltio)ottanamido)piridin-1-io
RB04	4-(8-mercaptottanamido)-1-metilpiridin-1-io
A1	4-(oct-7-en-1-ilossi)piridina
A2	1metil-4-(oct-7-en-1-ilossi)piridin-1-io
A3	4-((8(acetiltio)ottile)ossi)-1-metilpiridin-1-io
B1	8-(triltio)ottan-1-olo
B2	4-((8-(triltio)ottile)ossi)piridina
C1	S-(8-idrossiottile)etanetioato
C2	8,8-disolfanediilbis(ottan-1-olo)
C3	1,2-bis(8-(piridin-4-ilossi)ottile)disolfano
Composto 5	4-((8-(triltio)ottile)ossi)piridina
RB39	8-(piridina-4-ilossi)ottan-1-tiolo
PEG	8-mercapto-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossido)etil)ottanamide
ALBN	izobisisobutironitrile
HEPES	acido 4-(2-idrossietil-1-piperazinil)etansolfonico
HVA	homovanillic acid
VMA	vanilmandelic acid
NOE	Nuclear Overhauser Effect
STD	Saturation Transfert Difference
wSTD	Water Saturation Transfert Difference
HPwSTD	High Power Water Saturation Transfert Difference
LPwSTD	Low Power Water Saturation Transfert Difference

1. Introduzione

La possibilità di identificare, con precisione, specifiche molecole in sistemi complessi, è uno degli obiettivi principali in chimica. Questa possibilità trova moltissime applicazioni in numerosi ambiti, primo tra tutti la diagnostica medica. Immaginare di riuscire a riconoscere con accuratezza, ad esempio, analiti prodotti da malattie o sostanze introdotte dall'esterno, all'interno di un sistema altamente complesso quale il corpo umano, non rappresenta solamente una difficile sfida ma anche una notevole spinta verso metodiche più efficienti e precise capaci di salvare numerose vite. Attualmente la tecnica analitica più utilizzata in chimica per la caratterizzazione di molecole organiche è la spettroscopia di "risonanza magnetica nucleare" (NMR). Tuttavia, nonostante l'elevata quantità di informazioni offerta da questa tecnica, l'abbondanza di segnali che si ottengono in uno spettro di una miscela è purtroppo il più delle volte, di difficile interpretazione. Ciò rende quindi di fatto, molto complesso riuscire a separare i segnali delle singole molecole al suo interno. Per tale ragione negli ultimi anni si è prestata sempre più attenzione nell'affinare la misura attraverso sequenze avanzate di esperimenti NMR che permettessero di isolare specifici segnali o serie di segnali. Il seguente lavoro di tesi è improntato verso un metodo per rendere selettivo il riconoscimento di analiti target, nello specifico metaboliti prodotti a partire dalle catecolammine, quali acido omovanillico (HVA) e acido vanilmandelico (VMA), all'interno di ambienti fisiologici come le urine. Ciò è utile perché la presenza di tali molecole all'interno dell'organismo, in opportuni range di concentrazioni, può rappresentare una prova con elevata attendibilità per il riconoscimento del tumore neuroblastoma¹. Per raggiungere tale scopo, sono state sintetizzate macrostrutture supramolecolari di nanoparticelle d'oro, capaci di instaurare interazioni non covalenti con gli analiti d'interesse per il loro riconoscimento. Tali macrostrutture fungono da sensori chimici (chemosensori) e per tale motivo la tecnica di risonanza magnetica ad essi associata per il riconoscimento, prende il nome di "NMR chemosensing assistita da nanoparticelle d'oro".

1.1. Chemosensori

Un chemosensore è una struttura molecolare artificiale, in grado di segnalare la presenza di altre molecole in maniera il più possibile selettiva^{2,3}. Il tipo di interazione che viene a formarsi tra il chemosensore e l'analita è di tipo supramolecolare "(Host-Guest)". Il chemosensore (Host), è generalmente più grande dell'analita, e possiede uno o più siti attivi, all'interno dei quali sono presenti gruppi funzionali, che sono i responsabili della complessazione (binding) degli analiti (Guest). Il riconoscimento, inteso come binding selettivo, tra Host e Guest è determinato dalla affinità relativa tra le due molecole, definita dalle costanti termodinamiche di binding. Le interazioni non covalenti che influenzano il binding possono essere molteplici e di diversa natura, come ad esempio interazioni idrofobiche, steriche, idrofile, di carica, potenziali redox e molte altre²⁻⁶.

La struttura di un chemosensore è generalmente rappresentabile il più delle volte, da tre unità principali: 1 unità di riconoscimento, l'unità di trasduzione del messaggio e l'unità di segnalazione (Figura 1). Ognuna di queste tre parti è responsabile di uno specifico compito. L'unità di riconoscimento è la sezione direttamente correlata al riconoscimento chimico tra Host e Guest. In questa parte del chemosensore sono presenti tutte le interazioni possibili che si possono formare tra il sensore e l'analita di interesse. Una volta formato il complesso Host-Guest, il messaggio dell'avvenuto riconoscimento è trasportato dall'unità di riconoscimento a quella di segnalazione, tramite l'unità di trasduzione. Si noti come l'unità di trasduzione non è necessariamente una specifica porzione molecolare, anzi nella maggior parte dei casi si tratta di un meccanismo che può o meno coinvolgere specifiche porzioni della molecola. Le informazioni misurabili sono generalmente variazioni di caratteristiche della supramolecola, che si osservano quando questa è legata e non legata all'analita. Alcuni esempi sono: variazioni di assorbanza, fluorescenza, di potenziale redox e di chemical-shift.

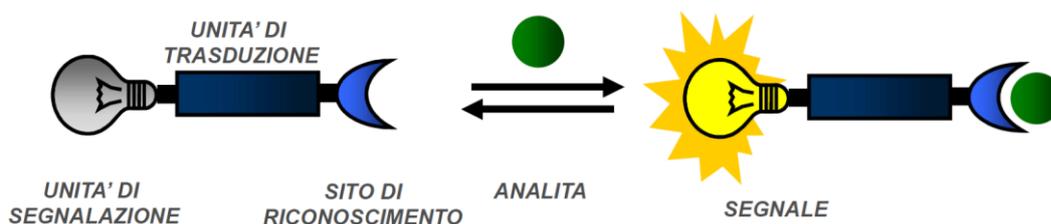


Figura 1: Rappresentazione schematica di un generico sensore ed i suoi componenti.

1.1.1. Sensori intrinseci

I sensori intrinseci rappresentano il primo gruppo di sensori molecolari sviluppati nella storia. Si tratta di sistemi in cui il sito di riconoscimento, è parte integrante dell'unità di segnalazione. Un esempio è rappresentato dai chemosensori fluorofori in cui la cavità di binding del recettore, è parte del sistema π della molecola (Figura 2). Quando il Guest si lega all'Host si produce una diretta modifica della proprietà misurabile per intervento diretto del Guest sull'Host. Tuttavia, il grande svantaggio risiede nella difficile realizzazione di questi sensori per target molecolari che non siano cationi metallici, come anioni o molecole organiche. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che, è più complesso sintetizzare siti di legame che possano stabilire interazioni non covalenti sufficientemente forti da variare direttamente le proprietà del sistema per diretta coordinazione dell'analita. Inoltre, ogni possibile modifica di legame del sito di coordinazione per rendere magari quest'ultimo adatto a legare diversi tipi di analiti, può portare a variazioni impreviste delle proprietà del sensore.

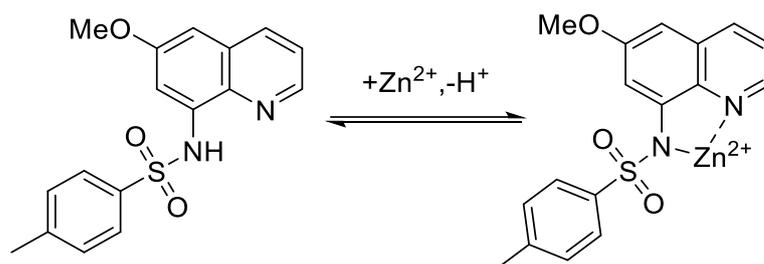


Figura 2: Rappresentazione di un chemosensore intrinseco con unità di segnalazione fluorofora per il riconoscimento del catione Zn^{2+}

1.1.2. Sensori coniugati e sensori autoassemblati

L'evoluzione dei sensori intrinseci è rappresentata dalla classe dei sensori coniugati. In queste macrostrutture supramolecolari, il sito di riconoscimento e l'unità di segnalazione, sono separati da un opportuno spacer. Lo spacer quindi rappresenta la giunzione delle due unità. Questa classe di sensori, facilita la modularità della loro costruzione, poiché i vari componenti possono essere progettati e ottimizzati individualmente per essere collegati poi successivamente in un secondo momento. Ovviamente l'unità di trasduzione deve essere scelta in modo tale da permettere comunque una comunicazione tra l'unità di riconoscimento e l'unità di segnalazione, proprio perché la presenza dello spacer non garantisce più la comunicazione tra le due unità. Ad esempio, nel caso di sensori fluorescenti, un meccanismo operante attraverso lo spazio può essere, lo spegnimento dell'emissione, (quenching) dovuto all'analita⁷ (Figura 3). Non solo, ma lo spacer varia anche le proprietà fisiche della molecola, come ad esempio la solubilità. Inserire catene alchiliche troppo lunghe tra l'unità di riconoscimento e quella di segnalazione può portare ad un abbassamento della polarità complessiva, compromettendo quindi la capacità della molecola di poter essere solubilizzata in solventi polari come l'acqua. Un'ulteriore evoluzione dei sensori coniugati è rappresentata dai sensori autoassemblati. Sistemi in cui le unità che costituiscono il sensore, si associano in maniera spontanea quando disperse in soluzione. Questa strategia dell'autoassemblaggio mostra sempre più evidenti vantaggi nella realizzazione, ottimizzazione e modificazione dei sensori. Infatti, non è più necessario preparare molecole complesse, ma piccole subunità distinte e semplici che possono poi essere selezionate e combinate per formare il sensore con le caratteristiche desiderate.

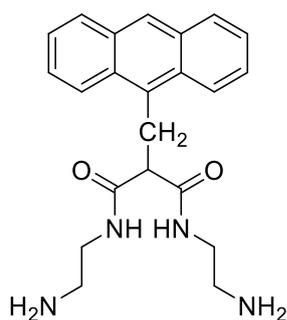


Figura 3: Chemosensore coniugato per il riconoscimento del catione Cu^{2+}

1.1.3. Problemi dei chemosensori

Nonostante i numerosi vantaggi, i chemosensori sono affetti purtroppo, da alcuni problemi. Il primo tra tutti è il problema dei “falsi positivi”, cioè dei casi in cui il sensore emette un segnale senza che l’analita sia presente. I falsi positivi sono generalmente dovuti a molecole che possiedono una struttura simile a quella dell’analita di interesse. Infatti, è abbastanza corretto pensare che, all’interno di un sistema complesso, quindi una miscela di molecole, alcune di queste possano assomigliarsi, sia nella forma oppure nei gruppi funzionali presenti. Se l’analita target possiede gruppi funzionali utili per legarsi al sito di riconoscimento del chemosensore, una molecola all’interno della stessa miscela che possiederà quegli stessi gruppi, potrà con buona probabilità legarsi anch’essa (Figura 4). In questo caso la modifica misurata nelle caratteristiche del sensore sarà la stessa sia che si sia legato l’analita, sia che si sia legato il falso analita. Ciò rende quindi di fatto molto complesso capire se il riconoscimento è corretto oppure no. Per ovviare a questo problema, una soluzione sarebbe quella di sintetizzare chemosensori molto selettivi in modo tale da ridurre al minimo la probabilità che questi possano legare falsi positivi. Ciò può essere fatto ad esempio inserendo più interazioni diverse all’interno della cavità di binding. Tuttavia, però, ciò comporta non soltanto una elevata difficoltà nella sintesi, ma anche una versatilità più bassa. Poiché il chemosensore sarebbe altamente specifico per una singola molecola e quindi risulterebbe applicabile in un minor numero di campi.

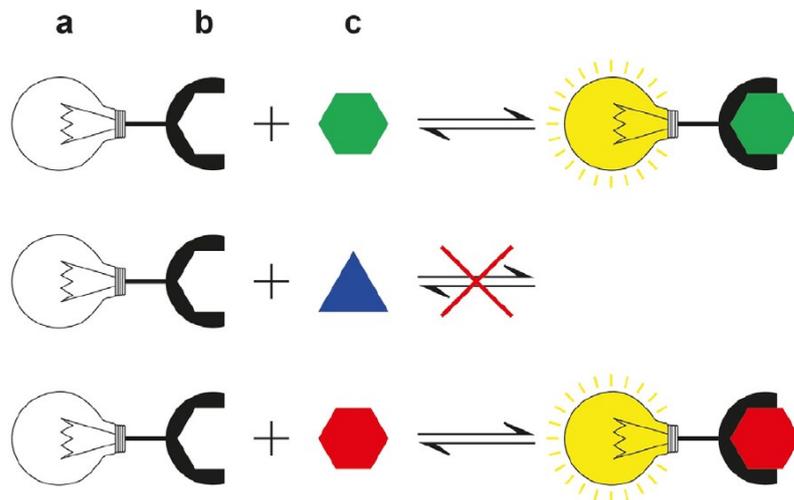


Figura 4: Approccio convenzionale di chemosensing. In figura sono riportati: unità di segnalazione (a), sito di riconoscimento del sensore (b), analita (c). Il limite di questi sensori è che non distinguono due analiti diversi ma ugualmente interagenti (verde e rosso) dato che il segnale generato è lo stesso.

Un'altra possibile soluzione è rappresentata dal “chemosensing indiretto”. In questo caso, il chemosensore è sintetizzato per fornire una risposta diversa in base al diverso tipo di analita che si lega. Questa classe di chemosensori, infatti, genera tramite l’unità di segnalazione un diverso tipo di segnale per le varie tipologie di molecole che potranno legarsi ad esso. In questo modo è possibile avere un metodo alquanto semplice per caratterizzare la composizione di una miscela (Figura 5). Tuttavia, anche in questo caso, la sintesi di questa classe di sensori risulta essere molto complessa e la flessibilità, in termine di numero di analiti riconosciuti e segnalati, limitata.

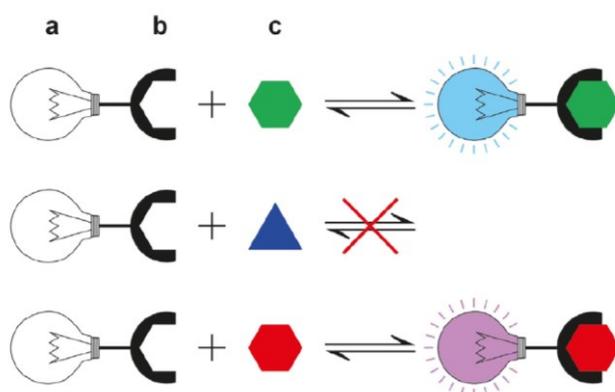


Figura 5: Approccio indiretto di chemosensing. Il segnale generato è diverso (azzurro, lilla) quando analiti simili (verde, rosso) vengono riconosciuti dal sensore.

Se ipotizzassimo di riuscire ad avere un segnale misurabile generato dall’analita stesso invece che dal sensore, quando questi si legano, riusciremo a risolvere sia il problema dei falsi positivi, poiché il segnale misurabile sarebbe strettamente legato alla struttura del guest che entra, sia ad avere un sensore che ci permette di investigare anche molecole non note. Tale tecnica esiste e prende il nome di “chemosensing diretto”. Una sua applicazione è rappresentata dal “NMR Chemosensing assistito da nanoparticelle d’oro” (Figura 6).

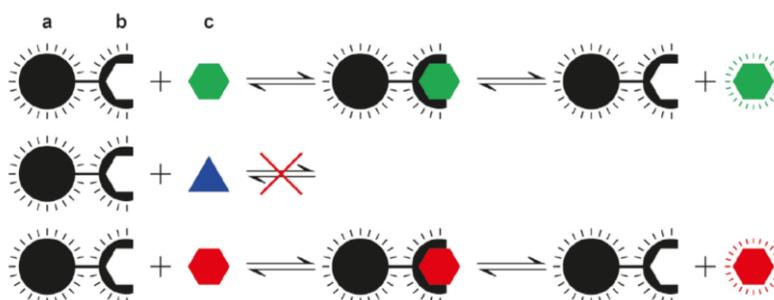


Figura 6: Approccio diretto di chemosensing. Il chemosensore è costituito da: un supporto (a), un sito di riconoscimento (b). In questo caso il segnale viene generato dagli stessi analiti interagenti (verde, rosso).

1.2. Nanoparticelle d'oro funzionalizzate

La branca della scienza che si occupa delle nanoparticelle, nota come "nanotecnologia", è emersa come un'area di intensa ricerca scientifica e comprende applicazioni nei campi della medicina, dell'elettronica, dei biomateriali e della produzione di energia⁸. Il motivo per il quale le nanoparticelle hanno avuto così tanto successo è dovuto alle proprietà uniche degli elementi che le compongono quando le loro dimensioni sono ridotte a livello nanometrico. In generale, le proprietà delle particelle di dimensioni superiori al micron non differiscono in modo significativo dalle loro controparti sfuse. Tuttavia, quando le particelle vengono ridotte a livello nanometrico, le loro proprietà fisiche e chimiche (ad esempio, punto di fusione, fluorescenza, conducibilità elettrica, permeabilità magnetica e reattività chimica) possono cambiare drasticamente. I cambiamenti di queste proprietà sono fortemente influenzati dalle dimensioni, dalla forma e del materiale che costituisce le particelle. Tra le possibili strutture di nanoparticelle, quelle formate da atomi di oro sono tra le più utilizzate e studiate. Le nanoparticelle d'oro (AuNPs) sono preferite rispetto a quelle di altri atomi inorganici perché si sono dimostrate estremamente biocompatibili con le cellule umane, con pochi casi di presunta tossicità e quindi possono essere utilizzate in applicazioni biomediche. Per sintetizzare AuNPs si possono utilizzare due approcci principali: Il metodo "*bottom-up*" e quello "*top-down*". Il primo metodo consiste nell'assemblare atomi di oro metallico Au(0) prodotti dalla riduzione di ioni di Au (III) e Au(I) per ottenere le nanostrutture desiderate. Il metodo *top-down* invece, sfrutta tecniche di rimozione di materia da un materiale massivo fino ad ottenere la nanostruttura desiderata. Nel seguente lavoro di tesi verrà utilizzata una via di sintesi *bottom-up* che rappresenta una modifica di uno dei più famosi processi per la sintesi di nanoparticelle d'oro di circa 2nm, che è il metodo Brust-Schiffin⁹.

Quando si parla di AuNPs funzionalizzate, ci si riferisce a delle strutture colloidali macromolecolari di dimensioni nanometriche composte da due principali componenti: un core che rappresenta il nucleo della nanoparticella, formato da atomi di oro metallico, ed un coating superficiale composto generalmente da molecole organiche con opportuni gruppi funzionali (Figura 7). Il possibile vantaggio di queste strutture è che possono riprodurre il comportamento biologico ligando-proteina^{6,10,11}, che nei fatti è sempre un riconoscimento Host-Guest. Questo potenziale deriva da diverse caratteristiche, la prima delle quali è l'elevata somiglianza delle AuNPs con le proteine in termini di dimensioni e complessità chimica. Ciò facilita lo sfruttamento di effetti cooperativi multivalenti, ulteriormente favoriti dalla moderata flessibilità dinamica del monostrato organico. In secondo luogo, la chimica versatile delle AuNPs consente l'innesto di recettori molecolari e cofattori sulla loro superficie. Sfruttando diversi tipi di interazioni non covalenti, tali recettori possono a loro volta fornire siti di legame

personalizzati per praticamente qualsiasi classe di substrati. La varietà di monostrati che possono essere potenzialmente assemblati consente una regolazione fine di queste interazioni non solo in termini di selettività, ma anche di forza¹². La struttura radiale della nanoparticella e l'impacchettamento delle molecole di rivestimento orientano i siti di legame in una disposizione quasi parallela, che può aumentare l'efficacia del processo di riconoscimento, pur mantenendo una flessibilità tale da consentire aggiustamenti posizionali e riorganizzazioni conformazionali. La AuNP funge quindi da modello per raggruppare molti siti di legame in uno spazio ridotto e indurre la loro parziale preorganizzazione. Inoltre, la formazione delle AuNPs è essenzialmente un processo di autoassemblaggio, che offre quindi una scorciatoia efficace per la realizzazione di sistemi complessi con uno sforzo sintetico limitato. Infatti al nucleo, formato principalmente da atomi di Au(0) e qualche atomo di Au(I), si adsorbono sulla superficie le unità funzionali che sono generalmente lineari e possiedono ad una delle 2 estremità della catena, un gruppo tiolo in modo tale da poter instaurare un legame stabile Au-S e all'altra estremità, sono dotate con i diversi gruppi funzionali per il riconoscimento.

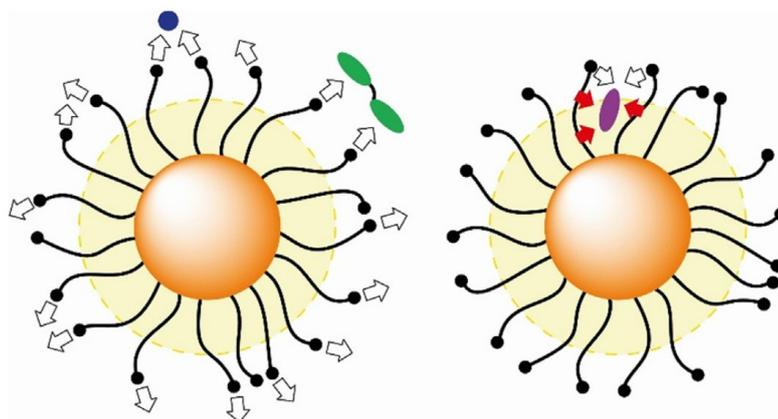


Figura 7: Interazione tra il monostrato di AuNPs e piccoli analiti (blu, verde, viola). Il cerchio giallo tratteggiato rappresenta la zona idrofobica del monostrato, le frecce bianche e rosse le interazioni con i gruppi funzionali terminali e con la catena alchilica dei leganti rispettivamente.

1.3. NMR Chemosensing

La tecnica di “NMR chemosensing assistita da nanoparticelle d’oro” permette di generare segnali provenienti dall’analita stesso nella forma di spettri NMR⁵. Per poter fare ciò si utilizzano sistemi di nanoparticelle opportunamente funzionalizzate per formare un complesso Host-Guest con l’analita il trasferimento di magnetizzazione NOE (Figura 8). Dal punto di vista NMR, la tecnica di chemosensing sfrutta la ridotta velocità di diffusione traslazionale e rotazionale delle nanoparticelle, che sono sistemi voluminosi rispetto alle molecole più piccole che si trovano in soluzione. In questo modo è possibile gestire gli stati degli spin del monostrato e utilizzare la nanoparticella come un serbatoio di magnetizzazione che verrà poi trasferita agli analiti che si andranno a legare ad essa. Infatti, il basso tempo di correlazione e la maggiore rigidità delle molecole che rivestono la superficie della nanoparticella, poiché legate ad essa e con poco spazio a disposizione a causa dell’elevato numero, favorisce un’efficiente diffusione degli spin. Ottimizzando le nanoparticelle e gli esperimenti di trasferimento di magnetizzazione/saturazione è inoltre possibile abbassare il limite di rilevabilità fino ad ordini di concentrazione micromolare¹³, portando quindi questa tecnica a poter essere utilizzata anche in settori molto complessi come la diagnostica.

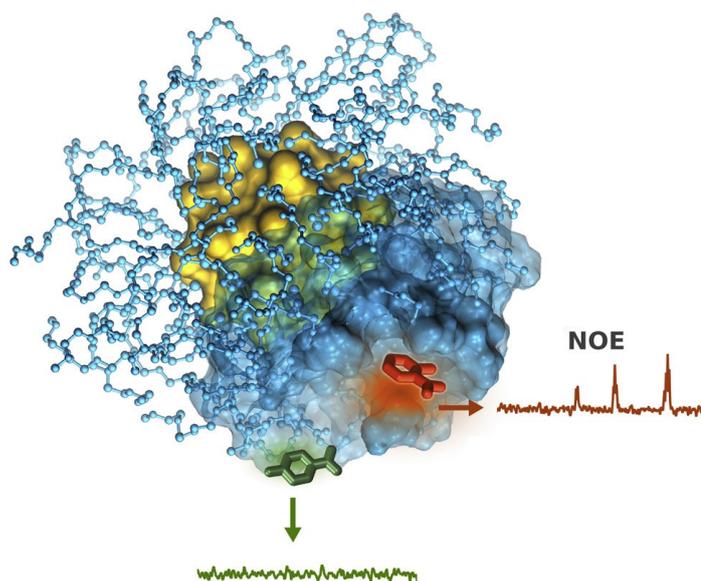


Figura 8: Rappresentazione ideale di un esperimento di chemosensing assistito da nanoparticelle d’oro protette da un monostrato organico. La molecola arancione interagisce con la macromolecola, quella verde no.

1.4. NOE pumping

Una delle prime sequenze sviluppate per le tecniche di NMR chemosensing assistite da nanoparticelle è il “NOE pumping”⁶. Il NOE pumping sfrutta il “Nuclear Overhauser Effect” per trasferire la magnetizzazione dalla nanoparticella agli analiti ad essa legati. L’intera sequenza è schematizzabile in due step: Il primo step consiste nell’applicare, successivamente al primo impulso di 90°, un filtro di diffusione. Lo scopo del filtro è sostanzialmente quello di eliminare (defasandoli) i segnali delle molecole piccole che possiedono un’elevata velocità di diffusione⁶. In questo modo gli unici segnali rimanenti, corrispondenti alle uniche specie ancora magnetizzate, saranno quelli delle nanoparticelle che essendo più grandi, diffonderanno più lentamente. Subito dopo aver applicato il filtro, viene effettuato un esperimento NOE. Ciò rende possibile, rilevare i segnali delle piccole molecole che interagiscono con la macromolecola nel regime di scambio rapido, poiché queste ultime, hanno ricevuto la magnetizzazione trasferita dalla macromolecola (nanoparticella). Il segnale che viene rilevato viene quindi emesso dall’analita stesso, di fatto è il suo spettro NMR, consentendo, una identificazione univoca della sua struttura. Qualora i segnali emessi dall’analita in soluzione si sovrappongono con quelli emessi dal coating della nanoparticella, è possibile applicare un ulteriore filtro che agisce sul tempo di rilassamento T2 (CPMGz) per eliminare i segnali dovuti alla nanoparticella stessa. In questo modo si avranno solamente i segnali degli analiti (Figura 9).

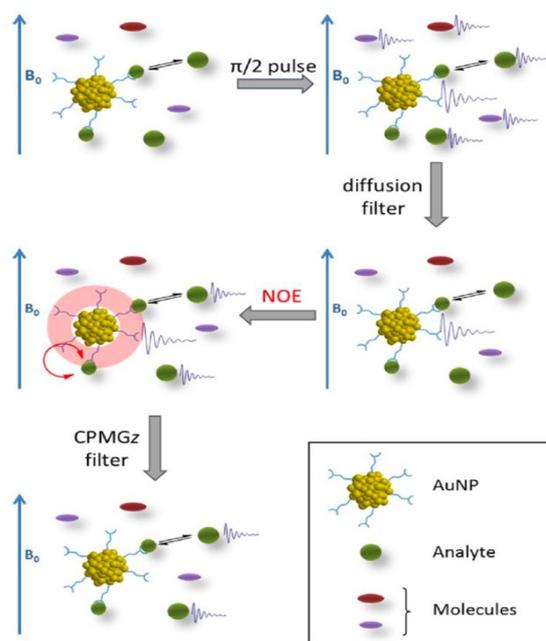


Figura 9: Sequenza NMR di un classico esperimento di NOE pumping con filtro CPMGz.

1.5. Saturation Transfert Difference (STD)

Il trasferimento di magnetizzazione NOE implementato nel chemosensing NMR si basa sull'inversione di popolazione degli spin tra monostato e analita, ma un risultato simile può essere raggiunto saturando, piuttosto che invertendo le popolazioni. Infatti, le nanoparticelle possiedono un meccanismo di diffusione degli spin piuttosto efficiente, che apre la strada a esperimenti di "Saturation Transfert Difference"⁵ (STD). Pur essendo concettualmente simile a un esperimento NOE, l'esperimento STD fornisce segnali più forti perché la saturazione è efficace per periodi più lunghi rispetto al NOE transitorio. Infatti, è stato recentemente dimostrato che l'STD assistito da nanoparticelle può rilevare analiti fino a concentrazioni di 30 μM con strumentazione standard. L'esperimento STD consiste nello scegliere una specifica radiofrequenza alla quale risuonano i protoni dei tioli sulla nanoparticella ma distante dai valori di chemical shift degli analiti. L'irradiazione a radiofrequenza è costante e satura le transizioni tra gli stati energetici degli spin. A causa di ciò, la differenza di distribuzione delle popolazioni di spin nei livelli energetici (livello energetico fondamentale e livello energetico a più alta energia) è annullata. Siccome l'impulso è costante nel tempo, la nanoparticella continua a rimanere satura durante tutto l'esperimento. Ciò permette quindi, di aumentare la riserva di saturazione che verrà poi trasferita per effetto NOE agli analiti che si legheranno a quest'ultima. Affinché si possa fare un esperimento di STD è importante che la nanoparticella e l'analita siano in un regime di scambio veloce, ovvero che la costante di binding Host-Guest non sia troppo elevata. Ciò è dovuto a due motivi differenti. Il primo è che, se l'analita rimane legato alla superficie della nanoparticella, la saturazione verrà trasferita solo a poche molecole, mentre in caso di scambio veloce il numero di molecole che ricevono la saturazione è maggiore. Il secondo motivo è che, rimanendo legato alla particella, l'analita ne assume il tempo di correlazione subendo un notevole allargamento dei segnali NMR e una conseguente diminuzione, dell'effettiva intensità nello spettro NMR (Figura 10).

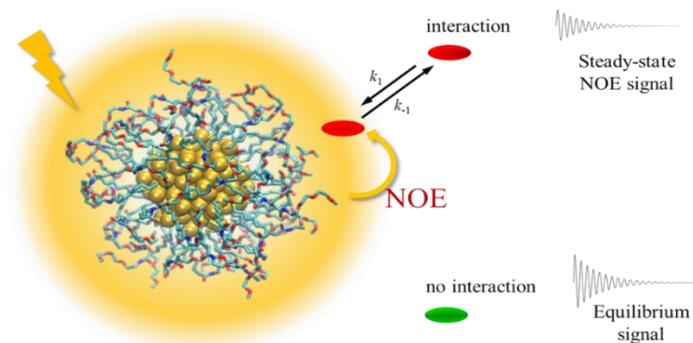


Figura 10: Irradiazione dei protoni del recettore (area gialla), in questo caso l'AuNP; la specie in rosso interagisce con la macromolecola che le trasferisce saturazione per effetto NOE e sperimenta una riduzione del segnale, quella verde non interagisce.

Una volta registrato lo spettro NMR durante l'esperimento STD, le molecole che hanno ricevuto saturazione, avranno un'intensità dei segnali modificata rispetto allo spettro protonico originale. Si registrano quindi 2 spettri protonici. Uno *on-resonance*, nel quale vengono saturati i protoni del recettore e uno spettro *off-resonance* (registrato saturando a valori di chemical shift lontani da quelli delle specie presenti nel campione), che funge da riferimento. In questo modo è possibile evidenziare l'effettiva perturbazione subita dai protoni dalla differenza dei 2 spettri in cui vengono eliminati tutti i segnali delle specie che non hanno interagito con la nanoparticella magnetizzata mentre rimangono solo quelli delle specie che hanno interagito. Lo spettro differenza fornisce anche informazioni sul modo di legami, poiché i protoni spazialmente più vicini ai protoni saturati risentiranno maggiormente della saturazione, mentre quelli distanti rimarranno sostanzialmente inalterati. Lo spettro differenza che si ottiene si chiama quindi "spettro STD" (Figura 11).

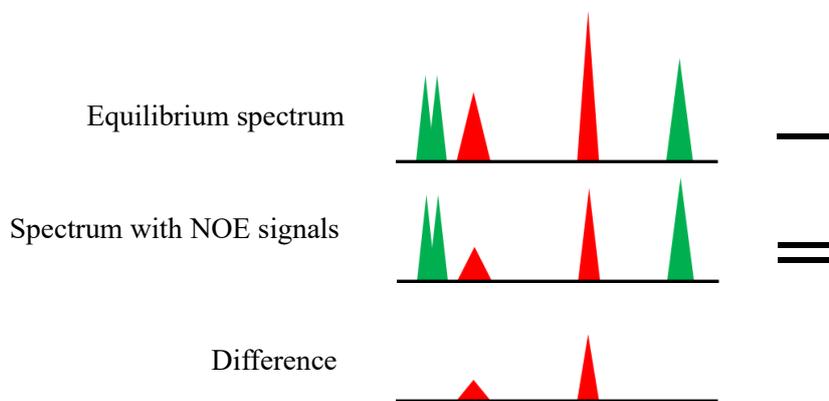


Figura 11: Rappresentazione schematica dello spettro STD risultante. In alto lo spettro acquisito *off-resonance*, al centro quello *on-resonance*, in basso lo spettro differenza. Quest'ultimo mostra solo i segnali della specie interagente (rosso).

1.6. Water Saturation Transfert Difference (wSTD)

Simile al concetto della sequenza STD è l'esperimento di "Water Saturation Transfert Difference" (wSTD). In questo caso si utilizza una radiofrequenza che satura le molecole di acqua, anziché i protoni dei tioli attaccati sulla superficie della nanoparticella. Infatti, le nanoparticelle in soluzione hanno un guscio di solvatazione con molecole di acqua con tempi di residenza molto lunghi, dell'ordine dei nanosecondi, la saturazione, grazie al lungo tempo di permanenza delle molecole nel monostato, viene trasferita ad esso ma anche ad eventuali analiti che si legano alla AuNP. Anche in questo caso è necessario acquisire uno spettro *on-resonance* ed uno *off-resonance*. In questo caso, si osservano due effetti NOE: uno positivo per il trasferimento di saturazione da parte delle molecole d'acqua libere e un effetto NOE negativo e più intenso per quelle legate (Figura 12).

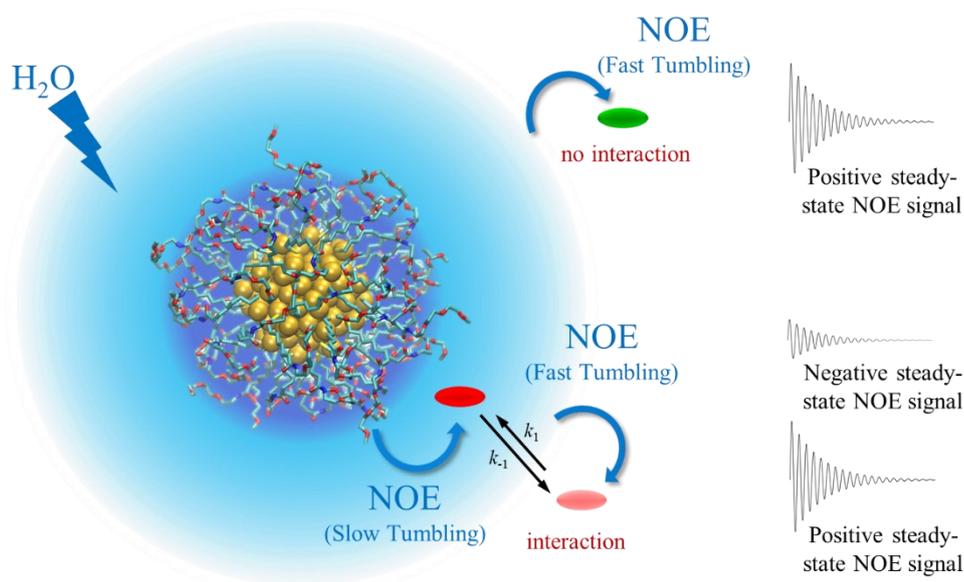


Figura 12: Irradiazione dei protoni dell'acqua (area azzurra); le molecole di acqua associate alla macromolecola generano nella molecola in rosso (interagente) un NOE stazionario negativo quando la molecola è legata e positivo quando la stessa molecola è libera in soluzione. La molecola verde non interagisce e riceve solo NOE positivo.

Nello spettro che si ottiene, sono quindi presenti i segnali appartenenti a tutte le specie, interagenti e non (segnali negativi associati agli analiti interagenti e positivi ai non interagenti) seppur con intensità differenti.

Un notevole miglioramento negli spettri si è ottenuto eliminando il contributo del NOE positivo associato alle specie in soluzione, responsabile sia della presenza dei segnali positivi delle specie libere che del calo di intensità dei segnali delle specie interagenti, che ricevono

sia NOE positivo che negativo. Ciò è stato realizzato dal gruppo del prof. Rastrelli utilizzando impulsi ad alta intensità in quella che è stata chiamata sequenza “High Power Water Saturation Transfert Difference” (HPwSTD). Il fatto di utilizzare impulsi ad alta potenza consente sia di eliminare i contributi delle molecole libere di solvente che di massimizzare quelli delle molecole legate (Figura 13) Questo ha portato ad efficienze ottimali di rivelazione consentendo di individuare analiti anche a concentrazioni di 10 μM .

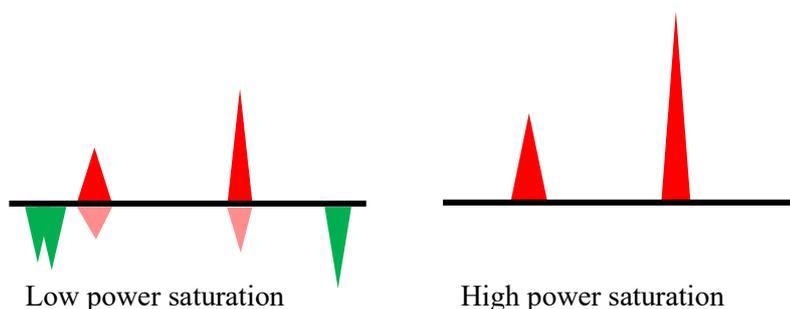


Figura 13: Rappresentazione schematica dei contributi NOE negli spettri WaterSTD, low-power (a sinistra) e high-power (a destra). Nello spettro LP sono presenti i segnali delle specie interagenti (rossi) e non interagenti (verde), mentre nello spettro HP, dove vengono eliminati tutti i contributi con polarizzazione negativa, si notano solamente quelli delle specie interagenti e con intensità aumentata. Per una maggiore chiarezza della figura, gli effetti NOE positivi e negativi sono stati invertiti (Negativi sopra, positivi sotto).

1.7. Neuroblastoma

Il neuroblastoma è un tumore maligno che ha origine dai neuroblasti, cellule presenti nel sistema nervoso simpatico. È il tumore solido extracranico più frequente nei bambini in età prescolare¹. Secondo i dati dell'Associazione italiana registri tumori (AIRTUM), il neuroblastoma rappresenta circa il 10% di tutti i tumori registrati dalla nascita ai 14 anni. In particolare, è il tumore più frequente in età neonatale. Questa neoplasia si presenta quasi sempre come forma sporadica, ovvero non è legata a una storia familiare di neuroblastoma. Solo nell'1%-2% dei casi i bambini ereditano dai genitori una maggiore probabilità di sviluppare la malattia. I segni e i sintomi del neuroblastoma possono essere molto diversi a seconda della parte del corpo interessata. Se la malattia si sviluppa nell'addome si potranno per esempio notare masse che, crescendo, possono portare a mancanza di appetito, sensazione di sazietà o dolore a livello addominale. Oltre ai disturbi dovuti alla pressione della massa tumorale sugli organi e le strutture con cui viene in contatto, spesso nel neuroblastoma sono presenti sintomi sistemici come tachicardia, ipertensione, febbre, manifestazioni emorragiche spontanee ed ecchimosi. Oggi il neuroblastoma viene identificato con discreta efficacia dall'analisi delle urine. Un'attenzione particolare è rivolta alle catecolamine urinarie, ormoni prodotti dalle cellule nervose simpatiche, e ai loro metaboliti (sostanze in cui le catecolamine vengono trasformate una volta che hanno espletato la loro funzione). Nello specifico, si misurano i valori di concentrazione del HVA e del VMA riportati come mmol/mol di creatinina. Definire lo stadio di un tumore (stadiazione) significa stabilire quanto una malattia è diffusa. Esso è un passaggio essenziale, che aiuta il medico a scegliere le terapie più efficaci e perciò di estrema importanza.

2. Scopo della tesi

Come descritto nei capitoli precedenti, nanoparticelle d'oro opportunamente funzionalizzate possono agire come unità di riconoscimento in sistemi di "NMR chemosensing" basati sul trasferimento di magnetizzazione/saturazione. Nonostante il metodo non richieda intrinsecamente l'uso di Host selettivi, dal momento che il segnale viene emesso dall'analita stesso, una certa selettività può essere necessaria quando si vadano ad analizzare miscele contenenti composti molto simili. Questo tipo di campioni infatti potrebbe generare una quantità eccessiva di segnali, rendendo impossibile l'identificazione del campione.

Nei sistemi Host-Guest la selettività viene ottenuta progettando la struttura chimica dell'Host in modo da implementare interazioni complementari con il guest. L'effetto positivo di tali interazioni complementari viene amplificato dalla complementarità di forma e dalla preorganizzazione dell'Host. Nel caso delle nanoparticelle vi sono alcune limitazioni. In particolare, la natura dinamica del monostrato rende difficile introdurre elementi di preorganizzazione e complementarità di forma

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di sintetizzare nanoparticelle d'oro per il riconoscimento tramite tecniche di sensing NMR, dei metaboliti VMA e (HVA) (Figura 14) in ambiente acquoso.



Figura 14: In figura sono mostrati i 2 analiti target. (Analita A) Acido vanilmandelico, (Analita B) Acido omovanillico.

Queste molecole possiedono diversi rilevanti siti di interazione. A pH fisiologico il gruppo carbossilico è deprotonato e carico positivamente mentre il resto della molecola è sostanzialmente poco polare. Ne consegue che la caratteristica più rilevante di queste molecole è una natura di anfifilo anionico.

In effetti, nanoparticelle coperte da tiolici alchilici con un gruppo terminale cationico (trimetilammonio, guanidinio) si sono rivelate efficaci come recettori per guest molecolari di struttura simile.

Esistono però altre possibili interazioni, oltre a quelle di coppia ionica e idrofobica, che potrebbero essere utilizzate per aumentare la selettività delle nanoparticelle. Infatti, VMA e HVA possiedono un residuo aromatico elettron-ricco e diversi residui accettori di legami a idrogeno (l'OH fenolico è impegnato in un legame a idrogeno intramolecolare ed è quindi poco disponibile). Infine, HMA possiede anche un sito donatore di legami a idrogeno (il gruppo ossidrilico).

Ci si è quindi proposti di verificare l'effetto dell'introduzione di un gruppo aromatico elettron-povero nel monostato, in modo da introdurre interazioni di tipo p o addirittura donatore-accettore. La scelta è caduta sui derivati di tipo N-alchilpiridinio, che coniugano la caratteristica di aromatici elettron-poveri con la presenza di una carica positiva.

Il progetto prevedeva quindi la progettazione e sintesi di questi leganti, delle nanoparticelle d'oro ricoperte con essi e, la verifica della loro efficacia come recettori per il NMR chemosensing, in particolare tramite esperimenti HPwSTD, che hanno dimostrato finora la maggior sensibilità.

3. Risultati e discussione

3.1. Sintesi di nanoparticelle d'oro

Come precedentemente enunciato, per quanto riguarda il seguente lavoro di tesi, è stata studiata la possibile applicazione delle AuNPs come recettori molecolari.

Per la sintesi di queste nanostrutture è stato utilizzato un metodo *bottom-up* simile alla famosa sintesi Brust-Schiffrin ma variata in alcuni passaggi dal Professor Paolo Scrimin e collaboratori¹⁴, per ottimizzarla ai nostri scopi ed ottenere AuNPs con una controllata distribuzione dimensionale del diametro del nucleo metallico che si aggira intorno ai 2 nm. Infatti, è molto importante, per poter ottenere un chemosensore efficace, che la nanoparticella non sia eccessivamente grande ma neanche troppo piccola. Un nucleo metallico di dimensioni intorno ai 10 nm, come è possibile ottenere da una sintesi di nanoparticelle seguendo ad esempio la via sintetica della Turkevich⁸, è sconsigliato per realizzare AuNPs con funzione di chemosensore. Il motivo è dovuto alla minor curvatura superficiale di queste particelle. In una particella di grandi dimensioni le unità funzionalizzate che costituiranno il coating si troveranno ad essere più vicine le une con le altre e meno mobili, andando quindi a diminuire drasticamente la possibilità di formare cavità di binding utili per legare l'analita (Figura 15). D'altro canto, nanoparticelle con diametro inferiore ai 2 nm presenterebbero un monostrato troppo mobile e disorganizzato, oltre ad avere dimensioni troppo piccole per favorire i trasferimenti di magnetizzazione/diffusione.

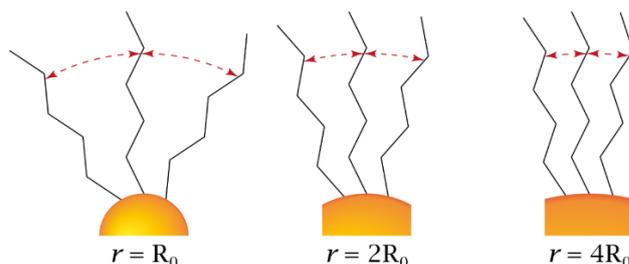


Figura 15: Visione di nanoparticelle d'oro funzionalizzate con diversa curvatura superficiale.

La procedura usata per la sintesi delle AuNPs prevede la riduzione in soluzione di un sale di oro, come l'acido tetracloroaurico (HAuCl_4), tramite un agente riducente che porti gli atomi di oro da Au(III) a Au(0). Gli atomi di oro metallico così ottenuti agiscono come centri di nucleazione e al procedere della reazione, crescono fino a formare le nanoparticelle. Tale sintesi può essere schematizzata in 2 fasi. La prima fase è la formazione del nucleo d'oro e la successiva è la sua passivazione con tioli. Operativamente, l' HAuCl_4 in soluzione acquosa è estratto nel solvente organico toluene. Affinché si possa avere il passaggio del sale dalla fase

acquosa a quella organica, viene utilizzato il tetraottilammoniobromuro (TOAB) come trasferitore di fase. Gli atomi di Au(III) presenti nella fase organica vengono poi ridotti usando diottilammina (DOA) che funge anche da agente stabilizzante. Infatti, la DOA ha il compito di passivare la superficie delle nanoparticelle contribuendo al loro controllo dimensionale. Inoltre essa riduce parzialmente lo stato di ossidazione da Au(III) a Au(I) ossidandosi a radicale ammina. La riduzione è un processo veloce e chiaramente visibile, in quanto la soluzione cambia colore passando dal colore rosso arancio a incolore. La successiva riduzione del Au(I) a Au(0) viene effettuata aggiungendo alla soluzione boroidruro di sodio (NaBH_4). Anche in questo caso la riduzione è visibile da una variazione della colorazione da incolore a rosso scuro. Infine, vengono aggiunti i tioli funzionalizzati che andranno a passivare la superficie tramite legame Au-S e che costituiranno il coating della nanoparticella sostituendo la DOA precedentemente legata alla superficie. Nel seguente lavoro di tesi, sono state sintetizzate sia nanoparticelle con coating omogeneo che misto. Per quest'ultima classe di composti è necessario calcolare il giusto rapporto in moli dei tioli da aggiungere. L'ottenimento del coating misto può essere fatto in 2 modi: il primo è per scambio di legante, ovvero si sintetizza dapprima una nanoparticella monostrato, in uno dei 2 tioli e successivamente si aggiunge alla soluzione di nanoparticelle, il secondo tiolo che si scambia con il primo sulla superficie. Il secondo metodo è per aggiunta diretta. I due tioli vengono mischiati in un'unica soluzione nel giusto rapporto in moli e successivamente aggiunti, quindi, alla soluzione contenente le nanoparticelle stabilizzate da diottilammina. Purtroppo, entrambi i metodi sono puramente empirici e non è quindi possibile prevedere quale funzioni meglio e quale due tioli andrà a legarsi preferenzialmente alla superficie. Il campione viene poi purificato dal trasferitore di fase e dalle altre impurezze presenti in soluzione, come il tiolo in eccesso. Questa purificazione può essere eseguita in diversi modi a seconda del tipo di nanoparticelle ottenute. Spesso, sfruttando l'alto peso delle AuNPs, si utilizzano lavaggi e centrifugazioni seguiti poi da cromatografia ad esclusione dimensionale. I vantaggi derivanti dall'introduzione di questo metodo di sintesi del Professor Scrimin, si concretizzano innanzitutto in un miglior controllo dimensionale che permette di ottenere particelle di piccole dimensioni, intorno a 1-3 nm, piuttosto mono-disperse. Inoltre, questo metodo utilizza una minor quantità di tioli ed è compatibile con un maggior numero di gruppi funzionali.

3.2. Caratterizzazione delle nanoparticelle

Le nanoparticelle ottenute e purificate sono state caratterizzate attraverso diverse tecniche:

- **TEM o microscopia elettronica a trasmissione:** è una tecnica che fornisce informazioni riguardo la forma e la dimensione del nucleo d'oro. L'immagine bidimensionale registrata si ottiene dall'interferenza del fascio di elettroni che viene generato dallo strumento e che colpisce il campione posto al suo interno. L'immagine mostra zone chiare (aree della griglia in cui non è presente il campione) e zone scure (aree in cui è presente il campione che assorbe il fascio) Da tali immagini è possibile misurare tramite applicazioni computerizzate, il diametro delle nanoparticelle illustrate e da questi valori, riuscire ad avere una distribuzione gaussiana della dimensione media delle nanoparticelle.
- **Spettroscopia UV-Vis:** L'analisi spettrofotometrica UV-Vis viene usata come metodo semplice e veloce per valutare le dimensioni delle particelle. Dallo spettro di assorbimento UV-Vis viene osservato il caratteristico picco di assorbimento della banda plasmonica a 520 nm. Tale picco è tipico delle nanoparticelle che hanno un diametro superiore ai 3 nm, l'assenza di tale banda costituisce quindi prova del fatto che le nanoparticelle sono più piccole o uguali a 3 nm.
- **TGA o analisi termogravimetrica:** è una tecnica che comporta la pirolisi di un materiale all'interno di un forno monito di bilancia per monitorare le variazioni di peso. Tale caratterizzazione viene utilizzata per misurare la quantità di materiale organico presente sulla superficie delle nanoparticelle quindi di fatto, la quantità di tiolo legato. Il campione viene esposto a temperature crescenti fino a 1000 °C sotto flusso d'aria. Raggiunto il valore di 1000 °C ciò che rimarrà sul piatto della bilancia all'interno del forno sarà esclusivamente materiale inorganico che resiste alle alte temperature. Dall'analisi del termogramma è possibile calcolare la variazione di peso del campione e quindi ottenere un'informazione quantitativa sui tioli presenti sulla superficie. Il valore ottenuto dal termogramma e la distribuzione dimensionale ottenuta tramite il TEM consentono di determinare insieme il rapporto tra l'Au e il tiolo all'interno della struttura della AuNP.
- **Spettroscopia NMR:** è una tecnica di fondamentale importanza e molto utilizzata per studiare la composizione e le proprietà del monostrato di nanoparticelle, con diametro di circa 2 nm. In primo luogo, lo spettro NMR delle AuNPs, disperse nel solvente

opportuno, conferma l'avvenuta formazione del monostrato e la rimozione dei reagenti organici (trasferitore di fase, diottilammina, tiolo in eccesso). Comparando lo spettro NMR delle AuNPs con quello dei tioli liberi, è evidente un notevole allargamento dei segnali con perdita della struttura iperfine, indicando un cambiamento significativo nella mobilità delle molecole. Questo cambiamento è attribuito al denso impacchettamento dei tioli nel monostrato, il quale induce una rigidità molecolare che riduce la libertà conformazionale. Questo comporta una diminuzione del tempo di rilassamento spin-spin dei protoni presenti nelle molecole del monostrato. I protoni che rilassano più rapidamente avranno segnali più larghi nello spettro NMR. Di conseguenza, la larghezza di riga aumenta man mano che la distanza degli spin dal nucleo diminuisce. In particolare, la formazione del monostrato è confermata dall'assenza dei segnali associati ai metileni adiacenti all'atomo di zolfo (tra 2.2 e 2.7 ppm) nello spettro $^1\text{H-NMR}$. Questi segnali non sono più visibili a causa dell'estremo allargamento dei segnali causato dall'impedimento alla rotazione attorno al legame S-C, dovuto alla densa impacchettatura dei tioli nel monostrato. Inoltre, oltre allo spettro $^1\text{H-NMR}$, viene acquisito uno spettro con filtro di diffusione. Questa sequenza di acquisizione permette di rimuovere i segnali delle molecole che diffondono velocemente, consentendo di mantenere solo i segnali associati alle nanoparticelle stesse per valutarne meglio la composizione.

3.3. Sintesi dei tioli

Come spiegato nel paragrafo precedente, i leganti scelti presentano come gruppi terminali residui di piridina (Figura 16), che possono acquisire una carica positiva sia per protonazione o alchilazione dell'azoto piridinico. Le due molecole sono state scelte perché presentano caratteristiche complementari. Il composto **3** (Figura 17) è sinteticamente più accessibile e dovrebbe essere caratterizzato da una maggior basicità dell'azoto piridinico, per l'effetto elettron-donatore del gruppo amminico in posizione 4, ma è potenzialmente meno stabile per la possibile idrolisi del legame ammidico. Al contrario, **RB39** presenta maggiori difficoltà sintetiche e minor basicità, compensate dalla maggior stabilità del legame etereo. Per la caratterizzazione dei prodotti finali sono stati registrati gli spettri di massa ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$.

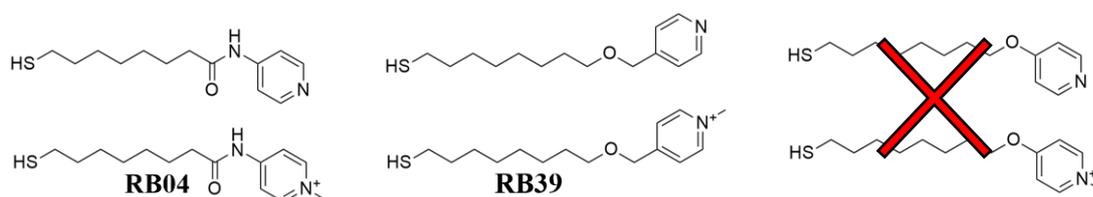


Figura 16: In figura sono riportati i tre tioli funzionalizzati (neutri e carichi alchilati) con gruppi piridinici che si volevano sintetizzare nel seguente lavoro di tesi. A sinistra il tiolo con legame ammidico (**RB04**) al centro il tiolo con legame etereo (**RB39**) a destra il tiolo con legame etereo non sintetizzato.

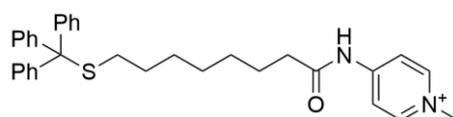


Figura 17: Struttura della molecola **3** con gruppo protettore tritile.

3.3.1. Sintesi del tiolo RB04

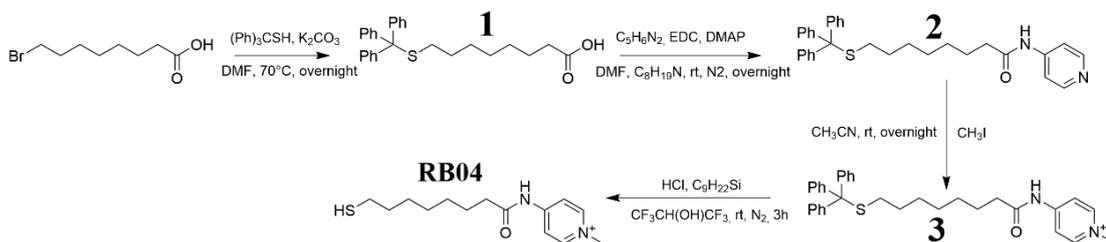


Figura 18: Schema del processo di sintesi del tiolo **RB04**.

Come accennato la sintesi del tiolo piridina con legame ammidico (**2**) non presenta particolari problemi. Il primo step di reazione coinvolge l'acido 8-bromo-ottanoico ed il trifenilmetantiolo in presenza di base, per formare in una reazione di sostituzione il gruppo tiolo terminale in forma protetta (dal gruppo tritile). È stato scelto come solvente la dimetilformammide (DMF) perché capace di solubilizzare in maniera efficace entrambi i reagenti di partenza, è inerte e soprattutto alto bollente permettendo quindi di poter scaldare la miscela di reazione. Il prodotto **1** si ottiene puro dopo cromatografia flash su gel di silice (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) con una resa del 88%. Il passaggio successivo è stata la coniugazione con la 4-amminopiridina per formare un'amide secondaria. Si noti che in questa tesi sono state preferite piridine para-sostituite per evitare eventuali problemi di ingombro sterico. In questo secondo passaggio è stata quindi usata 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropile) carbodiimmide (EDC) come reattivo di coupling e 4-dimetilamminopiridina (DMAP) come catalizzatore, usando come solvente DMF e N,N diisopropilammina come base.

Anche in questo caso il prodotto viene ottenuto puro con rese del 69% dopo purificazione cromatografica (cromatografia flash, eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$).

Ottenuto il prodotto **2** in forma protetta, si è proceduto anche alla sua alchilazione con iodometano in CH_3CN . La reazione è pressoché quantitativa, e non ha richiesto ulteriori purificazioni oltre al work-up di base.

Dal momento che nanoparticelle prodotte con il tiolo del composto **2** erano già state studiate in precedenza, mi sono concentrato sul derivato **RB04**. La molecola è stata deprotetta e utilizzando HCl come reagente in atmosfera inerte e esafluoroisopropanolo come solvente. L'utilizzo dell'esafluoroisopropanolo come solvente non è del tutto chiaro ma si è osservato che, in questa tipologia di reazione aiuta molto il processo di deprotezione.

3.3.2. Prove di sintesi del tiolo con legame etereo

Per quanto riguarda la sintesi del tiolo con il legame etereo tra l'anello piridinico e la catena alchilica, questa si è dimostrata notevolmente complessa rispetto al tiolo ammidico **RB04**. Sono state infatti esplorate, diverse vie sintetiche prima di giungere a quella definitiva del tiolo **RB39**. Il primo progetto sintetico prevedeva la preparazione di un derivato O-alcilato della 4-idrossipiridina, che presenta una struttura elettronica simile alla 4-amminopiridina. Il reagente 8-bromoottene è stato fatto reagire con la 4-idrossipiridina, in tetraidrofurano (THF) usando come base, l'idruro di sodio (NaH). In questo modo la deprotezione del gruppo ossidrilico offre un nucleofilo forte che dovrebbe prevalere sull'azoto piridinico nella reazione di alchilazione. La miscela è stata lasciata per 72 ore a 40 °C con riflusso e in atmosfera di N₂ (Figura 19).

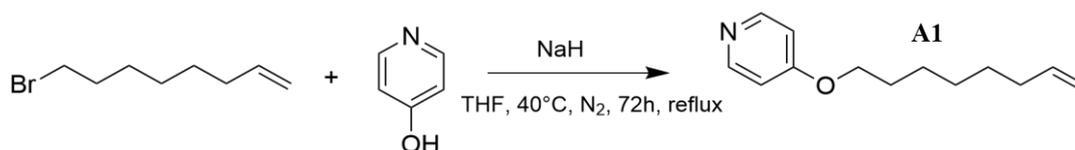


Figura 19: Schema di reazione dell'8-bromoottene con la 4 idrossipiridina.

Dopo purificazione cromatografica, sono stati isolati 2 prodotti, i quali sono stati poi analizzati tramite spettro protonico NMR. Dall'analisi degli spettri si è osservato che il prodotto desiderato non risulta essere quello principale della reazione. Infatti, il prodotto che si ottiene in maggiore quantità è quello di sostituzione dell'azoto piridinico sul carbonio legato precedentemente al bromuro, anziché il prodotto di sostituzione **A1** da parte dell'ossigeno del gruppo alcolato. Nonostante la bassa resa (10%), è stato comunque possibile sintetizzare una quantità sufficiente di **A1** utile per gli step successivi.

Il passaggio successivo è stato l'alchilazione della piridina di **A1** usando iodometano in CH₃CN. Il crudo di reazione è stato purificato con colonna cromatografica usando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (resa 68%). In figura 20 è riportato lo schema di reazione.

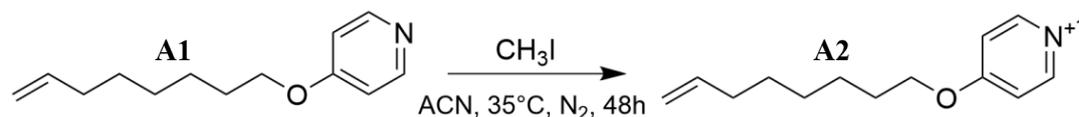


Figura 20: Schema della reazione di alchilazione di **A1** con iodometano per ottenere il prodotto **A2**.

La reazione successiva prevedeva di sfruttare il gruppo alchene terminale per inserire nella molecola un gruppo tiolo protetto come acetile mediante una reazione tio-ene radicalica. La reazione è stata condotta usando come reagente l'acido tioacetico e l'iniziatore radicalico 2,2 dimetossi-2-fenil-acetofenone in metanolo, all'interno di una cuvetta in quarzo (Figura 21) sotto irraggiamento con luce ultravioletta.

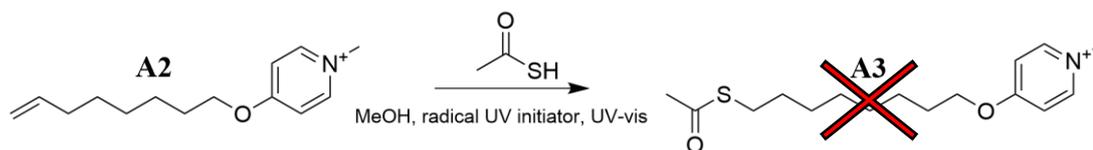


Figura 21: Schema della reazione di addizione elettrofila radicalica di A2 tramite iniziatore radicalico UV attivato.

L'analisi del grezzo di reazione non ha evidenziato nessuna traccia evidente di prodotto e la evidenziato, la sopravvivenza del residuo vinilico (Figura 22).

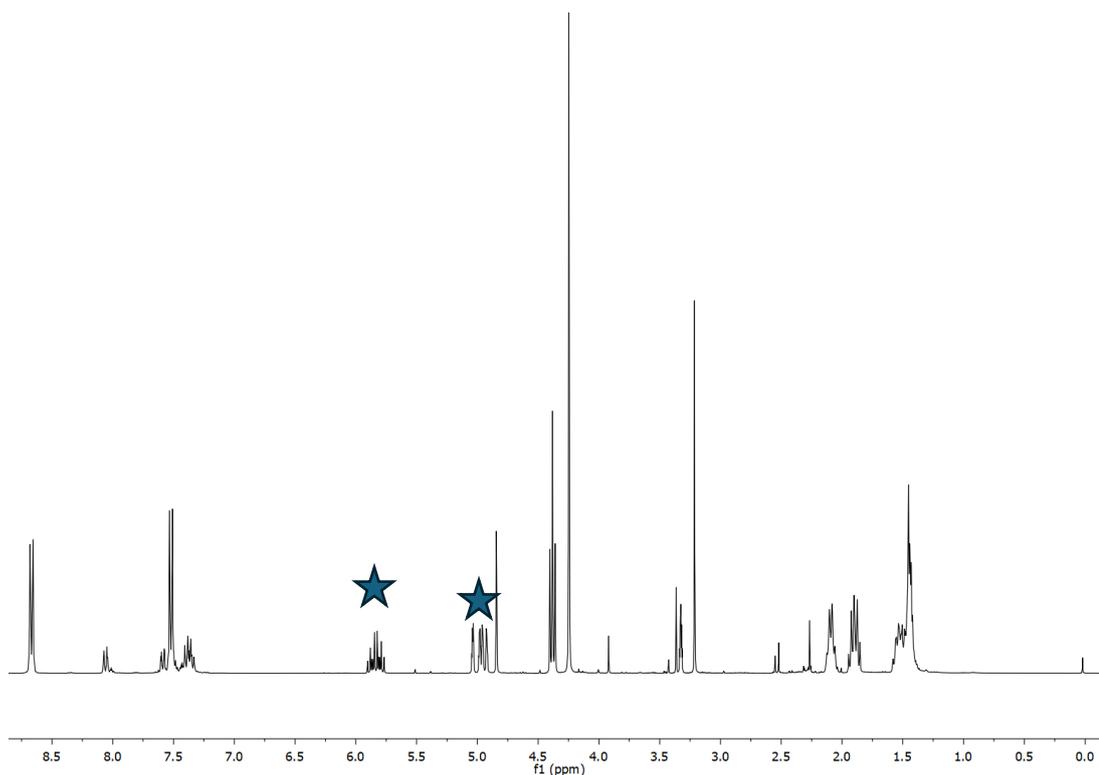


Figura 22: Spettro protonico in MeOD della reazione di addizione elettrofila radicalica con iniziatore UV attivato. Si osservano i segnali dei protoni del doppio legame appartenenti a A2 rispettivamente ai valori di chemical shift di 4.96 ppm e 5.84 ppm.

Un'analisi dello spettro UV-Vis ha confermato l'ascendenza di effetti filtro dovuti ai reagenti. È stata quindi tentata una seconda reazione di addizione elettrofila per via radicalica, usando lo stesso reagente precursore **A2** e l'acido tioacetico ma un iniziatore radicalico termo attivato. Come iniziatore è stato usato l'izobisisobutironitrile (ALBN) e la reazione è stata effettuata in diossano sotto agitazione e atmosfera di N₂ riscaldando a 90 °C con riflusso per circa 4 ore (Figura 23).

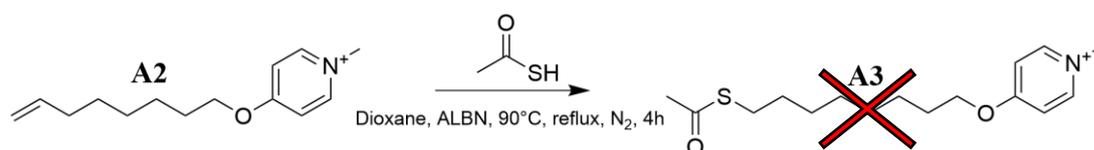


Figura 23: Schema della reazione di addizione elettrofila radicalica tramite iniziatore radicalico termo attivato.

Anche in questo caso l'analisi ha dato esito negativo, non mostrando alcuna presenza del prodotto e la permanenza dei segnali del doppio legame nello spettro NMR (Figura 24).

La causa più probabile del cattivo esito di queste reazioni, solitamente molto affidabili, è stata attribuita alla presenza dello ione ioduro, proveniente dalla reazione di alchilazione della piridina, che potrebbe neutralizzare i radicali che si formano. Non è stato quindi possibile sintetizzare il prodotto **A3** per questa via di sintesi.

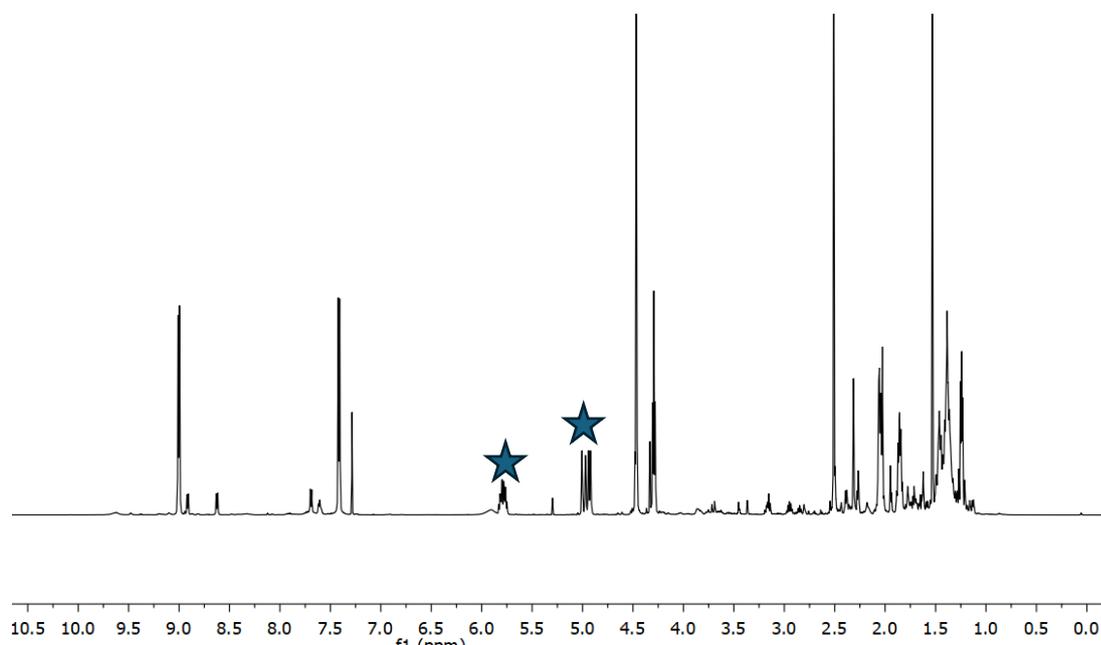


Figura 24: Spettro ¹H-NMR della reazione di addizione elettrofila radicalica con iniziatore radicalico ALBN in CDCl₃ di **A2**. In figura si possono osservare i segnali dei protoni vinilici.

Si è quindi deciso di tentare un'altra via sintetica, che prevedesse una sostituzione elettrofila aromatica da parte di un alcolato.

Per questo secondo processo sintetico si è scelto di partire dal prodotto **B1**, ottenuto mediante sostituzione nucleofila dell'8-bromottanolo con il trifenilmetantiolo, utilizzando le stesse condizioni di reazione che erano state adottate per la sintesi del tiolo **RB04** (Figura 25).

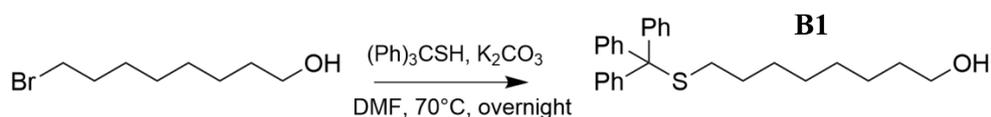


Figura 25: Schema della reazione di sostituzione nucleofila dell'8-bromottanolo con il gruppo tritile per ottenere il prodotto **B1**.

La miscela di reazione è stata evaporata ed il crudo di reazione è stato ridisciolto con una soluzione acquosa di LiCl al 5% e acidificato a con una soluzione di HCl. La soluzione di LiCl è stata usata per cercare di eliminare efficacemente quanta più DMF possibile durante l'estrazione in imbuto separatore. La miscela acquosa ottenuta è stata poi estratta con EtOAc e la fase organica raccolta è stata anidrificata con Na₂SO₄ e successivamente rotoevaporata. Dopo il workup, il crudo di reazione è stato purificato con colonna cromatografica usando CH₂Cl₂/MeOH come miscela eluente. La resa è stata del 92%.

Il passaggio successivo prevedeva la sostituzione nucleofila da parte del gruppo idrossido deprotonato del reagente **B1** su una para alopipridina. È stato quindi fatto reagire il reagente **B1** con la 4-cloropiridina (cloridrata) in THF usando NaH come base per deprotonare il gruppo OH ed ottenere l'alcolato (Figura 26).

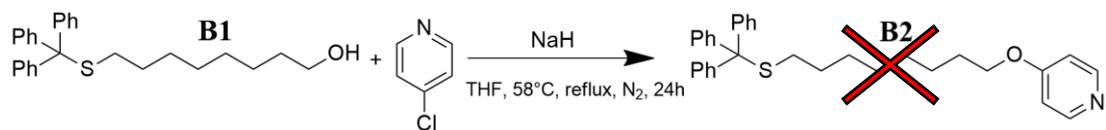


Figura 26: Schema della reazione di sostituzione nucleofila della 4-cloropiridina con il gruppo alcolato del reagente precursore.

L'analisi della miscela di reazione non ha evidenziato la presenza del prodotto desiderato.

Dato l'esito negativo della reazione, sono state provate altre tipologie di piridine para-alossituite, come la 4-iodopiridina in DMF. (Figura 27) ma non si è potuta osservare la formazione del prodotto desiderato.

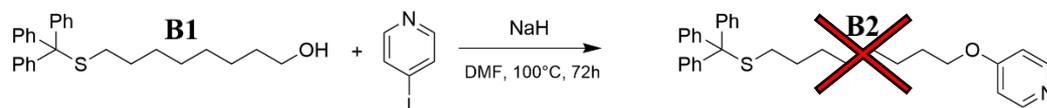


Figura 27: Schema della reazione di sostituzione nucleofila della 4-iodopiridina con il gruppo alcolato del reagente precursore.

Dalla ricerca in letteratura, è stato trovato un percorso sintetico riportato da A. McNally e collaboratori¹⁵, per la sintesi di molecole alchiliche con legame etero con gruppi piridinici che prevede la reazione di un alcol con la para-trifenilfosfopiridina. Data la grande somiglianza con i nostri intenti, è stato deciso quindi di seguire tale percorso sintetico. Per prima cosa è stata sintetizzata la para-trifenilfosfopiridina da utilizzare per la reazione di sostituzione con il gruppo alcolato. Per la reazione sono stati usati come reagenti una piridina e la trifenilfosfina in presenza di anidride trifluorometansolfonica (Tf₂O) e di base trietilammina (NEt₃) in CH₂Cl₂ (Figura 28).

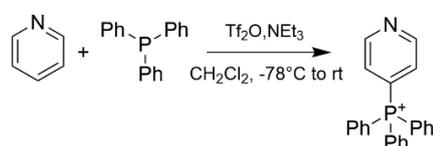


Figura 28: Reazione di sintesi della 4-trifenilfosfopiridina.

In questa reazione il Tf₂O reagisce con l'azoto piridinico formando un prodotto cationico facilmente attaccabile da nucleofili in posizione 2,4. La posizione 4 in particolare diventa quella preferenzialmente attaccabile per l'ingombro sterico dei reagenti. Dopo la sostituzione in posizione 4 l'idrolisi del gruppo trifluorometansolfonico porta al reagente desiderato. (Figura 29).

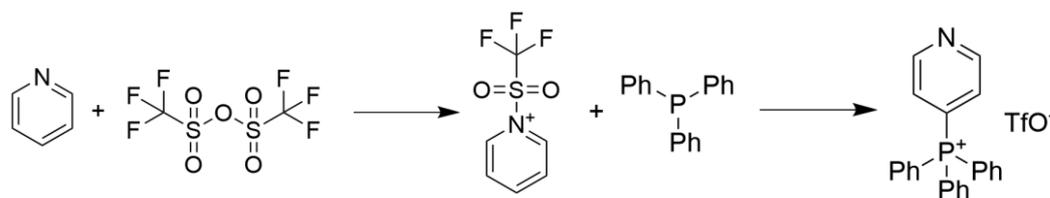


Figura 29: Schema degli step di reazione per la sintesi della 4-trifenilfosfopiridina.

Il crudo di reazione viene purificato mediante lavaggi con Et₂O a 0°C.

La 4-trifenilfosfopiridina ottenuta è stata poi fatta reagire con il reagente **B1** in THF usando come base NaH (Figura 30).

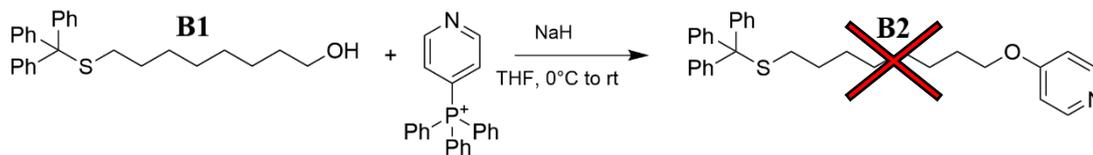


Figura 30: Schema della reazione di sostituzione nucleofila della 4-trifenilfosfopiridina con il gruppo alcolato del reagente precursore **B1**.

Anche in questo caso non si è notata nessuna chiara presenza di prodotto. Un esperimento di controllo, effettuato facendo reagire la 4-trifenilfosfopiridina con il metossido di sodio (NaOMe) nelle stesse condizioni utilizzate per il reagente alcolico **B1** (Figura 31) ha portato alla formazione del prodotto, dimostrando l'efficacia del reagente.

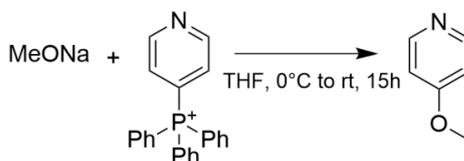


Figura 31: Schema della reazione di sostituzione nucleofila della 4-trifenilfosfopiridina con il gruppo metossido.

Anche un secondo esperimento, effettuato facendo reagire la 4-trifenilfosfopiridina con il pentanolo nelle stesse condizioni operative usate per il reagente precursore alcolico **B1** (Figura 32) ha dato esito positivo.



Figura 32: Schema della reazione di sostituzione nucleofila della 4-trifenilfosfopiridina con il pentanolo.

Il motivo della mancata formazione del prodotto **B2** non risulta quindi ancora chiaro. L'unica spiegazione possibile è un effetto sterico da parte del gruppo tritile, nonostante la lunghezza della catena alchilica, che impedisca l'attacco dell'alcolato alla fosfopiridina.

Si è quindi deciso di provare a sintetizzare il tiolo usando come possibile gruppo protettore un ponte disolfuro che sarebbe stato poi ridotto a tiolo. Per poter fare ciò è stato fatto reagire l'8-bromottanolo con il tioacetato di potassio in acetone seguendo il seguente schema di reazione (Figura 33).

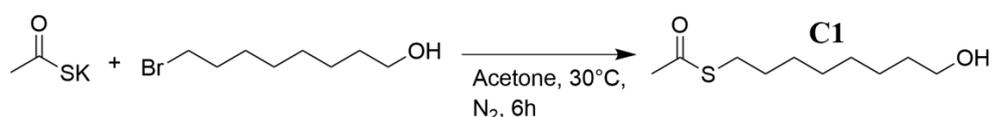


Figura 33: Schema della reazione di sostituzione nucleofila del tioacetato sul 8-bromottanolo.

Il grezzo di reazione è stato purificato con colonna cromatografica usando come eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. La molecola **C1** è stata quindi deprotetta con MeONa in atmosfera contenente ossigeno, in modo tale da ossidare il tiolo che si forma nella reazione a disolfuro. Lo schema di reazione è illustrato in figura 34.

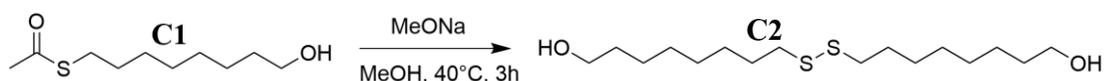


Figura 34: Schema della reazione di ossidazione del tiolo alcolico a disolfuro.

La reazione è pressoché quantitativa e non richiede purificazione cromatografica

Il diolo disolfuro **C2** ottenuto è stato poi fatto reagire sia con la 4-trifenilfosfopiridina in THF usando come base NaH, sia con la 4-iodopiridina in DMF usando sempre NaH come base (Figura 35). Entrambe le reazioni non hanno però evidenziato la presenza del prodotto **C3**.

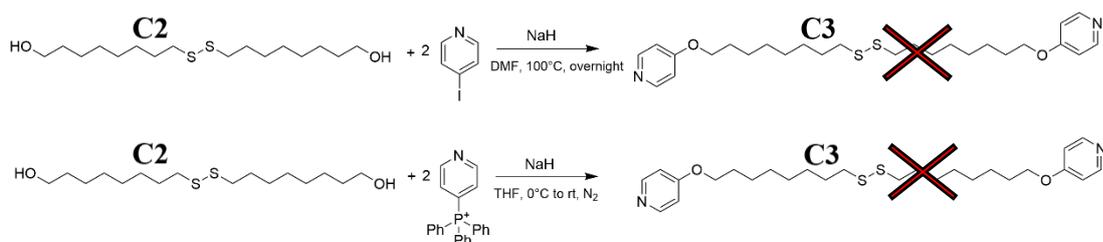


Figura 35: Schema di reazione del diolo disolfuro con la 4 iodopiridina (in alto) e con la 4-trifenilfosfopiridina (in basso).

3.3.3. Sintesi del tiolo RB39

Dati gli esiti negativi delle reazioni per la sintesi del tiolo con un gruppo etereo direttamente legato all'anello piridinico, è stato deciso, di utilizzare una piridina di tipo benzilico, notoriamente molto reattiva nelle reazioni di sostituzione nucleofila. È stata quindi usata la 4-bromometilpiridina come nuovo reagente per la sintesi del tiolo con legame etereo. Lo schema di sintesi nei suoi passaggi è riportato in figura 36.

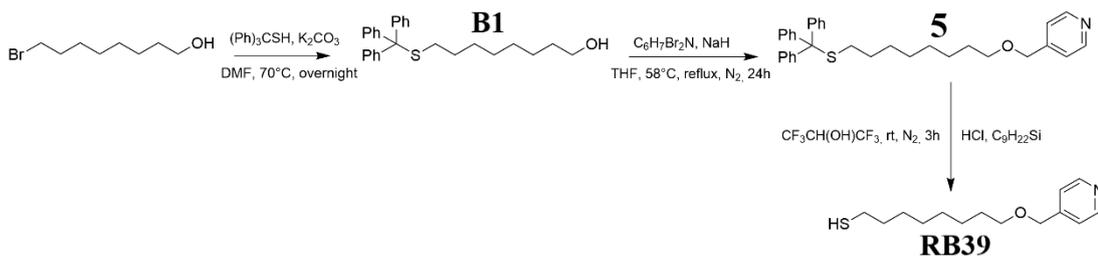


Figura 36: Schema del processo di sintesi del tiolo **RB39**.

Nel primo passaggio è stato fatto reagire l'8-bromottanolo con il trifenilmetantiolo come descritto in precedenza. Nel secondo passaggio il prodotto ottenuto è stato fatto reagire con la 4-bromometilpiridina in THF usando sempre NaH come base per poter ottenere l'alcolato. La purificazione cromatografica si è rivelata particolarmente complessa ma ha consentito di ottenere il prodotto puro con una resa del 28.6%.

Infine, nell'ultimo passaggio, il prodotto ottenuto è stato deproteetto per poter ottenere il corrispettivo tiolo. La reazione di deprotezione usata è la stessa che è stata utilizzata in precedenza per rimuovere il gruppo tritile.

Per motivi di tempo e per la bassa resa delle ultime reazioni, non è stato possibile ottenere il derivato N-metilato.

3.4. Caratterizzazione e stabilità delle AuNPs monostrato con tiolo RB04

Una volta ottenuti i tioli **RB04** e **RB39** sono state sintetizzate le particelle d'oro funzionalizzate con gli stessi. Nel caso del tiolo **RB04 (M1)** le nanoparticelle sono risultate essere solubili in MeOH.

Dall'analisi dello spettro ^1H NMR e ^1H NMR con filtro di diffusione si è osservata chiaramente la formazione delle nanoparticelle protette (Figura 37). Tuttavia, anche dopo purificazione, lo spettro ^1H NMR evidenzia la presenza di segnali stretti ai valori di chemical shift appartenenti alla ammino-piridina libera. Non si riscontravano invece segnali riconducibili alla porzione alchilica del tiolo.

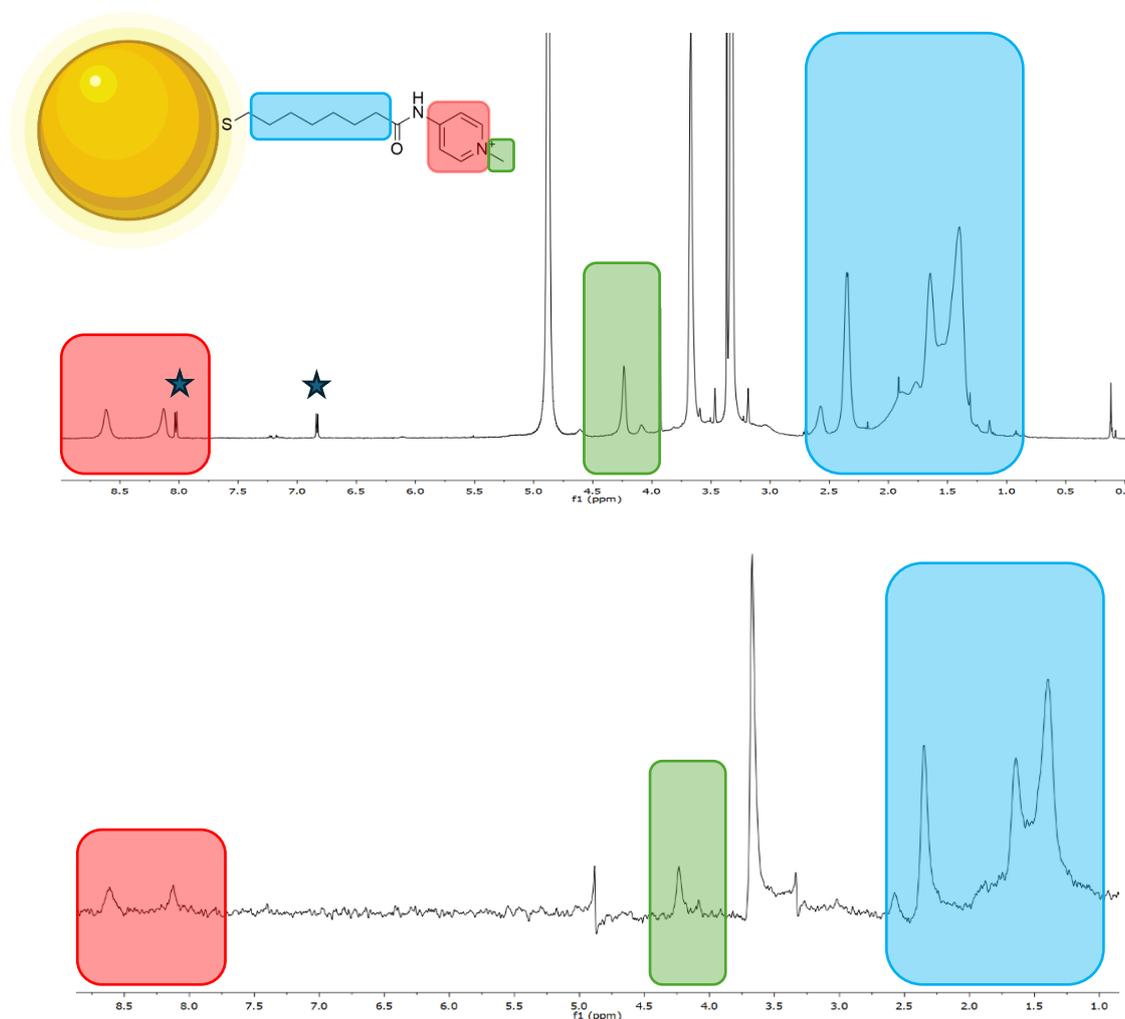


Figura 37: Spettri ^1H -NMR in MeOD delle AuNPs **M1**. In alto lo spettro protonico normale. In basso lo spettro protonico dopo aver applicato il filtro di diffusione. I segnali della piridina libera sono evidenziati con le stelle.

Un successivo spettro eseguito dopo 45 minuti ha evidenziato un chiaro aumento di intensità nei segnali della piridina libera ed una diminuzione in quelli della piridina legata al tiolo sulla superficie della nanoparticella (Figura 38).

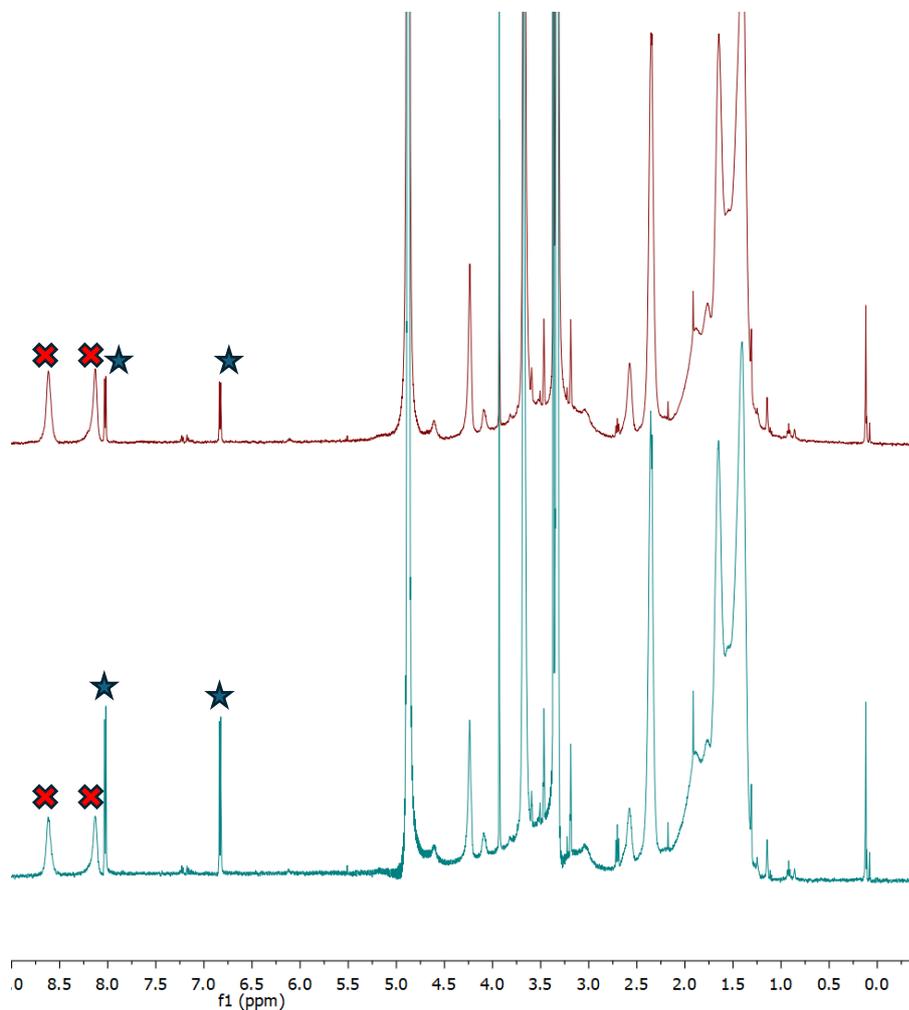


Figura 38: Spettri $^1\text{H-NMR}$ in MeOD delle AuNPs **MI**. In alto in rosso il primo spettro protonico registrato. In basso in blu lo spettro protonico dello stesso tubo NMR dopo aver aspettato 45 minuti. Si può osservare chiaramente un aumento dell'intensità dei segnali della piridina libera (stella blu) ed una diminuzione di quelli del tiolo legato (croce rossa).

Questi esperimenti suggeriscono una scissione idrolitica (o solvolitica) del tiolo sulle particelle. Tale scarsa stabilità è giustificata in parte dalla scarsa basicità del gruppo amminico, ma risultava ancora sorprendente.

Si è quindi deciso di verificare la stabilità del tiolo **RB04** in metanolo. Sono stati registrati diversi spettri $^1\text{H-NMR}$ intervalli di 1 ora di **RB04** (Figura 39). Diversamente da quanto

ipotizzato, il tiolo **RB04** è risultato essere completamente stabile in MeOD per tutta la durata dell'esperimento.

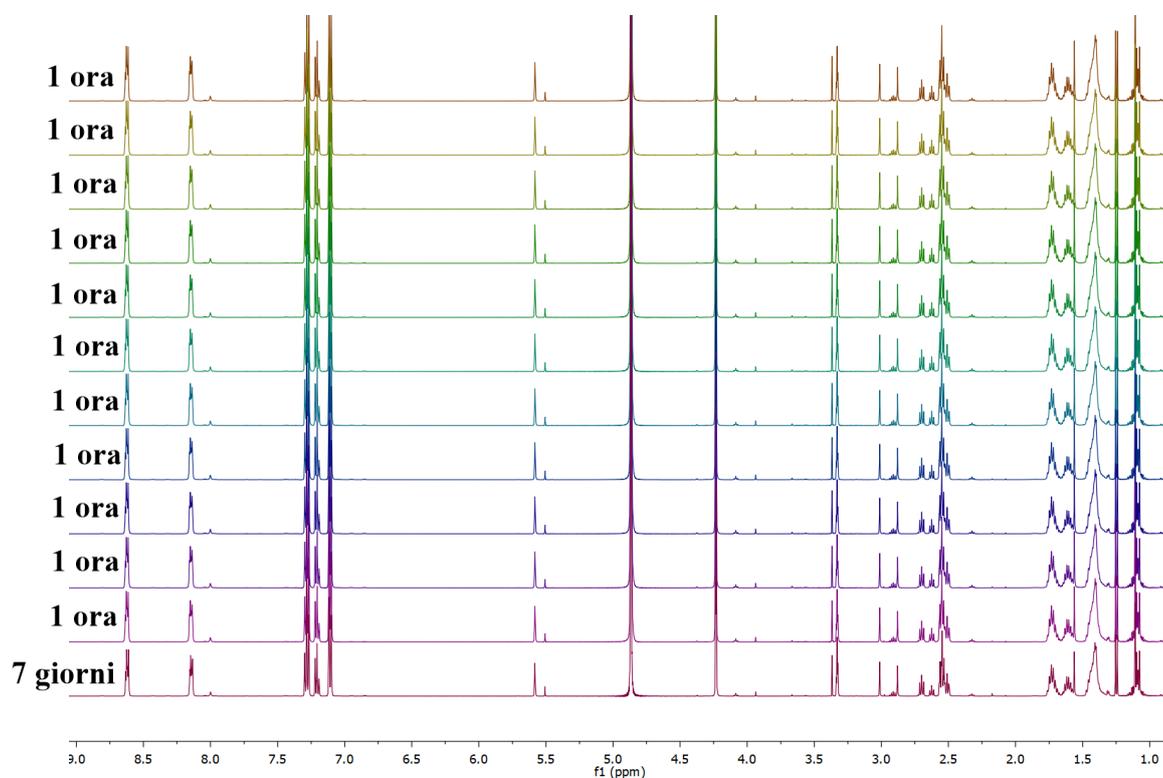


Figura 39: Spettri $^1\text{H-NMR}$ in MeOD del tiolo **RB04**. In alto il primo spettro protonico registrato, andando verso il basso ogni spettro è stato acquisito dopo un'ora dal suo predecessore. Come si può osservare il tiolo **RB04** si è rivelato completamente stabile in metanolo perché nella zona aromatica non si osserva nessuna presenza dei segnali della piridina libera.

Sono stati acquisiti spettri di campioni di particelle AuNPs **M1** sciolte in acetonitrile e acqua deuterati ad intervalli di un'ora per 10 ore e poi dopo 7 giorni. I risultati ottenuti degli spettri sono illustrati in figura 40 e figura 41. Sia in ACN deuterato che in D_2O si nota la crescita dei segnali dei protoni appartenenti alla piridina libera. La reazione appare più lenta in acetonitrile che in MeOD ma, sorprendentemente, è ancora più lenta in D_2O , anche se in entrambi i casi si nota anche la diminuzione di intensità dei segnali dei protoni del tiolo legati alla nanoparticella, riconducibile ad una precipitazione di quest'ultime dovuto ad un abbassamento della solubilità a causa della perdita di carica sulla superficie. Infatti, nei rispettivi 2 tubi NMR dopo 7 giorni si è osservata la presenza di un corpo di fondo.

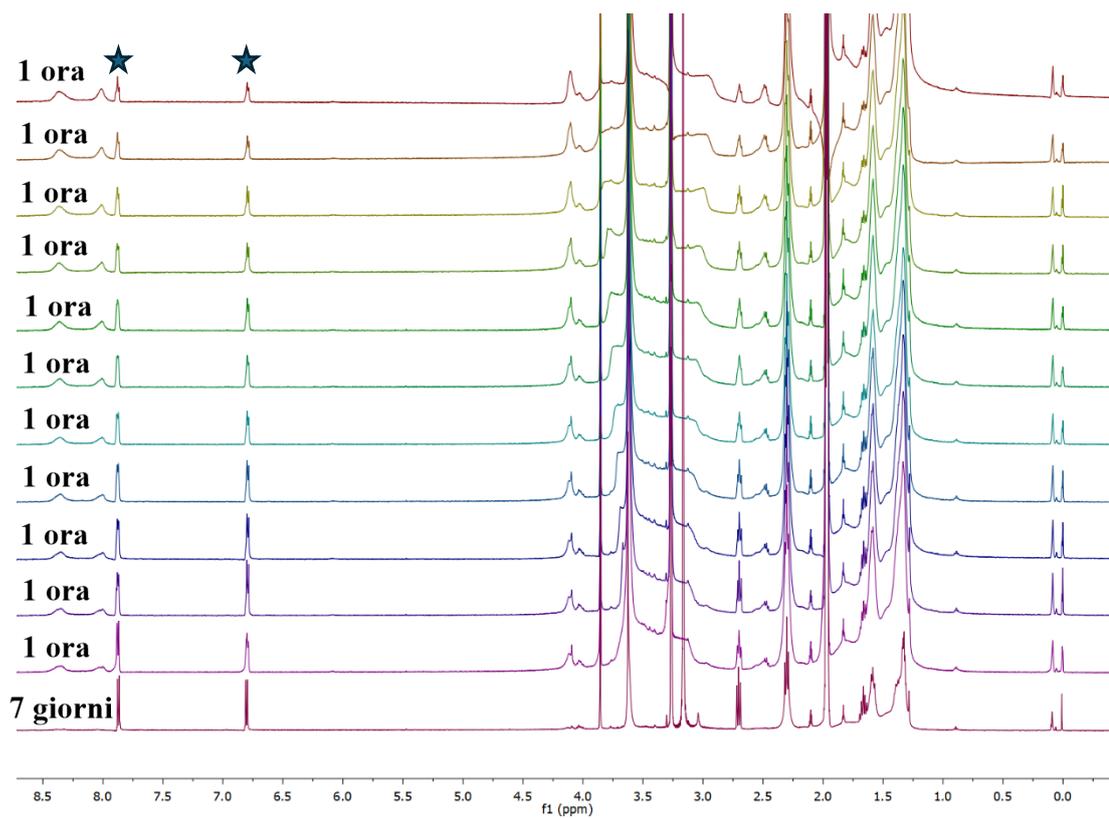


Figura 40: Spettri $^1\text{H-NMR}$ in ACN deuterato delle AuNPs **MI** con tiolo **RB04**. In alto il primo spettro protonico registrato, andando verso il basso ogni spettro è stato acquisito dopo un'ora dal suo predecessore. L'ultimo spettro in basso è stato acquisito dopo 7 giorni.

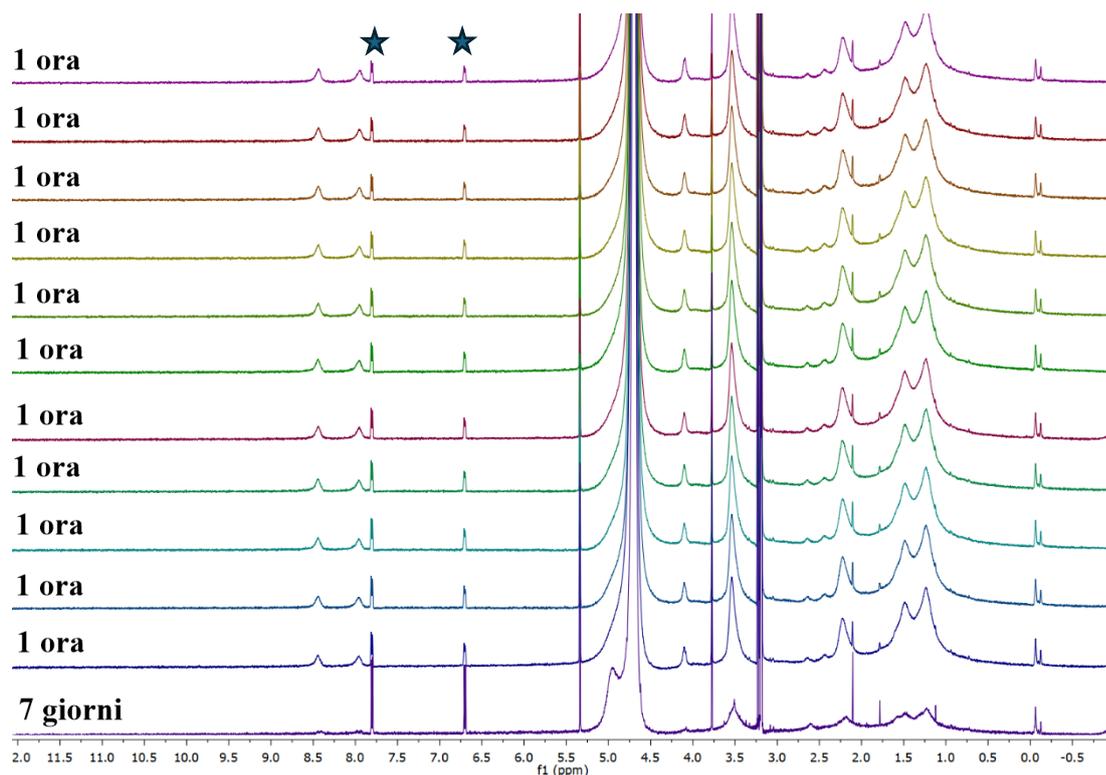


Figura 41: Spettri $^1\text{H-NMR}$ in D_2O delle AuNPs **MI** con tiolo **RB04**. In alto il primo spettro protonico registrato, andando verso il basso ogni spettro è stato acquisito dopo un'ora dal suo predecessore. L'ultimo spettro in basso è stato acquisito dopo 7 giorni.

Saranno necessari altri studi per chiarire la natura di questo comportamento ma i risultati ottenuti dimostrano abbastanza chiaramente che il tiolo **RB04** diventa suscettibile alla decomposizione, verosimilmente idrolisi o metanolisi, in seguito alla formazione del monostrato. Tale reattività è sicuramente imputabile alla scarsa basicità del gruppo amminico nel residuo N-metil-4-amminopiridinio, che lo rende un discreto gruppo uscente al contrario della maggior parte delle ammine. Tale effetto però non è sufficiente a rendere la molecola instabile come dimostrato degli esperimenti con il solo tiolo in metanolo. Una possibile spiegazione potrebbe essere ricercata dall'accumulo di carica positiva che si realizza alla superficie della particella. Come nel caso delle micelle cationiche, questa ha come conseguenza un aumento della concentrazione locale di ioni idrossido e alcossido, e una stabilizzazione di stati di transizione anionici, come l'intermedio tetraedrico caratteristico delle reazioni delle ammidi. Questi due fattori potrebbero fornire un ulteriore contributo all'instabilità delle particelle.

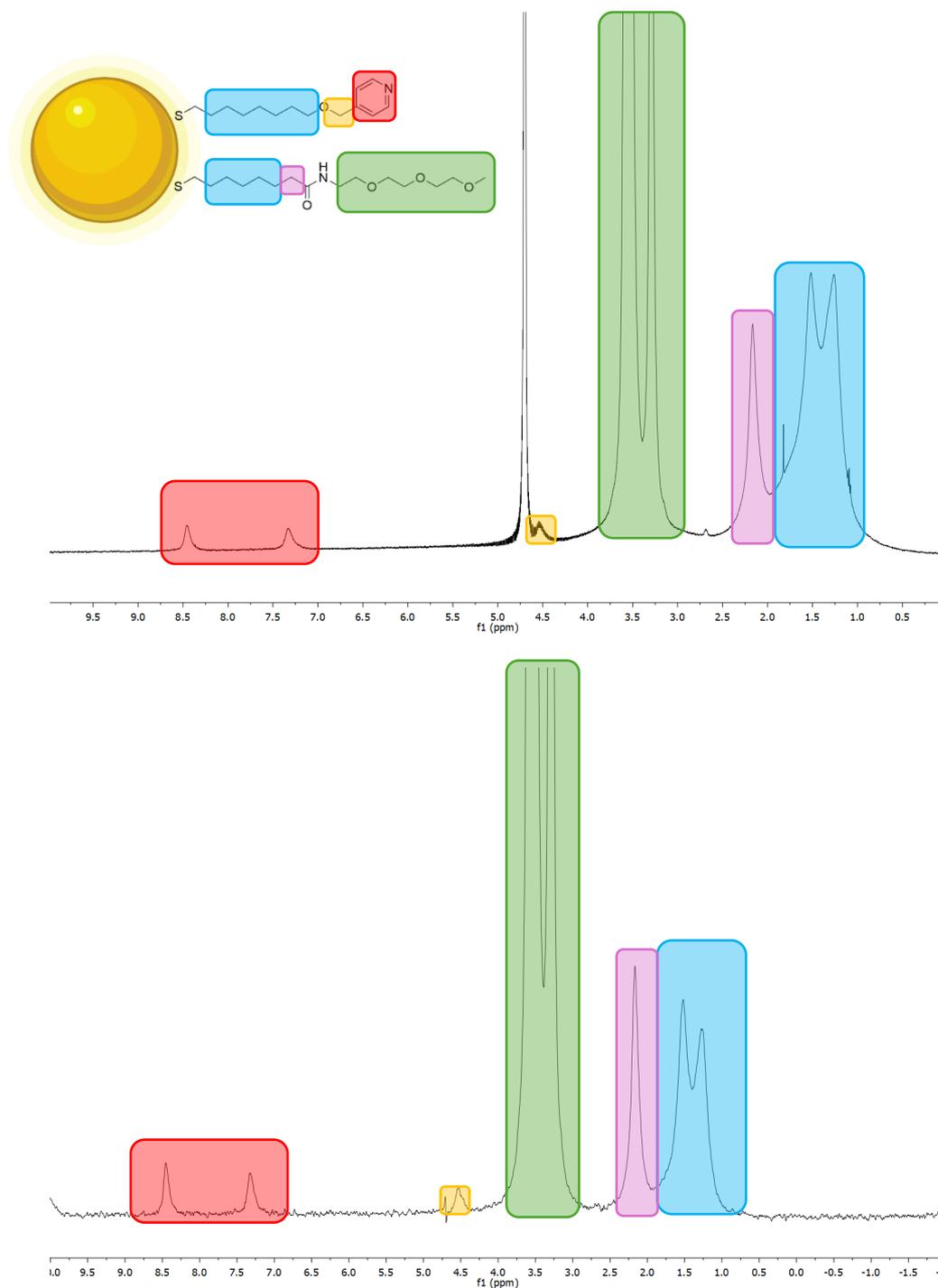


Figura 43: Spettri $^1\text{H-NMR}$ in D_2O delle AuNPs con coating misto **RB39/PEG**. In alto lo spettro protonico normale, in basso lo spettro protonico con il filtro di diffusione applicato. I segnali dei protoni mostrati sono riconducibili a quelli dei 2 tioli del coating.

Gli spettri NMR e filtro di diffusione delle particelle non permettono una determinazione affidabile della composizione del monostrato a causa del forte allargamento dei segnali e dei diversi tempi di rilassamento dei protoni. Per poter determinare il rapporto tra i due tioli

effettivamente presente nel monostrato è quindi necessario staccare mediante ossidazione con iodio molecolare i tioli dalla superficie per poterli portare in soluzione ed integrarne i segnali. (Figura 44).

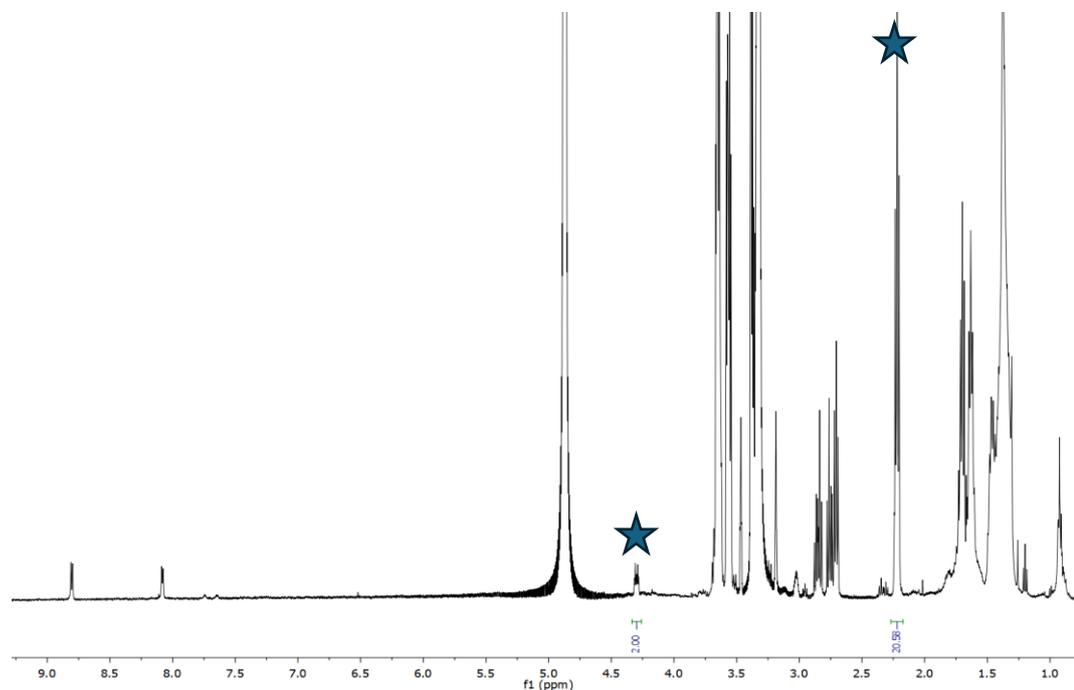


Figura 44: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in MeOD delle AuNPs con coating misto **RB39/PEG**. Il segnale del metilene di **RB39** a 4.30 ppm ed il segnale del metilene **PEG** a 2.23 ppm riportano come valore degli integrali 2 per **RB39** e 20,58 per il **PEG**.

Dal rapporto dei valori degli integrali dopo decomposizione si può determinare che il tiolo **RB39** è presente per un 9% dei tioli totali, mentre il tiolo **PEG** ne rappresenta il 91%. (AuNPs N1). L'analisi TGA delle nanoparticelle ha dimostrato che il quantitativo di massa organica presente nel coating è pari al 37% della massa totale. Infine, dall'analisi TEM è stata osservata una polidispersione delle AuNPs intorno al valore di 2 nm di diametro. I seguenti dati ci hanno permesso quindi di ricavare la formula chimica delle nanoparticelle corrispondente al cluster $\text{Au}_{221}(\text{SR})_{81}$ (Vedi parte sperimentale per i grafici delle varie caratterizzazioni).

3.6. Chemosensing delle AuNPs con HVA

Dopo aver caratterizzato e verificato che le nanoparticelle fossero stabili, si è passati a testarne l'efficacia come chemosensori per il riconoscimento in ambiente acquoso, dell'HVA. Le prove di chemosensing sono state fatte usando la sequenza NMR di HPwSTD. Per poter usare tale sequenza è necessario preparare in maniera opportuna i campioni da analizzare. Per tali motivi sono stati quindi preparati inizialmente 3 tubi NMR. In ogni tubo è stata raggiunta una quantità massima di solvente pari a 600 uL di cui il 90% costituito da H₂O necessaria per poter applicare la sequenza di HPwSTD in quanto si va a saturare la popolazione di spin proprio dell'acqua, ed il 10% in D₂O per il lock dello strumento. Inoltre, in ognuno dei 3 tubi è stata raggiunta una concentrazione di 0,5 mM di AuNPs **N1** e di 1mM di HCl (pH = 3.4). Raggiungere il valore di pH acido è necessario per poter protonare l'anello piridinico del tiolo **RB39** ed ottenere la carica positiva utile per l'instaurazione dell'interazione elettrostatica con l'analita HVA carico negativamente. Infine, in ogni tubo è stato aggiunto l'HVA in diverse concentrazioni (100 uM-50 uM-25 uM) per poterne valutare la sensibilità di riconoscimento. Dall'analisi degli spettri HPwSTD dei 3 tubi NMR non è emerso tuttavia nessuna evidenza di riconoscimento chimico tra l'HVA e le AuNPs **N1** (Figura 45). Le ipotesi formulate a questo punto, per gli esiti negativi delle prove di chemosensing, sono state 3:

- La prima ipotesi è che al valore di pH = 3.4 la piridina non fosse protonata
- La seconda ipotesi è che al valore di pH = 3.4 l'analita non fosse deprotonato

La terza ipotesi è che la concentrazione nel coating del tiolo **RB39** utile per il riconoscimento chimico con l'analita, non fosse sufficiente in quanto nettamente inferiore al valore del 30% teorizzato.

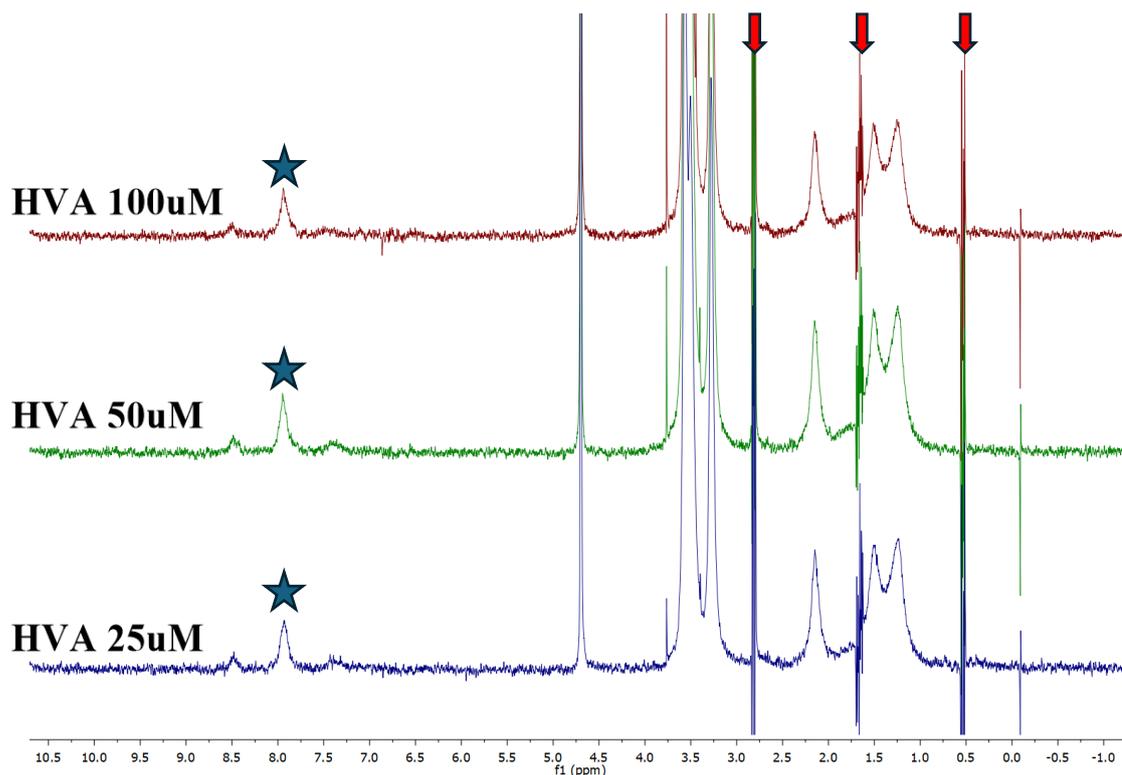


Figura 45: Spettri HPwSTD in H_2O/D_2O dei 3 tubi contenenti AuNPs NI, HVA e HCl. In alto in rosso, lo spettro STD del tubo con concentrazione di HVA pari a 100 μM . Al centro in verde lo spettro STD del tubo con concentrazione di HVA pari a 50 μM . In basso in blu lo spettro STD del tubo con concentrazione di HVA pari a 25 μM . In nessuno dei tre spettri sono presenti i segnali dell'HVA dimostrando quindi che non è avvenuto nessun riconoscimento chimico tra l'analita e le AuNPs NI. La stella indica il segnale dell'idrogeno legato all'azoto ammidico mentre le frecce rosse indicano impurezze presenti nel campione di D_2O .

Per verificare la prima ipotesi, ovvero che il tiolo **RB39** nel coating della AuNPs fosse effettivamente protonato sono stati preparati in aggiunta al tubo contenente HCl a pH = 3.4 altri 3 tubi NMR con differenti tamponi a valori di pH crescenti. Nello specifico è stato usato l'acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES) come tampone per mantenere il pH = 6.6, ed è stato usato NaOH per realizzare gli altri 2 tubi, rispettivamente a pH = 8.8 e pH = 12.6. Nei 3 tubi preparati a diversi pH, sono state mantenute le stesse condizioni sperimentali usate per i tubi analizzati per gli esperimenti di HPwSTD, ovvero, volume totale di solvente nel tubo pari a 600 μL (90% H_2O e 10% D_2O), concentrazioni delle particelle pari a 0.5 mM e concentrazioni di tampone pari a 1mM. Gli spettri 1H -NMR W5 dove il W5 rappresenta la sequenza NMR utilizzata per sopprimere il segnale del solvente H_2O , sono riportati in figura 46. Il risultato che si osserva dall'analisi degli spettri protonici a diversi valori di pH mostra un leggero shift nei valori di chemical shift dei protoni piridinici passando dalla soluzione a pH = 3.4 a quella a pH = 6.6 per poi rimanere praticamente inalterati fino a pH = 12.6. Tale

risultato dimostra quindi che a pH = 3.4 l'anello piridinico risulta essere protonato in accordo con quanto atteso teoricamente in quanto il valore di pKa delle piridine è pari a $pK_a = 5.4$.

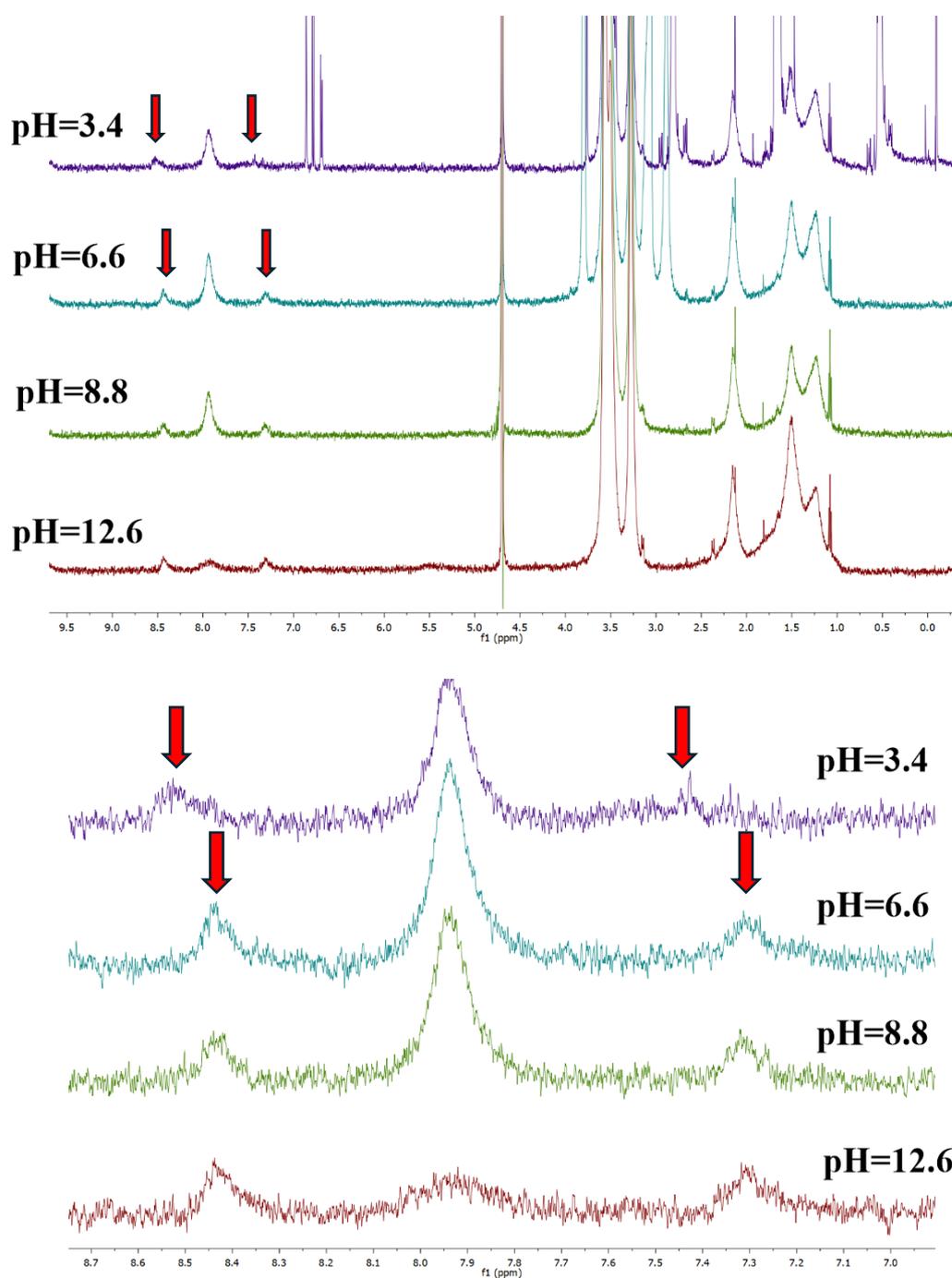
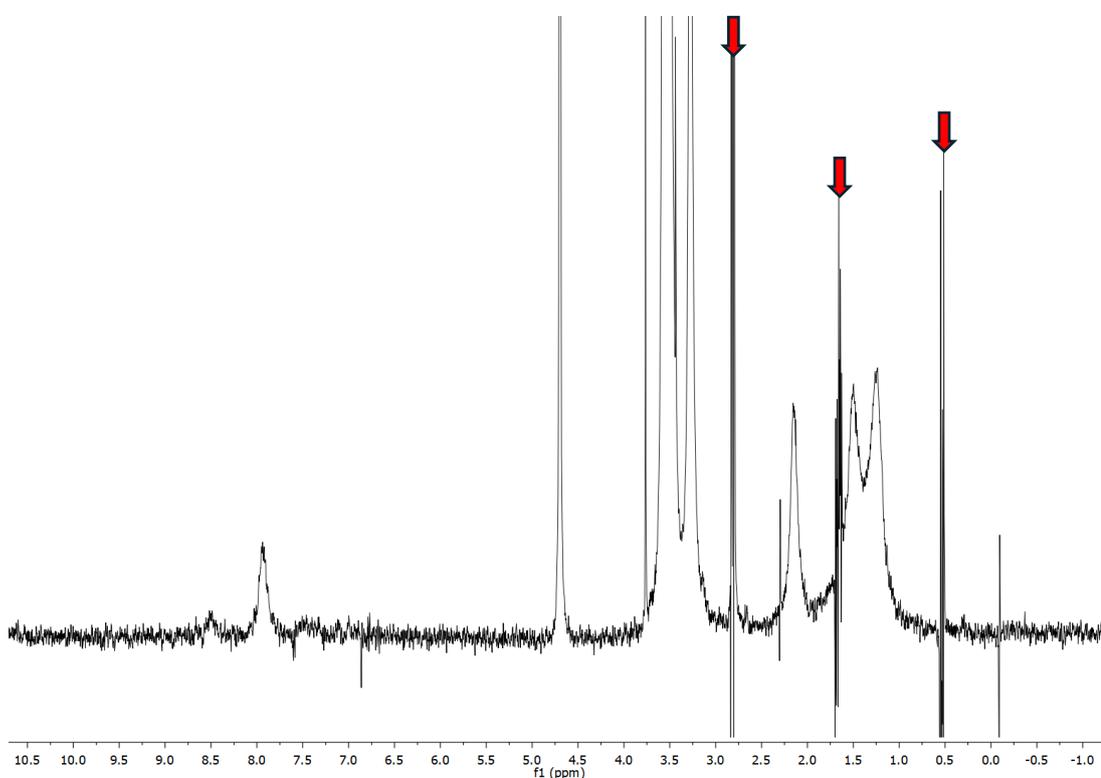


Figura 46: Spettri $^1\text{H-NMR}$ W5 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ delle AuNPs NI. Lo spettro viola in alto mostra i picchi protonici a pH=3.4, scendendo il pH incrementa rispettivamente a pH=6.6, pH=8.8 e pH=12.6. La figura in basso mostra uno zoom nella zona aromatica in cui si può osservare chiaramente un leggero spostamento dei valori di chemical shift passando da pH=3.4 a pH=6.6.

Verificato quindi che la piridina del tiolo **RB39** fosse effettivamente protonata a $\text{pH} = 3.4$, si è passati alla verifica della seconda ipotesi. Per poter verificare che le nanoparticelle non riconoscessero l'HVA a $\text{pH} = 3.4$ anche se deprotonato, è stato inserito all'interno del tubo NMR contenente le AuNPs **N1** a 0,5 mM, HCl 1 mM e HVA 100 μM , il sodio paratoluensolfonato il quale ha una struttura molto simile a quella dell'HVA e una basicità molto inferiore, per cui risulta deprotonato anche a pH molto acidi. La concentrazione di sodio paratoluensolfonato, all'interno del tubo NMR, era pari a 100 μM ed è stato ripetuto un esperimento di HPwSTD (Figura 47). Anche in questo caso nello spettro STD non è stata osservata la presenza di nessun segnale riconducibile agli analiti, dimostrando quindi che le AuNPs **N1** sono effettivamente inattive per il riconoscimento chimico di quest'ultimi.



*Figura 47: Spettro HPwSTD in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ delle AuNPs **N1**. Dallo spettro non si osserva nessun segnale appartenente al paratoluensolfonato. Le frecce rosse indicano impurezze nella D_2O .*

3.7. AuNPs con coating RB39/PEG seconda sintesi

Verificate quindi le prime due ipotesi, l'esito negativo degli esperimenti di chemosensing è stato attribuito alla scarsa concentrazione di tiolo funzionalizzato **RB39** nel coating delle AuNPs **N1**. Dal momento che la sintesi diretta con una miscela di tioli in proporzione 7:3 aveva portato ad un monostrato di composizione 9:1, si è deciso di ricorrere al metodo di scambio, con la speranza di ottenere un miglior controllo sulla composizione del monostrato.

Sono state quindi sintetizzate delle particelle coperte solamente con il tiolo **PEG**. Le nanoparticelle ottenute sono state sciolte in MeOH e a questa soluzione è stato aggiunto il tiolo **RB39** in quantità equimolare rispetto al tiolo **PEG**, ed il sistema è stato lasciato a reagire in atmosfera di N₂ per 24 ore. Le nanoparticelle sono state poi purificate per centrifugazione con Et₂O e cromatografia ad esclusione dimensionale. Le AuNPs ottenute si sono dimostrate insolubili in D₂O. Questa evidenza fornisce una prima informazione sul fatto che il coating sia composto da quantitativi diversi di tiolo **PEG** e **RB39** rispetto alle AuNPs **N1**, sintetizzate con il metodo dell'aggiunta diretta e solubili in acqua. Le nanoparticelle risultano però solubili in acqua acida, verosimilmente in seguito alla protonazione delle piridine, e la soluzione acida può essere diluita a pH neutro.

Quindi le nuove AuNPs sono state caratterizzate all'¹H-NMR, TGA e TEM. Lo spettro ¹H-NMR ha mostrato chiaramente i segnali dei tioli **RB39** e **PEG** (Figura 48).

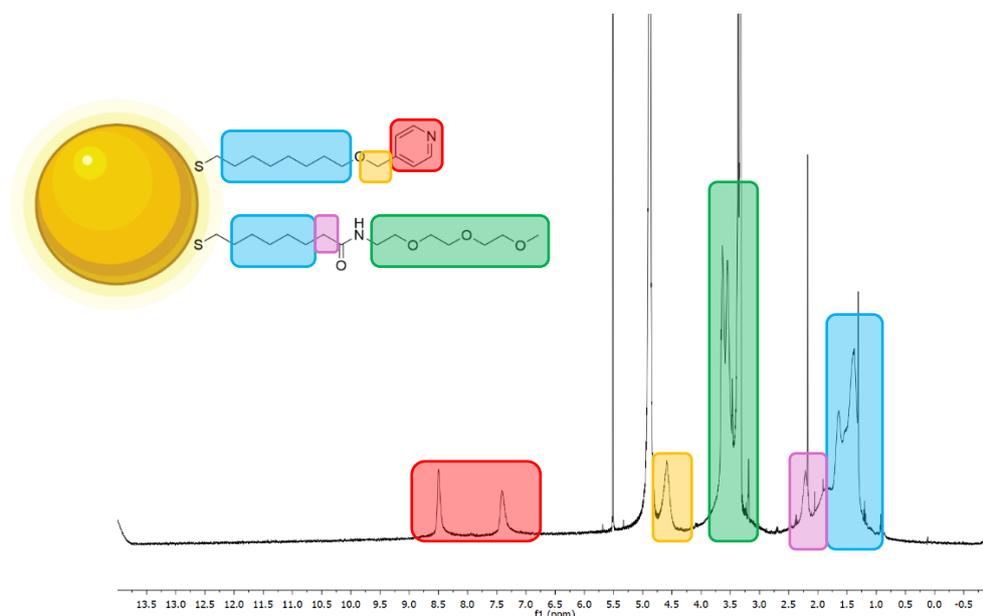


Figura 48: Spettro ¹H-NMR in MeOD delle AuNPs con coating misto 40%**RB39**/60%**PEG**.

Dallo spettro protonico della reazione di ossidazione con I₂ sono state calcolate le percentuali effettive dei 2 tioli. Rispettivamente, un 45% del tiolo **RB39** e 55% del tiolo **PEG** (AuNPs

N2) (Figura 49) Dall'analisi della TGA si è osservata una perdita di massa del campione pari al 40% della massa totale e dalle immagini TEM è stata calcolata una polidispersione intorno al valore medio di 2.6 nm di diametro. I seguenti dati ci hanno permesso quindi di ricavare la formula chimica delle nanoparticelle corrispondente al cluster $\text{Au}_{539}(\text{SR})_{241}$ (Vedi parte sperimentale per i grafici delle varie caratterizzazioni).

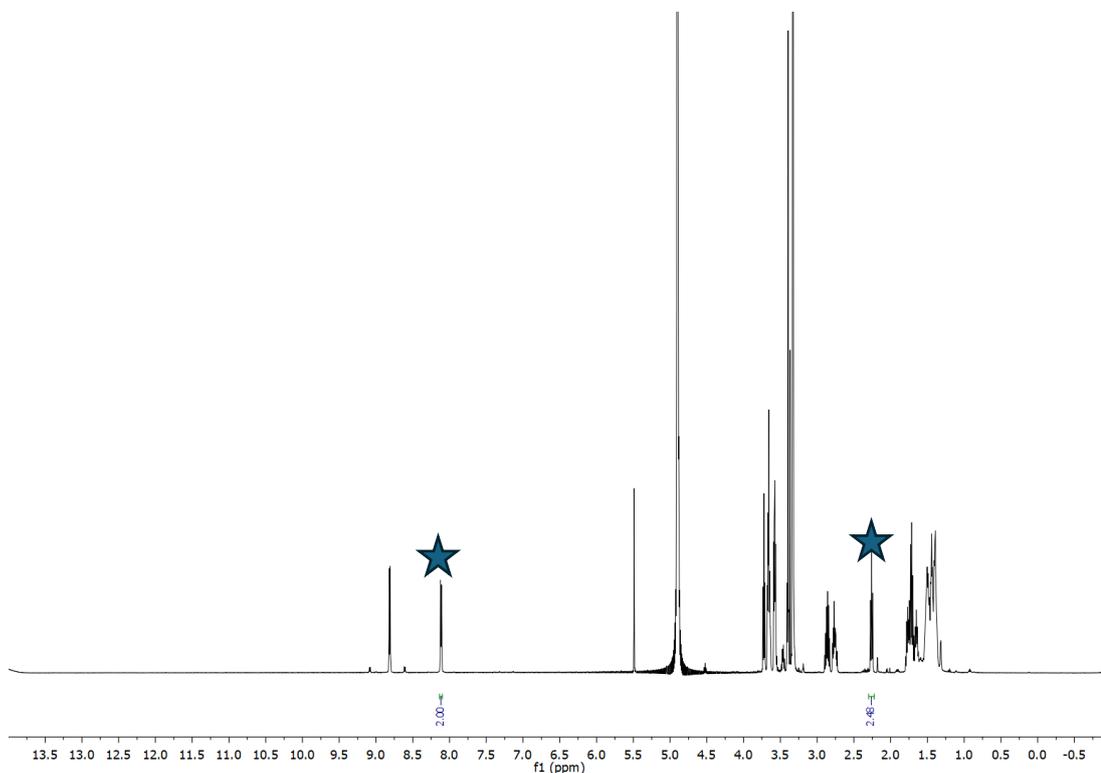


Figura 49: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in MeOD delle AuNPs con coating misto N2 con l'aggiunta di iodio

3.8. Chemosensing AuNPs N2 con HVA

Le AuNPs N2 sono state testate come chemosensori per il riconoscimento dell'analita HVA nelle stesse condizioni delle AuNPs N1. Sono stati quindi preparati 2 tubi NMR con volume massimo di solvente pari a 600 uL (90% H_2O e 10% D_2O) usando come valori di concentrazioni per AuNPs N2 0.5 mM, mentre per l'HVA 100 uM. In un tubo è stato usato il buffer HCl 1mM (pH = 3.4) e nell'altro il buffer HEPES 1 mM (pH = 6.6). L'analisi degli spettri HPwSTD di entrambi i tubi NMR non ha però mostrato segnali dei protoni dell'HVA (Figura 50) e neppure quelli delle particelle.

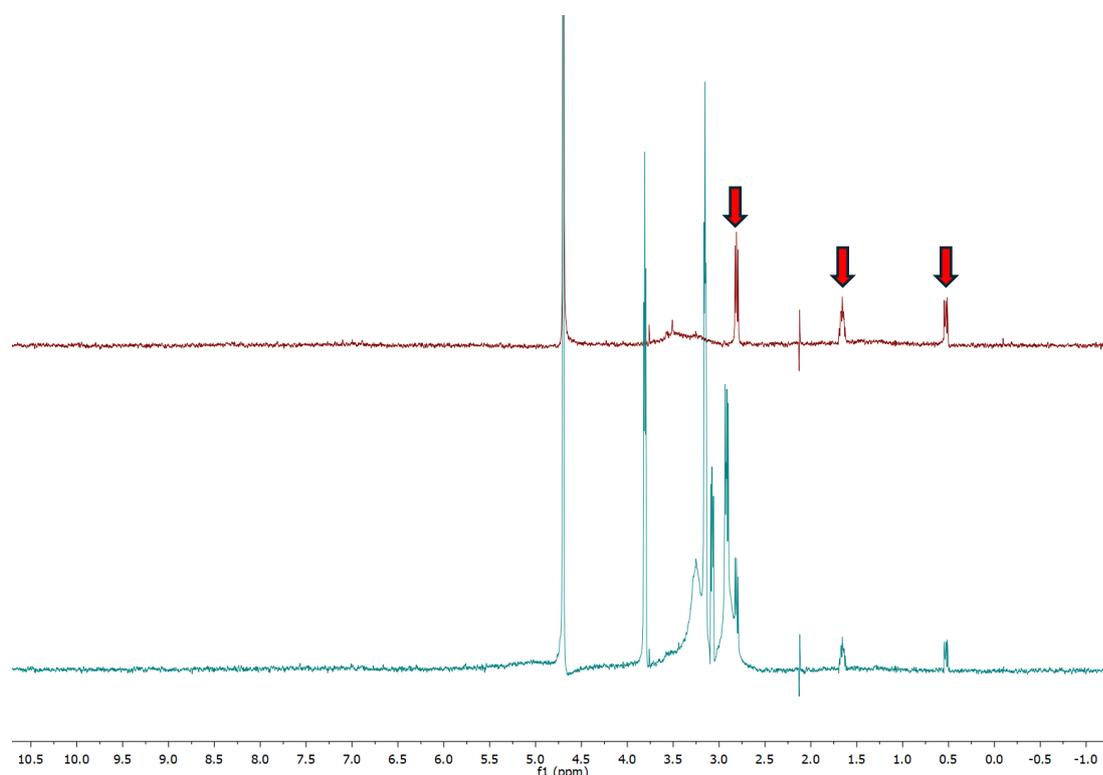


Figura 50: Spettri HPwSTD in H_2O/D_2O delle AuNPs con coating misto N2. In alto in rosso lo spettro nel tubo contenente il buffer HCl a pH=3.4. In basso in blu lo spettro del tubo con il buffer HEPES a pH=6.6. Le frecce rosse indicano impurezze nella D_2O .

4. Conclusioni

Il mio lavoro di Tesi mi ha permesso di individuare limiti e potenzialità di 2 tipologie di nanoparticelle d'oro funzionalizzate per l'applicazione di chemosensing.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti inerenti alla prima tipologia di AuNPs sintetizzate ovvero la classe **M1**, con coating monostrato di **RB04**, queste si sono dimostrate incredibilmente semplici nella sintesi e nella purificazione, anche con valori di rese di reazioni modeste. Purtroppo, la loro caratterizzazione non è stata altrettanto soddisfacente, infatti esse si sono dimostrate considerevolmente instabili in diversi solventi testati (MeOH, ACN ma soprattutto H₂O), rendendo quindi di fatto impossibile proseguire ulteriormente nelle indagini. Le AuNPs di classe **M1**, una volta solubilizzate in un solvente, iniziano a decomporre rilasciando in soluzione gli anelli piridinici carichi positivamente. Il motivo di tale comportamento è stato attribuito ad un sovraffollamento di carica positiva nel coating monostrato. L'eccesso di carica positiva dei tioli **RB04** fa sì che la struttura complessiva delle AuNPs sia sfavorita da forti interazioni di repulsione elettrostatica tra le cariche con lo stesso segno. Inoltre, può provocare un accumulo locale di ioni nucleofili e la stabilizzazione di stati di transizione anionici. Per cui il sistema evolve nell'attenuazione di tale squilibrio cercando di eliminare alcune di queste cariche. Lo studio di tale comportamento è complicato dal fatto che la degradazione comporta una diminuzione di polarità del monostrato e quindi la precipitazione delle AuNPs. Nonostante il bizzarro comportamento delle **M1**, si è preferito continuare nella sintesi di altre tipologie di nanoparticelle piuttosto che approfondirne le proprietà. Un possibile studio futuro sarebbe quello di provare a sintetizzare una classe di AuNPs con coating miste **PEG** e **RB04** per diminuire il problema delle cariche positive e mantenere comunque solubili soprattutto in H₂O le nanoparticelle grazie al tiolo **PEG**.

Per quanto riguarda la seconda famiglia di AuNPs **N**, con coating misto di tiolo **RB39** e tiolo **PEG**, la loro sintesi si è dimostrata discretamente complessa in particolare, nell'ottenimento del tiolo **RB39**. Nonostante tutto, le AuNPs **N** si sono dimostrate notevolmente stabili diversamente dalle **M1** motivo per il quale non solo sono state caratterizzate completamente ma sono state anche utilizzate per le prove di chemosensing di HPwSTD con l'HVA. In prima battuta sono state sintetizzate una 9% **RB39** e 91% **PEG** dei tioli totali presenti. Dalle diverse prove di chemosensing condotte con le AuNPs **N1** e HVA non si è evidenziata nessuna attività di riconoscimento chimico. Il motivo di tale fallimento dopo diverse verifiche è stato attribuito alla bassa concentrazione di tiolo **RB39** nel coating delle AuNPs. Per tale motivo sono state quindi sintetizzate nuovamente una seconda classe di AuNPs **N2** questa volta però con coating

costituito dal 45% **RB39** e 55% **PEG**. Le **N2** sono state quindi nuovamente testate per il riconoscimento dell'HVA ma ancora una volta non è stata osservata nessuna attività riconducibile ad una loro capacità di chemosensore. Il motivo di tale esito negativo non è del tutto chiaro e saranno necessari ulteriori studi per poterne valutare l'effettiva applicazione in ambito di chemosensori. I primi esperimenti hanno comunque evidenziato la mancanza anche dei segnali riconducibili alle particelle nei campioni studiati. Questo potrebbe essere dovuto ad una solubilità insufficiente o ad un'elevata rigidità del monostrato. Entrambi gli effetti sarebbero decrementali per l'efficacia del chemosensing.

5. Parte sperimentale

5.1. Strumentazione e metodi

- **Analisi TEM**

Le immagini TEM sono state registrate tramite un microscopio elettrico Jeol 300 PX. Una goccia del campione viene depositata sulla griglia portacampione e il solvente viene lasciato evaporare all'aria. Le immagini TEM sono state elaborate utilizzando il software ImageJ per misurare la distribuzione del diametro delle nanoparticelle e il valore medio.

- **Spettroscopia UV-Vis**

Per la registrazione degli spettri UV/Vis sono stati utilizzati gli spettrofotometri Varian Cary 60 e Varian Cary 100, equipaggiato con porta-celle termostato a circolazione d'acqua. Per le misure sono state utilizzate celle di quarzo HELMA con cammino ottico di 10 mm

- **Analisi Massa**

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

- **Analisi NMR**

Gli spettri NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker Avance III 500 che opera a 500.13 MHz per ¹H e 125.8 MHz per ¹³C. Le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz. La molteplicità dei segnali è stata indicata in accordo a quanto segue: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, qn = quintetto, m = multipletto, br = banda allargata dd=doppietto di doppietti dt=doppietto di tripletti. Gli spettri sono stati analizzati utilizzando i software Topspin, Mestre Nova.

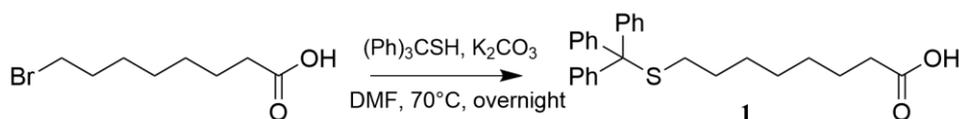
5.2. Materiali

Tutti i reagenti ed i solventi disponibili commercialmente sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Tutti i reagenti sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich ad eccezione della resina IR 120 H⁺ che è stata acquistata dalla Fluka. Le analisi in strato sottile (TLC) sono state effettuate utilizzando lastre con supporto di alluminio precaricate con gel di silice Merck 60 F₂₅₄. Per le colonne cromatografiche è stato utilizzato gel di silice Kieselgel 60M (230-400 mesh).

5.3. Sintesi dei tioli

Tutti gli spettri NMR e ESI-MS usati per la caratterizzazione delle molecole riportate si trovano in appendice

5.3.1. Sintesi dell'acido 8-(trilitio)ottanoico



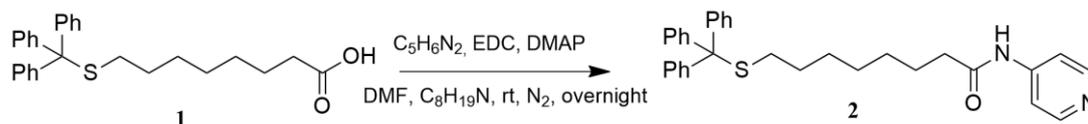
In una provetta in vetro pyrex sono stati aggiunti i seguenti reagenti: acido 8-bromottanoico (PM = 223.107 g/mol, 1 eq, 0.808 g, 3.62 mmol) e trifenilmetantiolo (PM = 276.415 g/mol, 1.2 eq, 1.199 g, 4.34 mmol) con base K₂CO₃ (PM = 138.21 g/mol, 2 eq, 0.991 g, 7.24 mmol) in 6 mL di DMF. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica overnight, riscaldando a 70°C. Successivamente è stata poi trasferita in un pallone ed evaporata. Il crudo di reazione **1**, è stato ridisciolti in 80mL di H₂O sotto agitazione e acidificato a pH = 3 con HCl. Il composto **1** è stato estratto con imbuto separatore usando CH₂Cl₂ per 5 volte. La fase organica ottenuta è stata anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed evaporata. L'estratto **1** ottenuto è stato poi purificato con colonna cromatografica flash (CH₂Cl₂ e successivamente in gradiente di polarità con miscela CH₂Cl₂/MeOH). Sono stati ottenuti 1.338 g di prodotto **1** (resa = 88%).

Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.44 (d, 6H, J = 7.6 Hz, CH), 7.31 (t, 6H, J = 7.3 Hz, CH), 7.23 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH) 2.34 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂) 2.16 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂) 1.60 (qn, 2H, J = 8.2 Hz, CH₂) 1.41 (qn, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂) 1.31-1.24 (m, 4H, CH₂) 1.23-1.17 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR, (126 MHz CDCl₃). δ: 179 (COOH), 144.80 (C quaternario aromatico), 129.61, 127.85, 126.57 (CH aromatici) 66.48 (CS), 33.90 (CH₂) 31.85 (C quaternario), 28.80, 28.76 28.50, 24.56 (CH₂).

5.3.2. Sintesi del N-(piridin-4-il)-8-(trilitio)ottanamamide



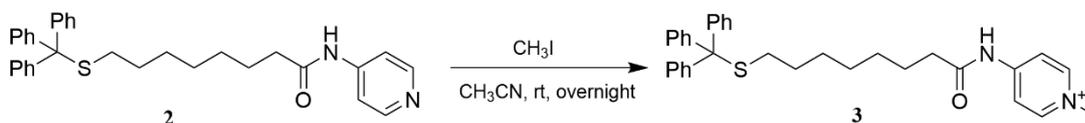
In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il composto **1** (PM = 418.618 g/mol, 1 eq, 1.2 g, 2.9 mmol), la 4-amminopiridina (PM = 94.12 g/mol, 1 eq, 0.270 g, 2.87 mmol), EDC (PM = 191.70 g/mol, 1.2 eq, 0.660 g, 3.44 mmol), la DMAP (PM = 122.17 g/mol, 0.05 eq, 0.022 g, 0.18 mmol) e la N, N-diisopropilteiammina (PM = 129.25 g/mol, 4 eq, 1.482 g, 11.46 mmol) in 6 mL di DMF. La miscela di reazione è stata lasciata overnight sotto agitazione magnetica e in atmosfera di N_2 a temperatura ambiente. La miscela è stata poi evaporata, ed estratta in imbuto separatore usando H_2O e CH_2Cl_2 per 4 volte. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_3 , filtrata ed evaporata. L'estratto **2** è stato purificato con colonna cromatografica flash ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). Sono stati ottenuti 0.977 g di composto **2** (resa = 69%).

Caratterizzazione:

1H -NMR, (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.47 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH aromatici), 7.55 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH aromatici), 7.44 (d, 6H, $J = 7.3$ Hz, CH aromatici), 7.31 (t, 6H, $J = 7.7$ Hz, CH aromatici), 7.23 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH aromatici) 2.37 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2) 2.16 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH_2) 1.67 (qn, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2) 1.38 (qn, 2H, $J = 6.5$ Hz, CH_2) 1.31-1.24 (m, 4H, CH_2) 1.23-1.17 (m, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR, (126 MHz $CDCl_3$). δ : 172.51 (CON), 150.32 (CH aromatico), 145.95 (C quaternario aromatico), 145.04, 129.70, 127.77, 126.45 (CH aromatico), 113.71 (CHN aromatico), 66.39 (CS), 37.60 (CH_2), 31.94 (C quaternario), 28.99, 28.87, 28.77, 28.53, 25.17 (CH_2).

5.3.3. Sintesi 1-metil-4-(8-(trilitio)ottanamido)piridin-1- io



In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il composto **2** (PM = 494.738 g/mol, 1 eq, 0.5 g, 1 mmol), e CH₃I (PM = 141.84 g/mol, 1.2 eq, 0.076 g, 1.2 mmol) in 5 mL di ACN. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente overnight. Successivamente è stata evaporata. Sono stati ottenuti 0.47 g di prodotto **3** (resa = 73%).

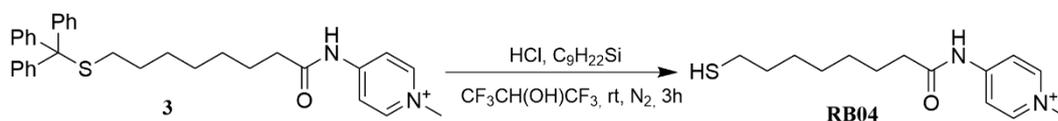
Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, MeOD) δ: 8.62 (d, 2H, J = 7.8 Hz, CH aromatici), 8.16 (d, 2H, J = 7.8 Hz, CH aromatici), 7.39 (d, 6H, J = 7.4 Hz, CH aromatici), 7.28 (t, 6H, J = 7.4 Hz, CH aromatici), 7.21 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH aromatici) 4.24 (s, 3H, CH₃), 2.51 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂) 2.13 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂) 1.65 (m, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂) 1.38-1.32 (m, 2H, CH₂) 1.31-1.27 (m, 4H, CH₂) 1.26-1.17 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR, (126 MHz, MeOD) δ: 174.25 (CON), 152.26 (CH aromatico), 145.57 (C quaternario aromatico), 145.04, 129.40, 127.49, 126.33 (3C, CH aromatico), 114.71 (CHN aromatico), 66.28 (CS), 45.97 (CH₃), 35.99 (CH₂), 30.45 (C quaternario), 28.51, 28.49, 28.43, 28.26, 24.39 (CH₂).

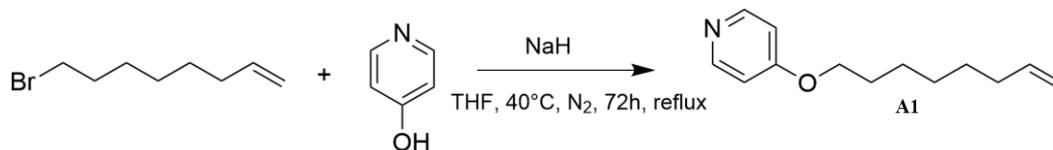
MS (ESI): m/z 509.3 ([M+H]⁺).

5.3.4. Sintesi 4-(8-mercaptoottanamido)-1-metilpiridin- 1-io



In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il composto **3** (PM = 509 g/mol, 1 eq, 0.05 g, 0.08 mmol) e l'HCl 12 M (PM = 36.46 g/mol, 10 eq, 0.028 g, 0.79 mmol) in 2 mL di 1,1,1,3,3,3 esafluoroisopropanolo. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente e sotto atmosfera di N₂ per 1 ora. Dopo 1 ora, è stata fatta una seconda aggiunta di triisoprilsilano (PM = 158.36 g/mol, 2 eq, 0.025 g, 0.16 mmol). La reazione è stata lasciata nelle stesse condizioni precedenti, per altre 2 ore. La miscela è stata poi evaporata.

5.3.5. Sintesi del 4-(oct-7-en-1-ilossi)piridina



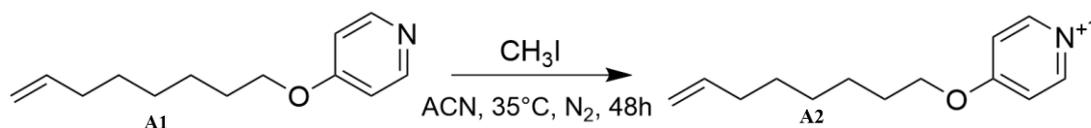
In un pallone di reazione sono stati aggiunti i reagenti: 8-bromottene (PM = 191.111 g/mol, 1 eq, 0.201 g, 1.05 mmol) e 4-idrossipiridina (PM = 95 g/mol, 1 eq, 0.1 g, 1 mmol) insieme al NaH 60% g/g (PM = 24 g/mol, 3.5 eq, 0.147 g, 3.69 mmol) in 5 mL di THF. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a 40°C con riflusso, in atmosfera di N₂, per 72 ore. La miscela è stata evaporata ed il crudo di reazione è stato purificato con colonna cromatografica flash (CH₂Cl₂/MeOH in gradiente di polarità). Sono stati ottenuti 22 mg di prodotto **A1** (resa = 10%).

Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.44 (d, 2H, J = 4.6 Hz, CH aromatici), 6.80 (d, 2H, J = 5.9 Hz, CH aromatici), 5.87-5.79 (m, 1H, CH), 5.04-4.93 (m, 2H, CH₂), 4.01 (t, 2H, J = 6.7 Hz, CH₂), 2.08 (q, 2H, J = 6.6 Hz, CH₂), 1.81 (qn, 2H, J = 6.6 Hz, CH₂), 1.52-1.37 (m, 6H, CH₂).

¹³C-NMR, (126 MHz, CDCl₃) δ: 165.11 (CO aromatico), 151.07 (CH aromatico), 138.97 (CH aromatico), 114.38 (CH), 110.27 (CH₂), 67.73 (COH₂), 33.58, 28.82, 28.76, 25.78 (CH₂).

5.3.6. Sintesi del 1-metil-4-(oct-7-en-1-ilossi)piridin-1-io



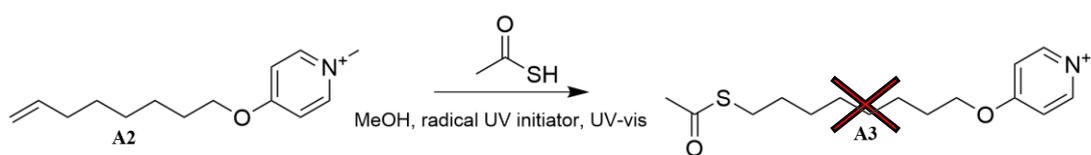
In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il composto **A1** (PM = 205 g/mol, 1 eq, 0.326 g, 1.59 mmol) ed il CH₃I (PM = 141.94 g/mol, 1.5 eq, 0.338 g, 2.39 mmol) in 6 mL di ACN. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a 35°C e in atmosfera di N₂ per 48 ore. Successivamente è stata evaporata ed il crudo di reazione è stato purificato con colonna cromatografica flash (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Sono stati ottenuti 0.238 g di prodotto **A2** (resa = 68%).

Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.02 (d, 2H, J = 7.4 Hz, CH aromatici), 7.39 (d, 2H, J = 7.4 Hz, CH aromatici), 5.79-5.70 (m, 1H, CH), 4.97-4.87 (m, 2H, CH₂), 4.43 (s, 3H, CH₃), 4.25 (t, 2H, J = 6.5 Hz, CH₂), 2 (q, 2H, J = 7 Hz, CH₂), 1.81 (qn, 2H, J = 7 Hz, CH₂), 1.45-1.28 (m, 6H, CH₂).

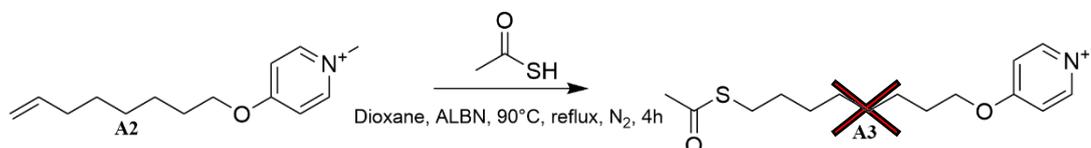
¹³C-NMR, (126 MHz, CDCl₃) δ: 170.25 (CO aromatico), 146.89, 138.73 (1C, CH aromatico), 114.47 (CH), 113.95 (CH₂), 71.65 (COH₂), 47.40 (CH₃), 33.50, 28.52, 28.30, 25.37 (CH₂).

5.3.7. Sintesi 4-((8-(acetiltio)ottili)ossi)-1-metilpiridin-1-io



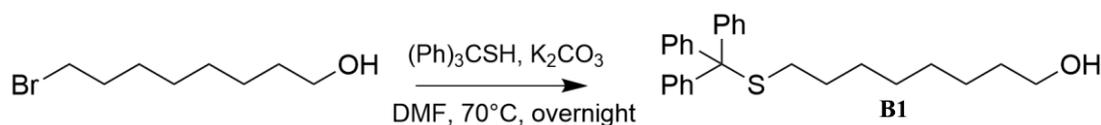
In una beuta sono stati aggiunti circa 8 mL di MeOH il quale è stato degassato per 30 minuti con flusso di N₂. Successivamente in un cuvetta in quarzo sono stati aggiunti: il reagente **A2** (PM = 220 g/mol, 1 eq, 0.1 g, 0.4 mmol), l'acido tioacetico (PM = 76.12 g/mol, 9 eq, 0.311 g, 4.09 mmol) e l'iniziatore radicalico 2,2 dimetossi-2-fenil-acetofenone (PM = 256.30 g/mol 0.2 eq, 0.023 g, 0.091 mmol) in 2 mL del MeOH precedentemente degassato. Il sistema di reazione è stato lasciato in una camera oscura con lampada UV per 5 ore sotto agitazione. Dalla reazione non è stato ottenuto il composto **A3**.

5.3.8. Sintesi 4-((8-(acetiltio)ottile)ossi)-1-metilpiridin-1-io



In una beuta sono stati aggiunti 8 mL di diossano, il quale è stato degassato per 30 minuti con N_2 sotto cappa. In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il reagente **A2** (PM = 220 g/mol, 1 eq, 0.1 g, 0.5 mmol), l'acido tioacetico (PM = 76.12 g/mol, 10 eq, 0.349 g, 4.55 mmol) e l'iniziatore radicalico ALBN (PM = 164.21 g/mol, 1 eq, 0.075 g, 0.455 mmol) in 6 mL del diossano degassato. La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica, alla temperatura di 90°C con riflusso e atmosfera di N_2 , per 4 ore. Dalla reazione non si è ottenuto il composto **A3**.

5.3.9. Sintesi del 8-(trilitio)ottan-1-olo

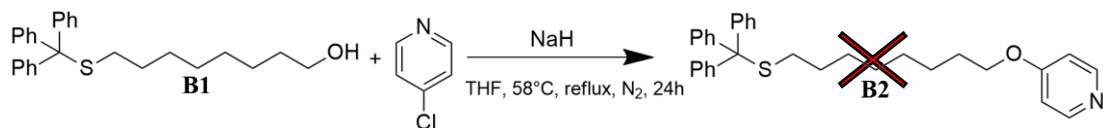


In un pallone di reazione, sono stati aggiunti: il reagente 8-bromottanolo (PM = 209.12 g/mol, 1 eq, 0.8 g, 4 mmol), ed il trifenilmetantiolo (PM = 276.415 g/mol, 1.2 eq, 1.268 g, 4.59 mmol) in 6 mL di DMF con K_2CO_3 (PM = 138.21 g/mol, 2 eq, 1.057 g, 7.65 mmol). La reazione è stata lasciata a 70°C sotto agitazione magnetica overnight. La miscela di reazione è stata poi evaporata ed il crudo ottenuto è stato ridisciolto con 60 mL di una soluzione di LiCl e acidificato a pH = 2 con HCl. La nuova miscela ottenuta è stata quindi estratta con EtOAc in imbuto separatore. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_3 , filtrata ed evaporata. L'estratto ottenuto è stato successivamente purificato con colonna cromatografica flash (CH_2Cl_2 e $CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). Sono stati ottenuti 1.421 g di prodotto **B1** (resa = 92%).

Caratterizzazione:

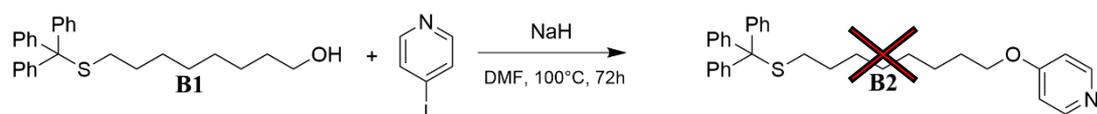
$^1\text{H-NMR}$, (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.51 (d, 6H, $J = 7.6$ Hz, CH aromatici), 7.34 (t, 6H, $J = 7.6$ Hz, CH aromatici), 7.26 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, CH aromatici), 3.65 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 2.24 (t, 2H, $J = 7$ Hz, CH_2), 1.59 (qn, 2H, $J = 7$ Hz, CH_2), 1.47 (qn, 2H, $J = 7$ Hz, CH_2), 1.40-1.21 (m, 8H, CH_2).

5.3.10. Sintesi del 4-((8-(trilitio)ottile)ossi)piridina



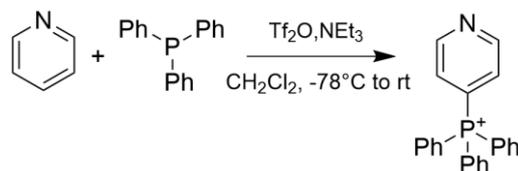
In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il reagente **B1** (PM = 404.61 g/mol, 1 eq, 0.519 g, 1.28 mmol), e la 4-cloropiridina (PM = 150.01 g/mol, 1.2 eq, 0.230 g, 1.54 mmol) in 5 mL di THF con NaH al 60% g/g (PM = 24 g/mol, 3 eq, 0.154 g, 3.85 mmol). La miscela di reazione è stata lasciata a 58°C con riflusso, sotto agitazione magnetica e in atmosfera di N₂ per 24 ore. Successivamente sono stati aggiunti pochi mL di H₂O e la nuova miscela ottenuta è stata estratta con CH₂Cl₂ usando un imbuto separatore. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed evaporata. L'estratto ottenuto è stato poi purificato con colonna cromatografica flash (EtOAc/P. E 4:6). Dalla colonna non è stato ottenuto nessun prodotto **B2**.

5.3.11. Sintesi del 4-((8-(trilitio)ottile)ossi)piridina



In una provetta in vetro pyrex, sono stati aggiunti: il reagente **B1** (PM = 404.61 g/mol, 1 eq, 0.134 g, 0.331 mmol), e la 4-iodopiridina (PM = 205 g/mol, 1.2 eq, 0.081 g, 0.39 mmol) in 6 mL di DMF e NaH al 60% g/g (PM = 24 g/mol, 3 eq, 0.039 g, 1 mmol). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a 100°C per 72ore. Dalla reazione non è stato ottenuto nessun prodotto **B2**.

5.3.12. Sintesi della 4-(trifenilfosfo)piridina



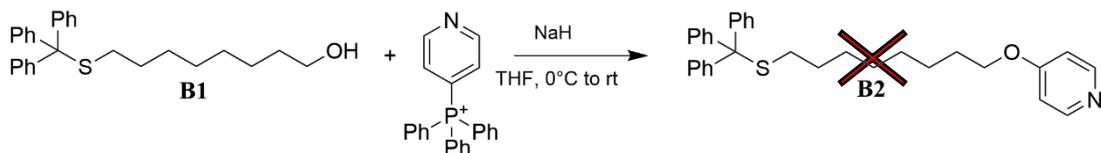
In un pallone di reazione è stata aggiunta la piridina (PM = 79.10 g/mol, 1 eq, 0.5 g, 6 mmol) e la miscela è stata posta sotto agitazione magnetica, in atmosfera di N₂. Successivamente all'interno del pallone è stato aggiunto goccia a goccia il CH₂Cl₂ ed il tutto è stato raffreddato a -78°C con un bagno di ghiaccio secco e acetone, prima di aggiungere goccia a goccia il Tf₂O (PM = 282.13 g/mol, 1 eq, 1.78 g, 6.32 mmol). La miscela di reazione è stata quindi lasciata sotto agitazione e in atmosfera di N₂ per 30 minuti. Passati i 30 minuti, è stata aggiunta la PPh₃ (PM = 262.29 g/mol, 1.1 eq, 1.82 g, 6.95 mmol). Il tutto è stato quindi lasciato nuovamente sotto agitazione e N₂ per altri 30 minuti sempre mantenendo la temperatura a -78°C. Infine è stata aggiunta la NEt₃ (PM = 101.19 g/mol, 1 eq, 0.639 g, 6.32 mmol) e la miscela di reazione è stata rimossa dal bagno refrigerante e lasciata tornare lentamente a temperatura ambiente. La reazione è stata neutralizzata con H₂O dopo altri 30 minuti ed il tutto è stato trasferito in un imbuto separatore ed estratto con CH₂Cl₂. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed evaporata fino a circa 2 mL di volume rimanente. A questo punto è stato aggiunto un eccesso di Et₂O raffreddato a 0°C ed il tutto è stato posto in freezer a -20°C per circa 1 ora. Passato il tempo necessario si è ottenuta una sospensione, la quale è stata separata con l'uso di una centrifuga ed il solido ottenuto è stato lavato altre 4 volte con Et₂O a 0°C.

Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.01 (br, 2H, CH aromatico), 7.92 (t, 3H, J = 6.9 Hz, CH aromatico), 7.80 (dt, 6H, CH aromatico) 7.65 (dd, 8H, CH aromatico).

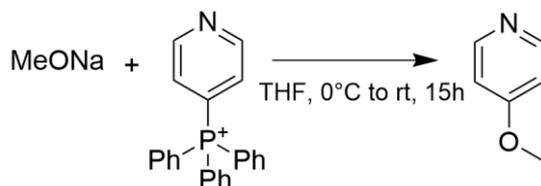
¹³C-NMR, (126 MHz, CDCl₃) δ: 151.23 (C quaternario aromatico), 136.36, 134.50, 131.13, 115.97, 115.26 (CH aromatico).

5.3.13. Sintesi del 4-((8-(trilitio)ottile)ossi)piridina



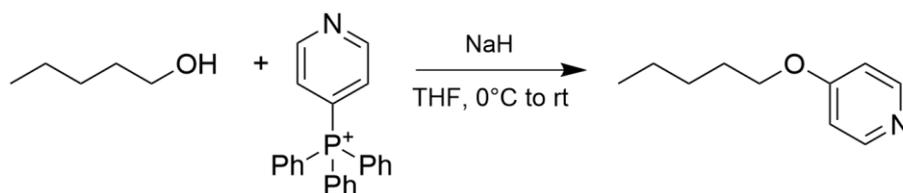
In un pallone di reazione è stato aggiunto il NaH 60% g/g (PM = 24 g/mol, 1.5 eq, 0.022 g, 0.92 mmol) e la miscela è stata messa sotto agitazione magnetica e in atmosfera di N₂. A questo punto è stato aggiunto il THF e la sospensione è stata raffreddata a 0°C prima di inserire il reagente **B1** (PM = 404.61 g/mol, 1.5 eq, 0.372 g, 0.919 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 30 minuti e successivamente è stato aggiunto il sale della 4-trifenilfosfopiridina. Il pallone è stato quindi tolto dal bagno refrigerante e lasciato tornare lentamente a temperatura ambiente sotto agitazione per 12 ore. Passato il tempo necessario la miscela è stata neutralizzata con H₂O ed il tutto è stato estratto con Et₂O per 3 volte. La fase organica raccolta è stata anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed evaporata. L'estratto ottenuto è stato purificato con colonna cromatografica flash (CH₂Cl₂). Dalla reazione non è stato ottenuto alcun prodotto **B2**.

5.3.14. Sintesi della 4-(metossi)piridina



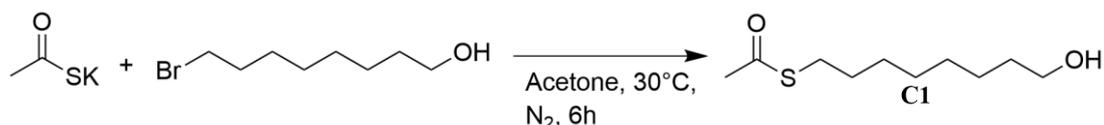
In una vial da massa sono stati aggiunti 2 mL di THF ed il sistema è stato immerso in un bagno a ghiaccio a 0°C. Successivamente sono stati aggiunti: il sale della 4-trifenilfosfopiridina (PM = 489.45 g/mol, 1 eq, 0.030 g, 0.061 mmol) ed il metossido di sodio (PM = 54 g/mol, 1.5 eq, 0.005 g, 0.091 mmol). Dopo 30 min la miscela è stata tolta dal bagno refrigerante e lasciata tornare a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 15 ore. La miscela è stata quindi analizzata tramite TLC usando CH₂Cl₂/MeOH 95:5.

5.3.15. Sintesi della 4-(pentilossi)piridina



In un pallone di reazione è stato aggiunto l'NaH 60% g/g (PM = 24 g/mol, 1.5 eq, 0.012 g 0.31 mmol) ed il sistema è stato raffreddato a 0°C con un bagno a ghiaccio in atmosfera di N₂. Successivamente sono stati aggiunti 3 mL di THF ed il pentanolo (PM = 88 g/mol, 1.5 eq, 0.027 g, 0.31 mmol). La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 30 minuti prima di aggiungere il sale della 4-trifenilfosfopiridina (PM = 489.45 g/mol, 1 eq, 0.1 g, 0.2 mmol). Successivamente il pallone è stato tolto dal bagno a ghiaccio e lasciato tornare a temperatura ambiente per poi mantenere tutto sotto agitazione per 12 ore. Passato il tempo necessario, la miscela è stata analizzata tramite TLC usando CH₂Cl₂/MeOH 95:5.

5.3.16. Sintesi del S-(8-idrossiottile)etanioato

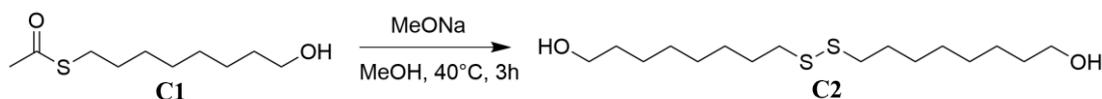


In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il sale di potassio tiacetato (PM = 114.21 g/mol, 1.5 eq, 0.409 g, 3.59 mmol) e l'8-bromottanolo (PM = 209.11 g/mol, 1 eq, 0.5 g, 2 mmol) in 8 mL di acetone. La miscela di reazione è stata lasciata a 30°C, sotto agitazione magnetica e atmosfera di N₂ per 6 ore. Passato il tempo necessario, la reazione è stata neutralizzata con H₂O ed estratta con EtOAc per 3 volte. La fase organica è stata quindi, anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed evaporata. L'estratto ottenuto è stato purificato con colonna cromatografica flash (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). Sono stati ottenuti 0.371 g di prodotto **C1** (resa = 65%).

Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.56 (t, 2H, J = 6.7Hz, CH₂), 2.81 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂), 2.27 (s, 3H, CH₃), 1.57-1.44 (m, 4H, CH₂), 1.38-1.21 (m, 8H, CH₂).

5.3.17. Sintesi del 8,8-disolfanedilbis(ottan-1-olo)



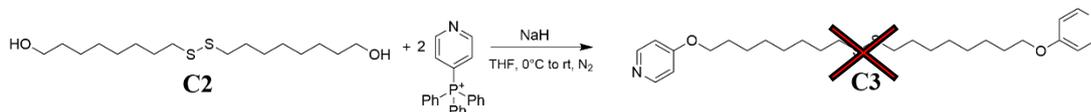
In un pallone di reazione, sono stati aggiunti: il composto **C1** (PM = 283.24 g/mol, 1 eq, 0.3 g, 1 mmol) ed il MeONa (PM = 54 g/mol, 3 eq, 0.172 g, 3.17 mmol) in MeOH. La miscela di reazione è stata quindi lasciata sotto agitazione magnetica, a 40°C per 3 ore. Passato il tempo necessario è stata quindi fatta un'estrazione con H₂O ed EtOAc per 3 volte. La fase organica raccolta è stata quindi anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed estratta. Sono stati ottenuti 0.126 g di prodotto **C2** (resa = 37%).

Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.65 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 2.69 (t, 2H, J = 7.7 Hz, CH₂), 2.56 (br, 2H, OH), 1.68 (qn, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 1.57 (qn, 2H, J = 7.7 Hz, CH₂), 1.34 (m, 6H, CH₂).

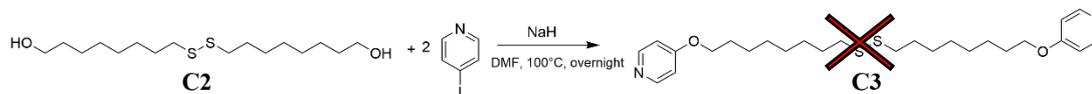
¹³C-NMR, (126 MHz, CDCl₃) δ: 63.04 (CH₂OH), 39.16 (CH₂S), 32.64, 29.26, 29.17 28.41, 25.68 (CH₂).

5.3.18. Sintesi 1,2-bis(8-(piridin-4-ilossi)ottile)disolfano



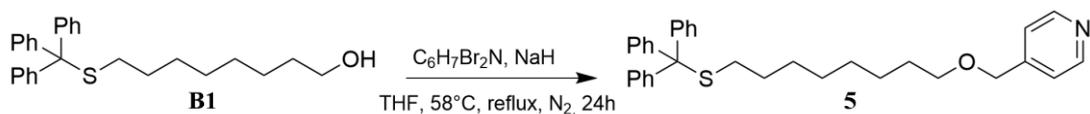
In un pallone di reazione con tappo forabile, sono stati aggiunti nel seguente ordine: il reagente **C2** (PM = 322.57 g/mol, 1 eq, 0.05g 0.16 mmol), l'NaH 60% g/g (PM = 24 g/mol, 2.3 eq, 0.014 g, 0.36 mmol) e pochi mL di THF. La miscela è stata posta in bagno a ghiaccio a 0°C per 30 minuti, sotto agitazione magnetica e flusso di N₂. Dopo 30 minuti, è stato aggiunto il sale della 4-trifenilfosfopiridina (PM = 489.45 g/mol, 2.3 eq, 0.175 g, 0.357 mmol) e la miscela è stata tolta dal bagno refrigerante e lasciata tornare a temperatura ambiente. La reazione è stata quindi neutralizzata con H₂O ed estratta con EtOAc per 3 volte. Non è stato isolato nessun prodotto **C3**.

5.3.19. Sintesi 1,2-bis(8-(piridin-4-ilossi)ottile)disolfano



In un tubo in vetro pyrex sono stati aggiunti: il reagente **C2** (PM = 322.57 g/mol, 1 eq, 0.05 g, 0.16 mmol) la 4-iodopiridina (PM = 205 g/mol, 2.3 eq, 0.073 g, 0.36 mmol) e l'NaH 60% g/g (PM = 24 g/mol, 2.3 eq, 0.014 g, 0.36 mmol) in 5 mL di DMF. La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a 100°C overnight. La reazione è stata successivamente neutralizzata con H₂O ed estratta con EtOAc per 3 volte. Non è stato possibile isolare nessun prodotto **C3**.

5.3.20. Sintesi del 4-((8-(trilitio)ottile)ossi)piridina



In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il reagente **B1** (PM = 404.61 g/mol, 1 eq, 0.3 g, 0.7 mmol), la 4-bromopiridina (PM = 252.93 g/mol, 1.5 eq, 0.281 g, 1.11 mmol) e l'NaH 60% g/g (PM = 24 g/mol, 3 eq, 0.053 g, 2.2 mmol) in 5 mL di THF. La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a 58°C con riflusso e in atmosfera di N₂ per 24 ore. La reazione è stata neutralizzata con H₂O, basificata con K₂CO₃ ed estratta con EtOAc per 3 volte. La fase organica ottenuta è stata quindi anidrificata con Na₂SO₃, filtrata ed evaporata. L'estratto ottenuto è stato purificato con 2 colonne cromatografiche flash (CH₂Cl₂ con NEt₃). Sono stati ottenuti 0.105 g di prodotto **5** (resa = 28.6%)

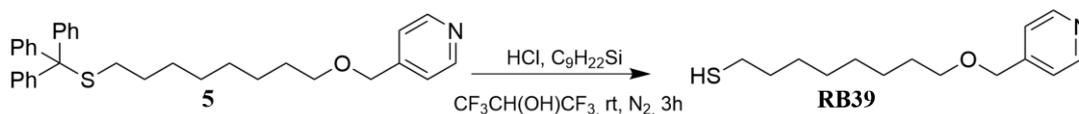
. Caratterizzazione:

¹H-NMR, (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.59 (d, 2H, J = 4.3 Hz, CH aromatici), 7.43 (d, 6H, J = 7.3 Hz, CH aromatici), 7.30 (t, 8H, J = 6.9 Hz, CH aromatici), 7.21 (t, 3H, J = 7 Hz, CH aromatici), 4.53 (s, 2H, CH₂), 3.50 (t, 2H, J = 6.5 Hz, CH₂), 2.16 (t, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂), 1.63 (qn, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂), 1.49-1.14 (m, 10H, CH₂).

¹³C-NMR, (126 MHz, CDCl₃) δ: 149.35, 144.97, 129.59, 127.80, 126.53, 121.87 (CH aromatico), 71.18, 71.05 (COH₂), 66.37 (CSH₂), 32.01, 29.66, 29.21, 29.10, 28.91, 28.56, 26.05 (CH₂).

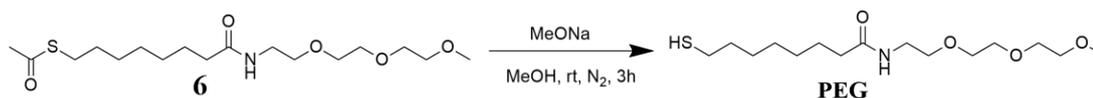
MS (ESI): m/z 496.2 ([M+H]⁺).

5.3.21. Sintesi del 8-(piridina-4-ilossi)ottan-1-tiolo



Deprotezione del composto **5** per il coating delle AuNPs **N1** In un pallone di reazione, sono stati aggiunti: il reagente **5** (PM = 495.73 g/mol, 1 eq, 0.018 g, 0.037 mmol), HCl 12M (PM = 36.46 g/mol, 10 eq, 0.013 g, 0.37 mmol) in 1,1,1,3,3,3-esafuoroisopropanolo. La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente e in atmosfera di N₂ per 2 ore. Passate le 2 ore, alla miscela è stato aggiunto il trisopropilsilano (PM = 158.36 g/mol, 2 eq, 0.012 g, 0.074 mmol) ed il tutto è stato lasciato a reagire per un'altra ora. Per la deprotezione del composto **5** e l'ottenimento del tiolo **RB39** da usare per le AuNPs **N2**, sono stati seguiti gli stessi passaggi ma con le seguenti quantità di reagenti. Composto **5** (PM = 495.73 g/mol, 1 eq, 0.024 g, 0.048 mmol), HCl 12M (PM = 36.46 g/mol, 10 eq, 0.018 g, 0.48 mmol) ed infine trisopropilsilano (PM = 158.36 g/mol, 2 eq, 0.015 g, 0.096 mmol).

5.3.22. Sintesi 8-mercapto-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossido)etil)ottanamide



Deprotezione del composto **6** per il coating delle AuNPs **N1** In un pallone di reazione sono stati aggiunti: il reagente **6** (PM = 363.54 g/mol, 1 eq, 0.036 g, 0.086 mmol) ed il MeONa (PM = 54.02 g/mol, 3 eq, 0.014 g, 0.26 mmol) in MeOH. La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente, in flusso di N₂ per 3 ore. Successivamente la miscela di reazione è stata filtrata attraverso una Pasteur contenente la resina a scambio ionico IR 120 H⁺. Per la deprotezione del composto **6** e la sintesi del tiolo **PEG** usato nel coating delle AuNPs **N2**, sono stati seguiti gli stessi passaggi di reazione ma usando le seguenti quantità di reagenti: composto **6** (PM = 363.54 g/mol, 1 eq, 0.044 g, 0.12 mmol) ed il MeONa (PM = 54.02 g/mol, 3 eq, 0.020 g, 0.37 mmol).

5.4. Sintesi e caratterizzazioni delle AuNPs

5.4.1. Sintesi delle AuNPs con monostrato di RB04 (M1)

Tutta la vetreria di laboratorio utilizzata in questi step è stata precedentemente lavata accuratamente usando una soluzione di acqua regia, in modo tale da eliminare eventuali residui di oro provenienti da reazioni di sintesi di AuNPs precedenti e che avrebbero potuto costituire siti di nucleazione non previsti. In un imbuto separatore, è stata aggiunta una soluzione di $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM = 393.83 g/mol, 1 eq, 0.05 g, 0.13 mmol) in 0.5 mL di H_2O , la quale è stata estratta per 3 volte, usando una soluzione di TOAB (PM = 546.79 g/mol, 2.5 eq, 0.174g, 0.317 mmol) in 125 mL di toluene precedentemente lasciata a degassare per 30 minuti. La fase organica ottenuta presentava una colorazione rossa e questa è stata aggiunta la DOA (PM = 241.46 g/mol, 20 eq, 0.77 mL 2.5 mmol). La miscela di reazione è diventata di colore nero ed è stata lasciata sotto agitazione magnetica, in atmosfera controllata di N_2 per 2 ore. Durante questa fascia di tempo si è osservata la variazione di colorazione prima da nero a incolore. La soluzione è stata successivamente raffreddata con un bagno a ghiaccio 0°C ed è stata aggiunta una soluzione di NaBH_4 (PM = 37.83 g/mol, 10 eq, 0.048 g, 1.27 mmol) in 0.5 mL di H_2O . La miscela di reazione ha cambiato il suo colore da incolore a rosso scuro ed è stata lasciata a reagire sotto agitazione, a 0°C ed in atmosfera di N_2 per altre 2 ore. Passato il tempo necessario, è stato aggiunto alla miscela il tiolo **RB04** (PM = 394.347 g/mol, 2 eq, 0.048 g, .0.12 mmol) nella minima quantità di MeOH possibile. Il tutto è stato mantenuto sotto agitazione e in atmosfera di N_2 per tutta la notte. Il giorno seguente le nanoparticelle sono state recuperate mediante centrifugazione (5000 rpm 8 min) e lavaggio con Et_2O . Le nanoparticelle **M1** così ottenute sono state sciolte in una minima quantità di MeOH e poi precipitate con Et_2O in centrifuga per circa 5 volte. Successivamente le AuNPs **M1** sono state purificate con colonna cromatografica ad esclusione dimensionale utilizzando la resina Sephadex LH-20 e MeOH come solvente. Sono stati ottenuti 0.020 g di AuNPs **M1**.

5.4.2. Sintesi delle AuNPs con coating misto RB39/PEG (N1)

Tutta la vetreria di laboratorio utilizzata in questi step è stata precedentemente lavata accuratamente usando una soluzione di acqua regia, in modo tale da eliminare eventuali residui di oro provenienti da reazioni di sintesi di AuNPs precedenti e che avrebbero potuto costituire siti di nucleazione non previsti. In un imbuto separatore, è stata aggiunta una soluzione di $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM = 393.83 g/mol, 1 eq, 0.05 g, 0.13 mmol) in 0.5 mL di H_2O , la quale è stata estratta per 3 volte, usando una soluzione di TOAB (PM = 546.79 g/mol, 2.5 eq, 0.174 g, 0.317 mmol) in 125 mL di toluene precedentemente lasciata a degassare per 30 minuti. La fase organica ottenuta presentava una colorazione rossa e questa è stata aggiunta la DOA (PM = 241.46 g/mol, 20 eq, 0.77 mL 2.5 mmol). La miscela di reazione è diventata di colore nero ed è stata lasciata sotto agitazione magnetica, in atmosfera controllata di N_2 per 2 ore. Durante questa fascia di tempo si è osservata la variazione di colorazione prima da nero a incolore. La soluzione è stata successivamente raffreddata con un bagno a ghiaccio 0°C ed è stata aggiunta una soluzione di NaBH_4 (PM = 37.83 g/mol, 10 eq, 0.048 g, 1.27 mmol) in 0.5 mL di H_2O . La miscela di reazione ha cambiato il suo colore da incolore a rosso scuro ed è stata lasciata a reagire sotto agitazione, a 0°C ed in atmosfera di N_2 per altre 2 ore. Passato il tempo necessario, è stata aggiunta alla miscela, la soluzione contenente, il tiolo **RB39** (PM = 253.40 g/mol, 0.3 eq, 0.009 g, .0.04 mmol) e tiolo **PEG** (PM = 321.48 g/mol, 0.7 eq, 0.028 g, 0.086 mmol) nella minima quantità di MeOH possibile. Il tutto è stato mantenuto sotto agitazione e in atmosfera di N_2 per tutta la notte. Il giorno seguente le nanoparticelle sono state recuperate mediante centrifugazione (5000 rpm 8 min) e lavaggio con Et_2O . Le nanoparticelle **N1** così ottenute sono state sciolte in una minima quantità di MeOH e poi precipitate con Et_2O in centrifuga per circa 5 volte. Successivamente le AuNPs **N1** sono state purificate con 2 colonne cromatografiche ad esclusione dimensionale utilizzando la resina Sephadex LH-20 e MeOH come solvente. Sono stati ottenuti 0.024 g di AuNPs **N1**.

5.4.3. Caratterizzazione delle AuNPs N1

Dall'analisi TEM condotta (Figura 51), è emerso che le nanoparticelle AuNPs N1 presentano un diametro medio di 1.93 ± 0.45 nm (Figura 52). Utilizzando l'analisi TGA (Figura 53), è stato possibile stimare che la formula chimica media corrisponde a $\text{Au}_{221}(\text{SR})_{81}$. Per arricchire ulteriormente la caratterizzazione è stato acquisito lo spettro UV-Vis (Figura 54). oltre agli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^1\text{H-NMR}$ con filtro di diffusione (Figure 55-56).

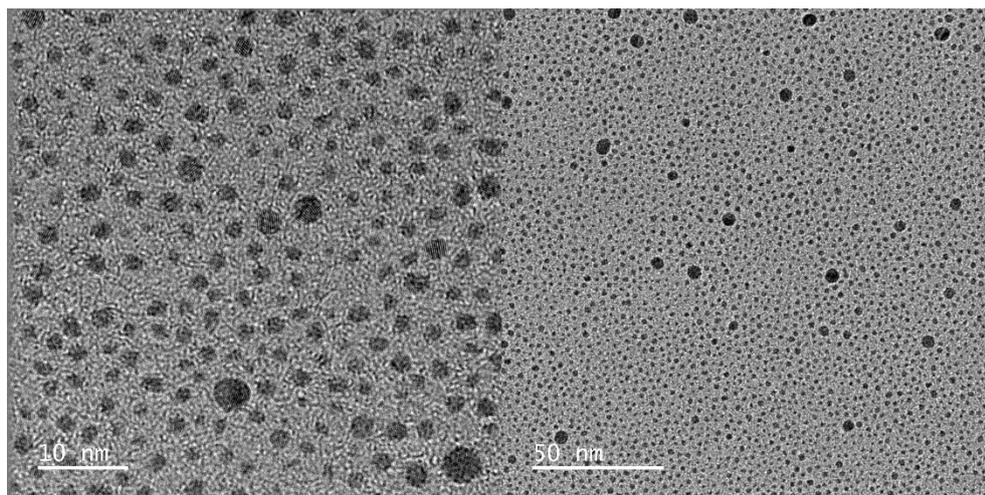


Figura 51: Immagini TEM delle AuNPs N1 con diversa magnificazione.

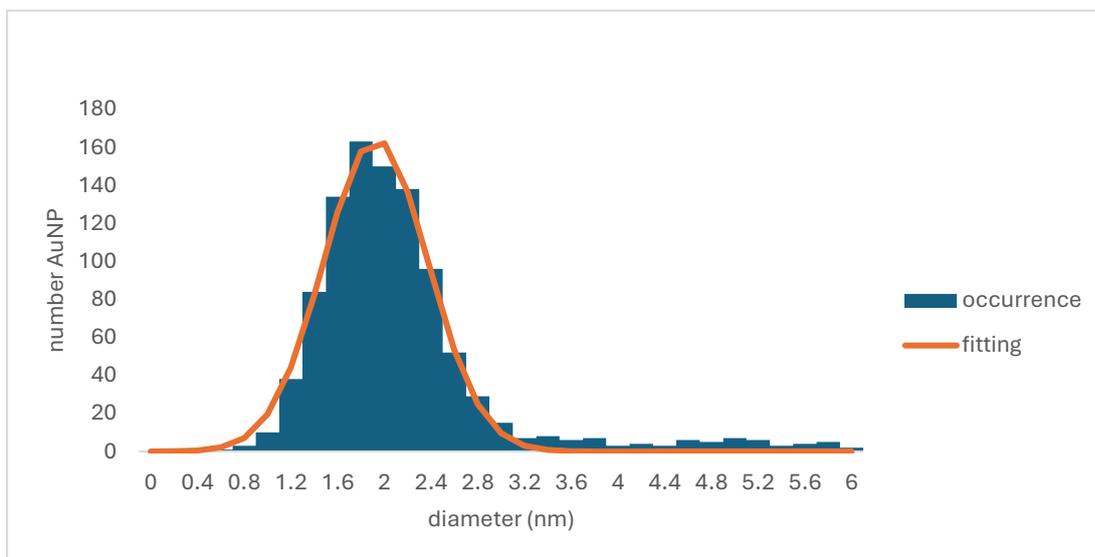


Figura 52: Grafico della polidispersione delle AuNPs N1. Il grafico mostra chiaramente che il valore medio del diametro delle nanoparticelle è di 1.9 nm.

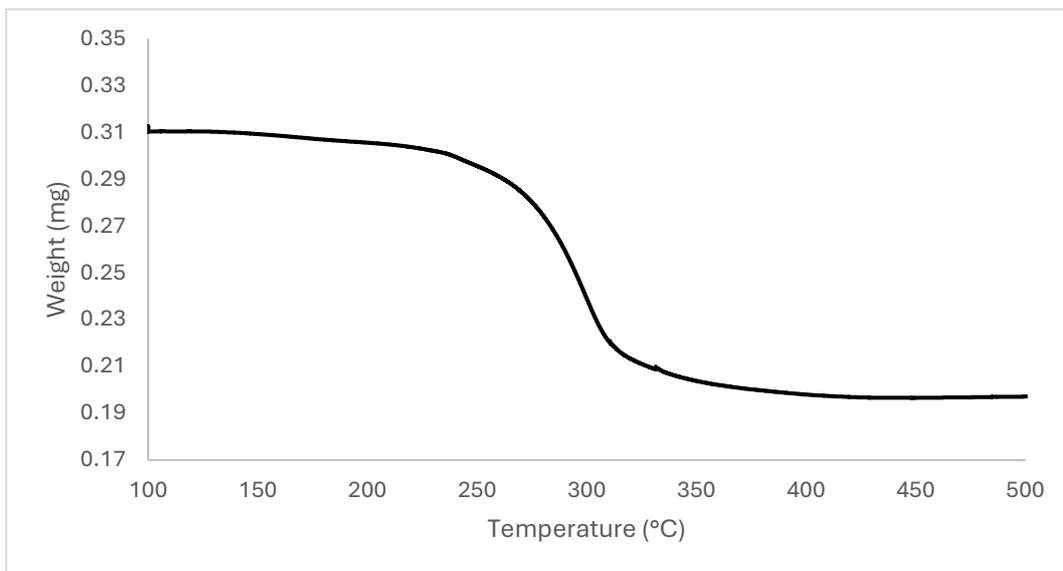


Figura 53: Grafico termogravimetrico delle AuNPs NI sotto flusso d'aria. La perdita in massa misurata corrisponde a circa il 37% della massa totale.

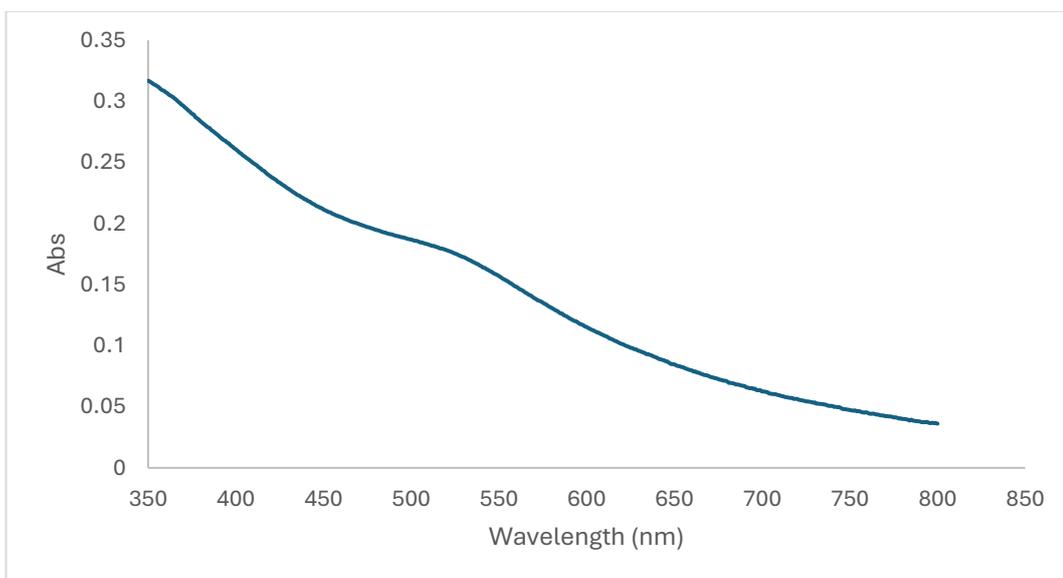


Figura 54: Grafico UV-vis delle AuNPs NI. Come si può osservare, è presente solamente una piccola spalla a 520 nm dovuta alla bassa frazione di nanoparticelle con nucleo di oro più grande dei 2 nm.

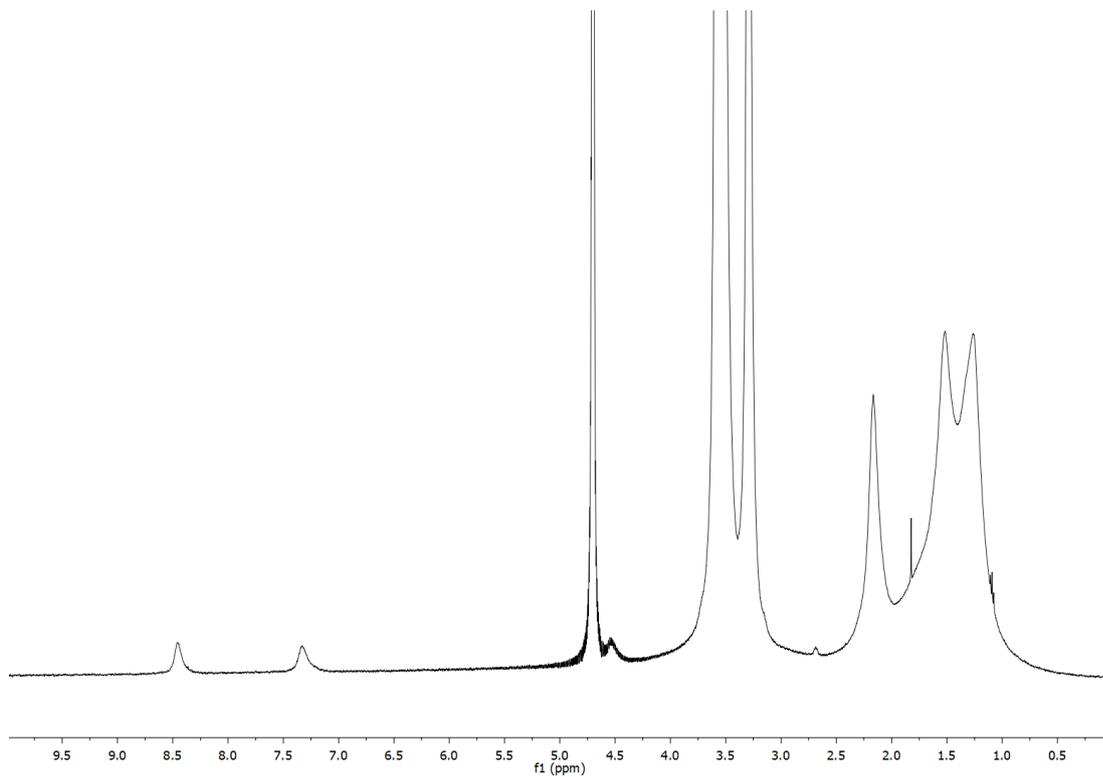


Figura 55: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O delle AuNPs N1

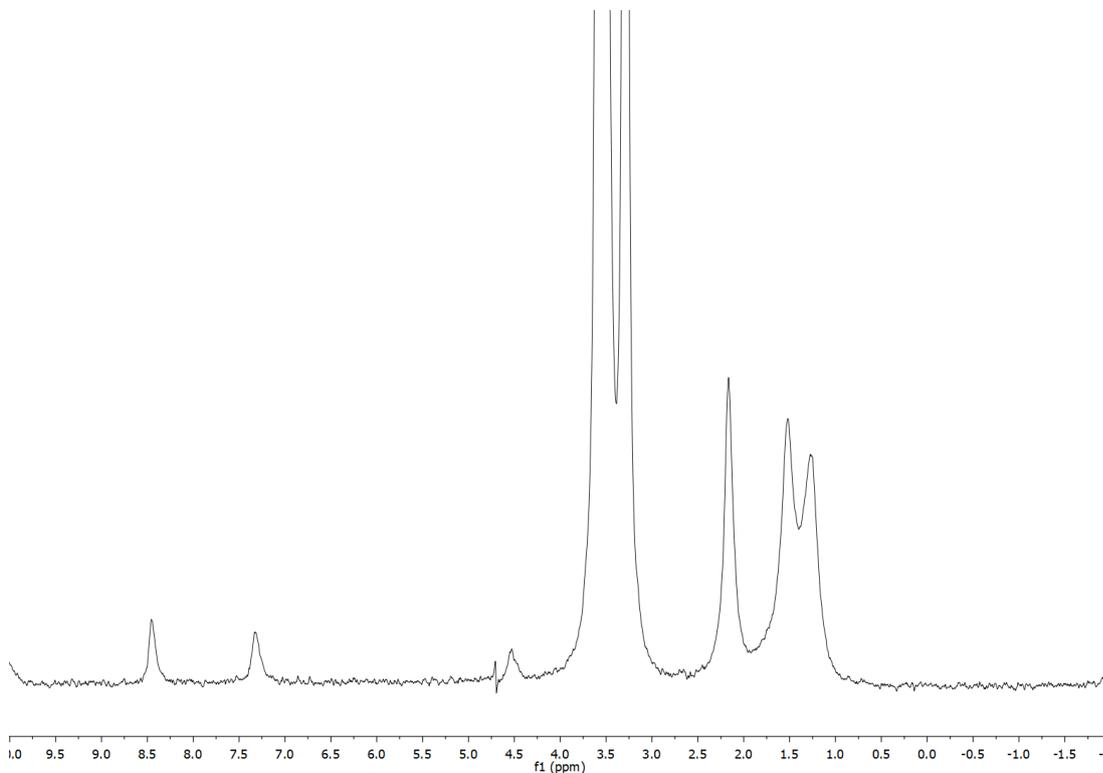


Figura 56: Spettro $^1\text{H-NMR}$ con filtro di diffusione in D_2O delle AuNPs N1.

5.4.4. Sintesi delle AuNPs con coating mistro RB39/PEG (N2)

Tutta la vetreria di laboratorio utilizzata in questi step è stata precedentemente lavata accuratamente usando una soluzione di acqua regia, in modo tale da eliminare eventuali residui di oro provenienti da reazioni di sintesi di AuNPs precedenti e che avrebbero potuto costituire siti di nucleazione non previsti. In un imbuto separatore, è stata aggiunta una soluzione di $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM = 393.83 g/mol, 1 eq, 0.05 g, 0.13 mmol) in 0.5 mL di H_2O , la quale è stata estratta per 3 volte, usando una soluzione di TOAB (PM = 546.79 g/mol, 2.5 eq, 0.174 g, 0.317 mmol) in 125 mL di toluene precedentemente lasciata a degassare per 30 minuti. La fase organica ottenuta presentava una colorazione rossa e questa è stata aggiunta la DOA (PM = 241.46 g/mol, 20 eq, 0.77 mL, 2.5 mmol). La miscela di reazione è diventata di colore nero ed è stata lasciata sotto agitazione magnetica, in atmosfera controllata di N_2 per 2 ore. Durante questa fascia di tempo si è osservata la variazione di colorazione prima da nero a incolore. La soluzione è stata successivamente raffreddata con un bagno a ghiaccio 0°C ed è stata aggiunta una soluzione di NaBH_4 (PM = 37.83 g/mol, 10 eq, 0.048 g, 1.27 mmol) in 0.5 mL di H_2O . La miscela di reazione ha cambiato il suo colore da incolore a rosso scuro ed è stata lasciata a reagire sotto agitazione, a 0°C ed in atmosfera di N_2 per altre 2 ore. Passato il tempo necessario, è stata aggiunta alla miscela, la soluzione contenente, il tiolo PEG (PM = 321.48 g/mol, 2 eq, 0.040 g, 0.123 mmol) nella minima quantità di MeOH possibile. Il sistema di reazione è stato mantenuto sotto agitazione e in atmosfera di N_2 per tutta la notte. Il giorno seguente le nanoparticelle sono state recuperate mediante centrifugazione (5000 rpm, 8 min) e lavaggio con Et_2O . Le nanoparticelle così ottenute sono state sciolte in una minima quantità di MeOH e poi precipitate con Et_2O in centrifuga per circa 5 volte. Successivamente le AuNPs sono state ridisciolte in 3 mL di MeOH e alla miscela ottenuta, è stata aggiunta la soluzione contenente il tiolo RB39 (PM = 253.40 g/mol, 0.4 eq, 0.012 g, 0.048 mmol). Il sistema di reazione è stato quindi lasciato a reagire per un giorno sempre sotto agitazione magnetica e flusso di N_2 . Le nanoparticelle ottenute sono state quindi recuperate mediante centrifugazione (5000 rpm, 8 min) e lavaggio con Et_2O . Successivamente, sono state sciolte in una minima quantità di MeOH e poi precipitate con Et_2O in centrifuga per circa 5 volte. Le AuNPs N2 così ottenute sono state purificate con colonna cromatografica ad esclusione dimensionale utilizzando la resina Sephadex LH-20 e MeOH come solvente. Sono stati ottenuti 0.013 g di AuNPs N2.

5.4.5. Caratterizzazione delle AuNPs N2

Dall'analisi TEM condotta (Figura 57), è emerso che le nanoparticelle AuNPs N2 presentano un diametro medio di 2.6 ± 0.94 nm (Figura 58). Utilizzando l'analisi TGA (Figura 59), è stato possibile stimare che la formula chimica media corrisponde a $\text{Au}_{539}(\text{SR})_{241}$. Per arricchire ulteriormente la caratterizzazione è stato acquisito lo spettro UV-Vis (Figura 60). oltre agli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^1\text{H-NMR}$ con filtro di diffusione (Figure 61-62).

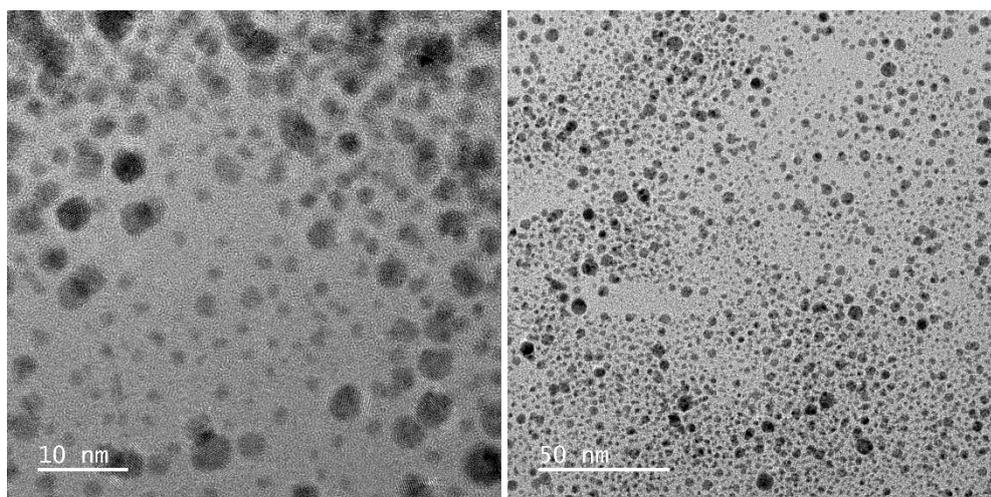


Figura 57: Immagini TEM delle AuNPs N2 a diversa magnificazione.

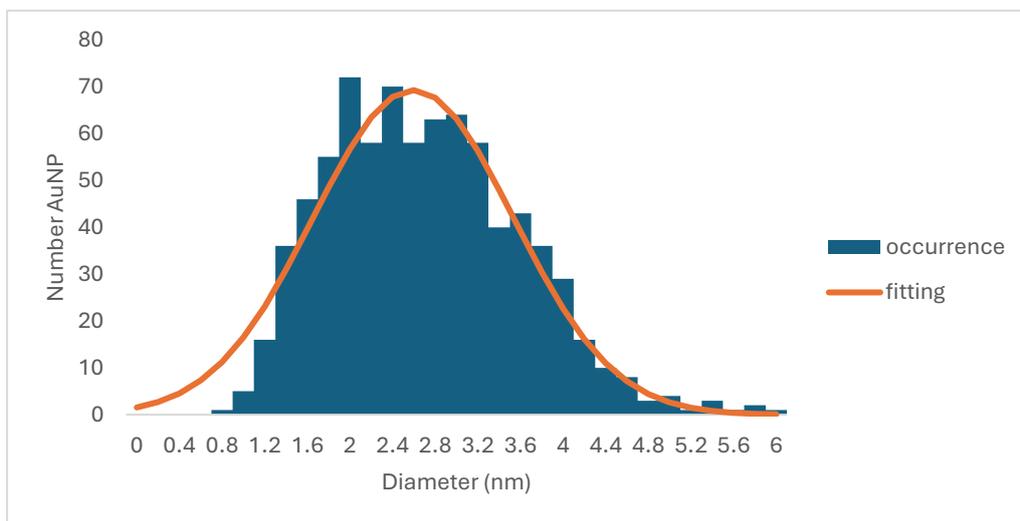


Figura 58: Grafico della polidispersione delle AuNPs N2. Il grafico mostra chiaramente che il valore medio del diametro delle nanoparticelle di 2.6 nm

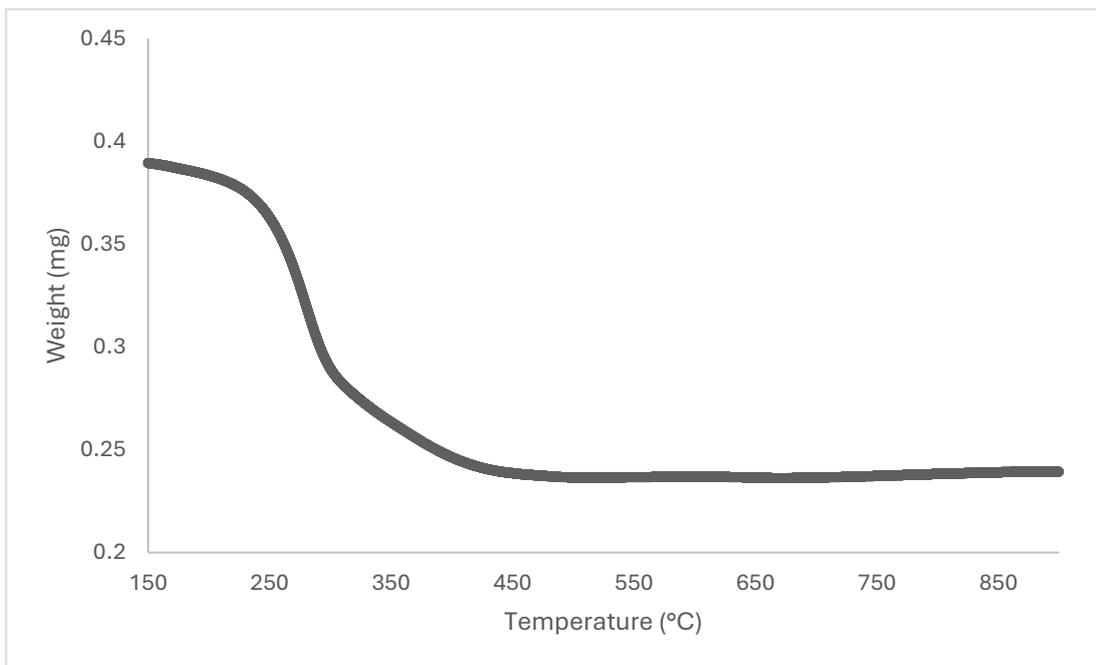


Figura 59: Grafico termogravimetrico delle AuNPs N2 sotto flusso d'aria. La perdita in massa misurata corrisponde a circa il 39.6% della massa totale

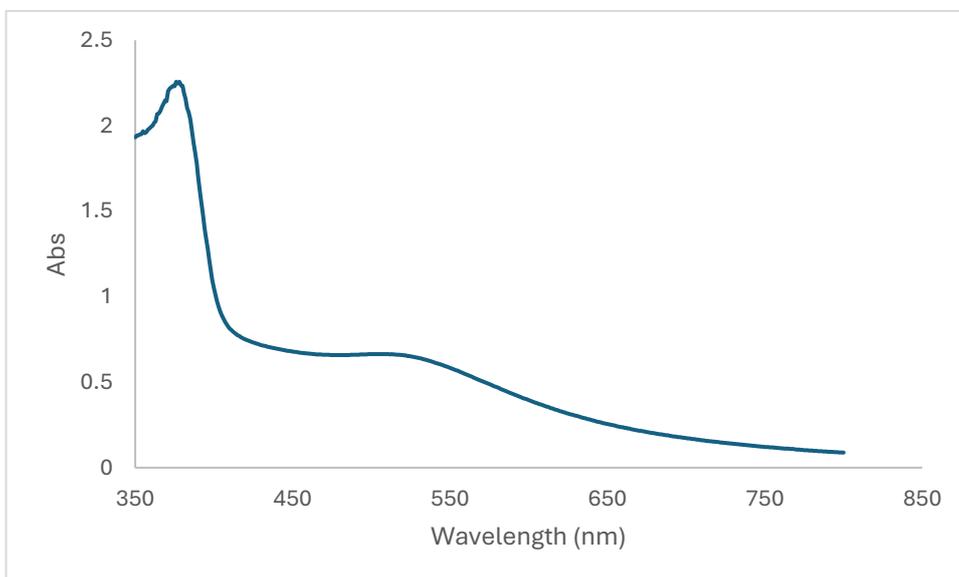


Figura 60: Grafico UV-vis delle AuNPs N2. Come si può osservare, è presente una spalla a 520 nm dovuta alla bassa frazione di nanoparticelle con nucleo di oro più grande dei 2 nm.

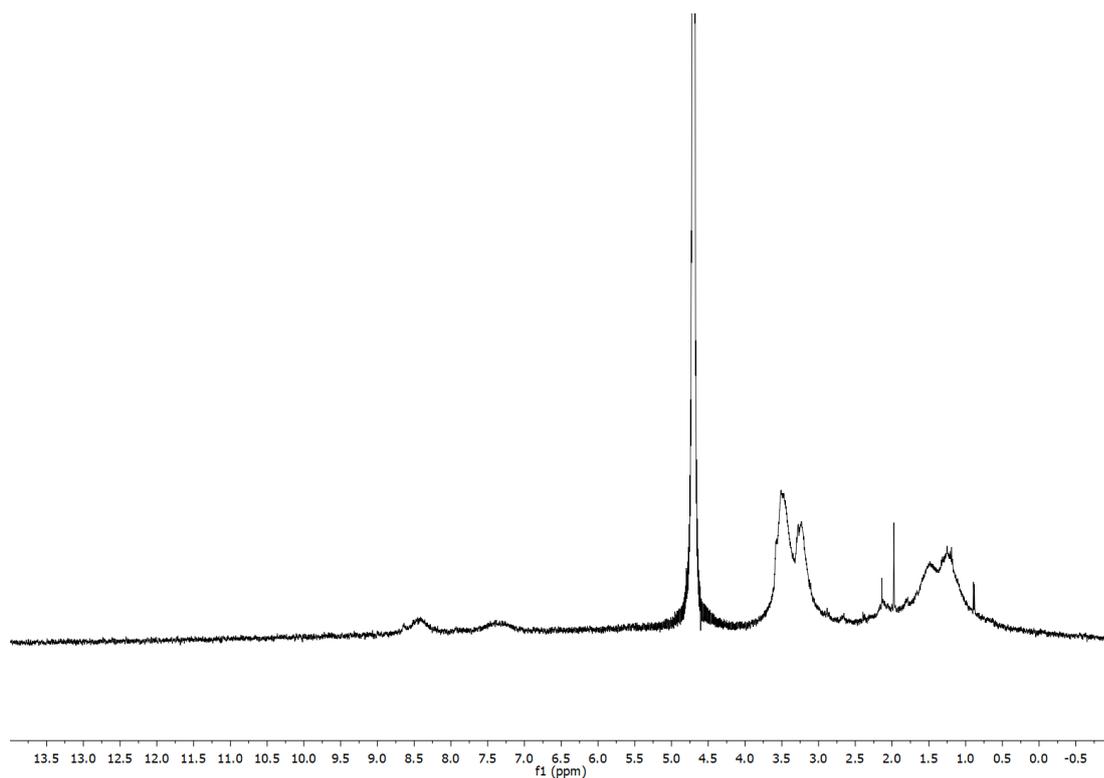


Figura 61: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O delle AuNPs N2.

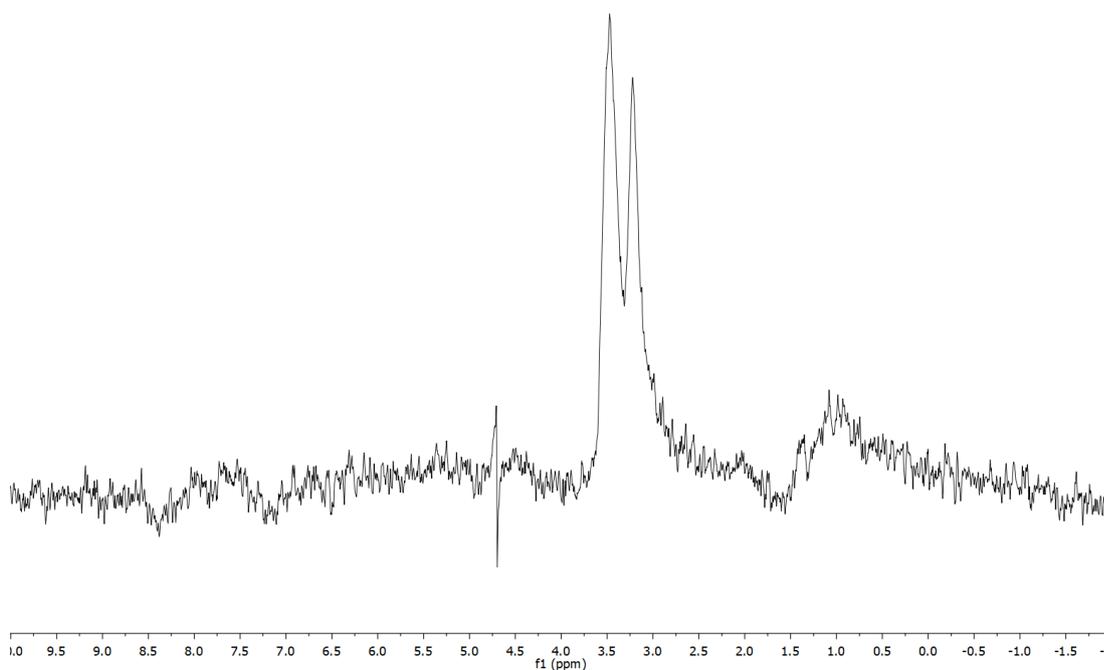


Figura 62: Spettro $^1\text{H-NMR}$ con filtro di diffusione in D_2O delle AuNPs N2.

6. Appendice

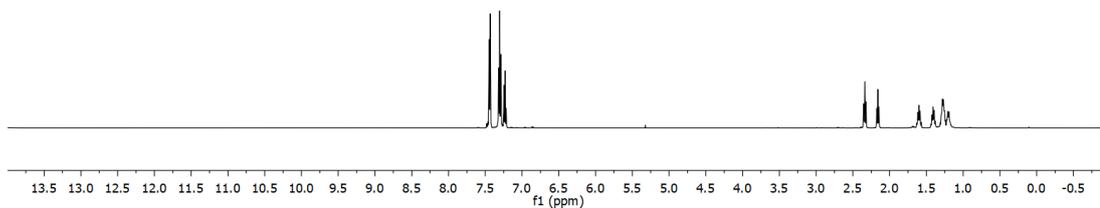


Figura 63: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto **1**

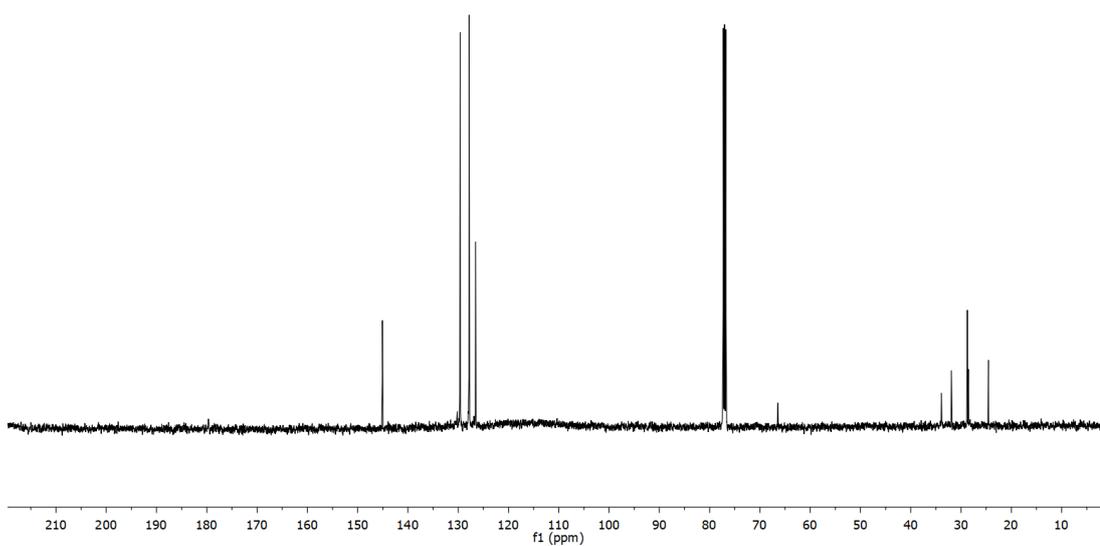


Figura 64: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 del composto **1**

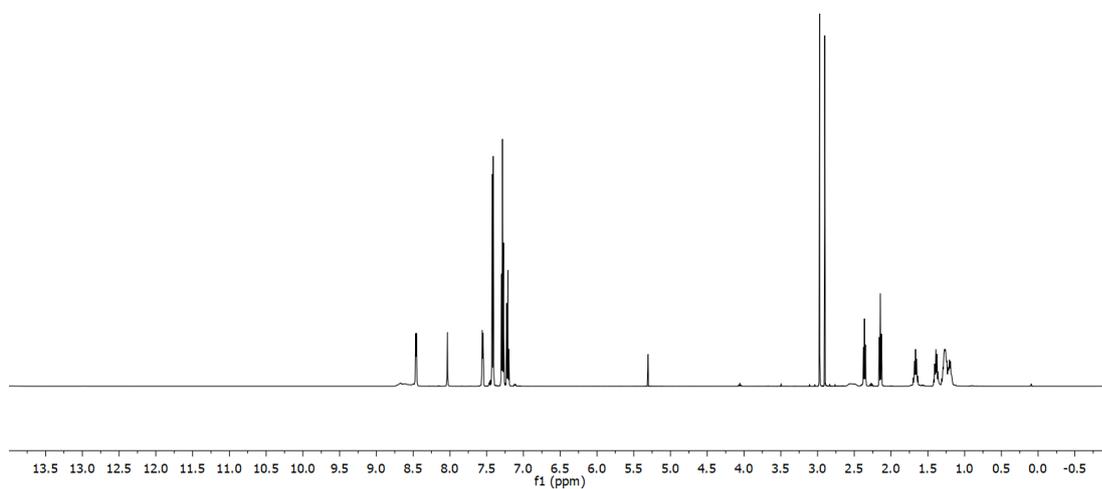


Figura 65: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto 2

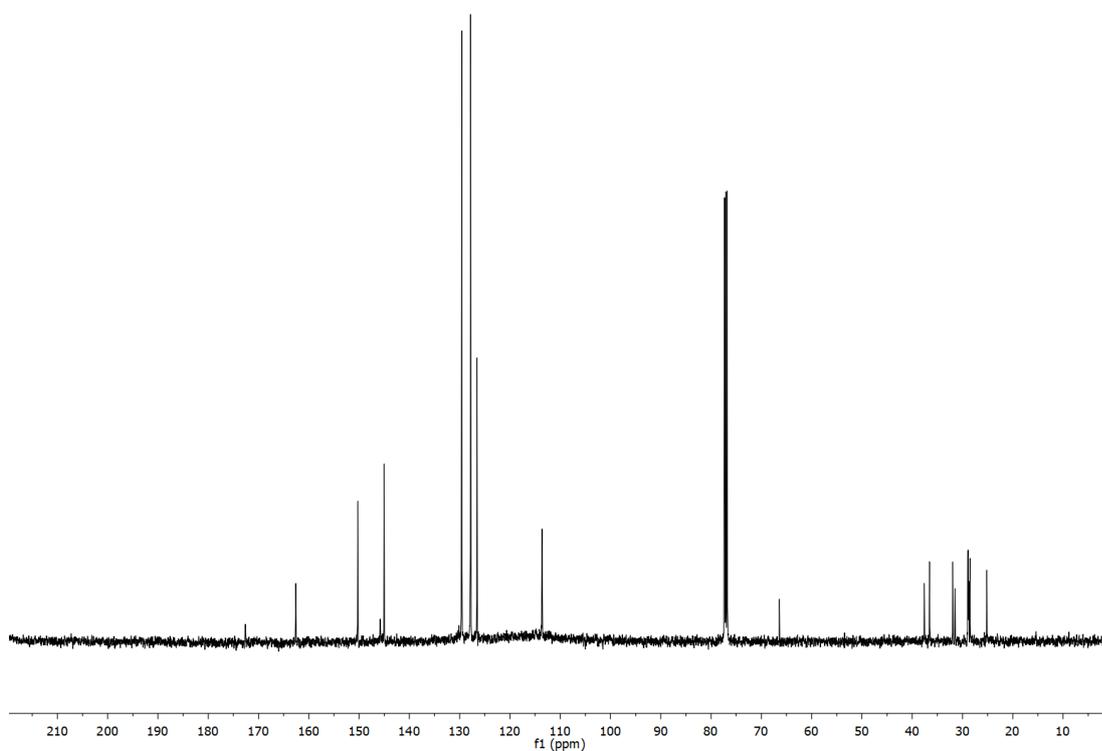


Figura 66: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 del composto 2

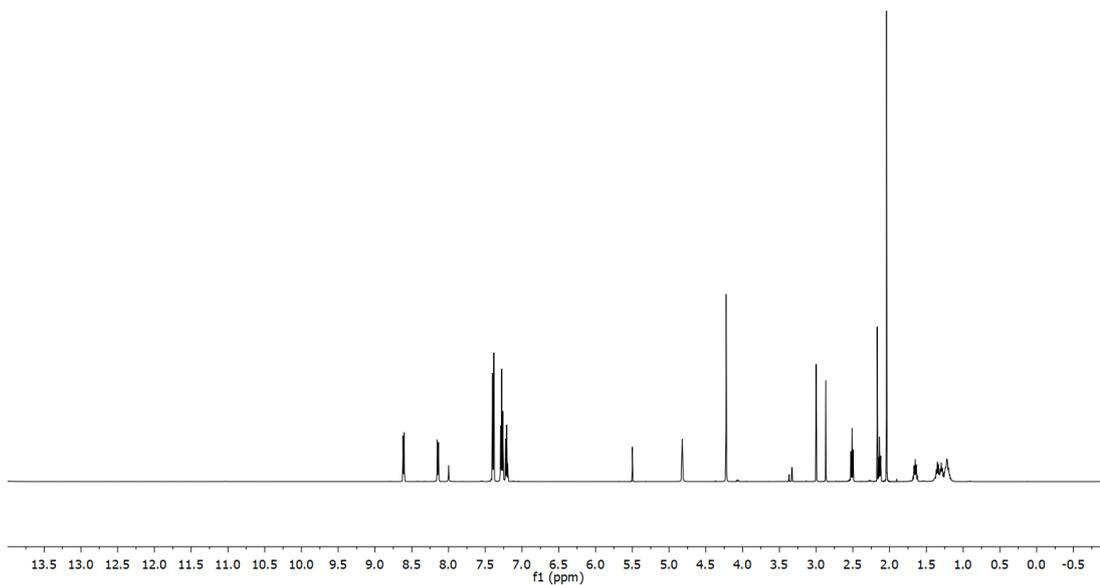


Figura 67: Spettro ^1H -NMR in MeOD del composto 3

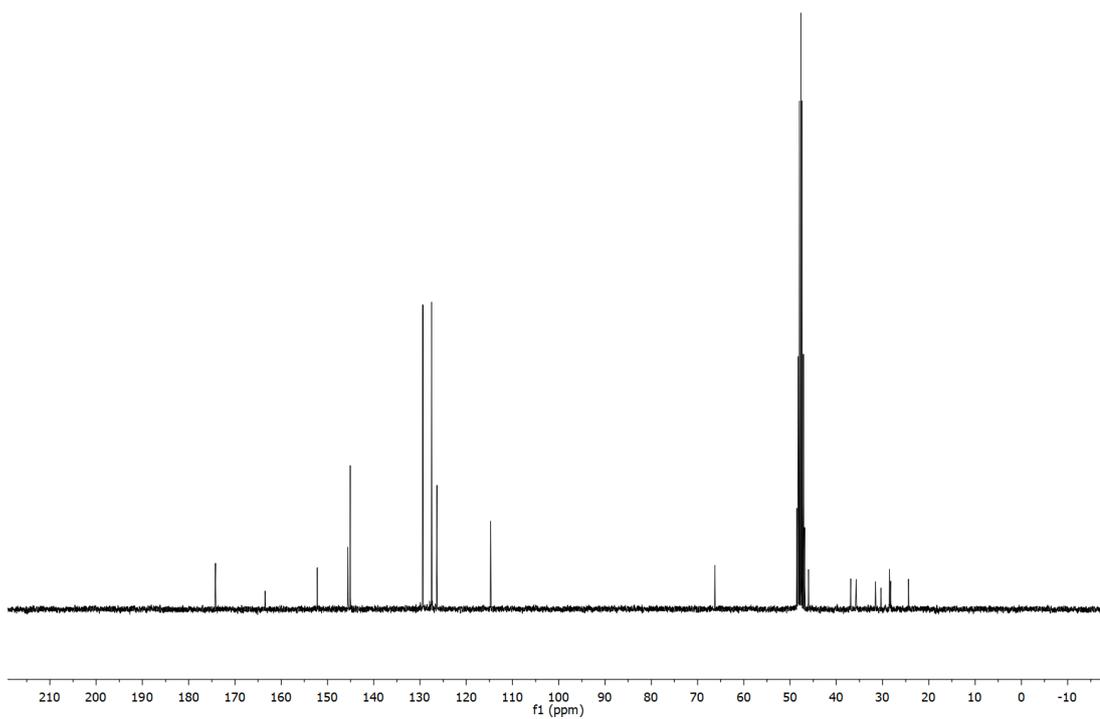


Figura 68: Spettro ^{13}C -NMR in MeOD del composto 3

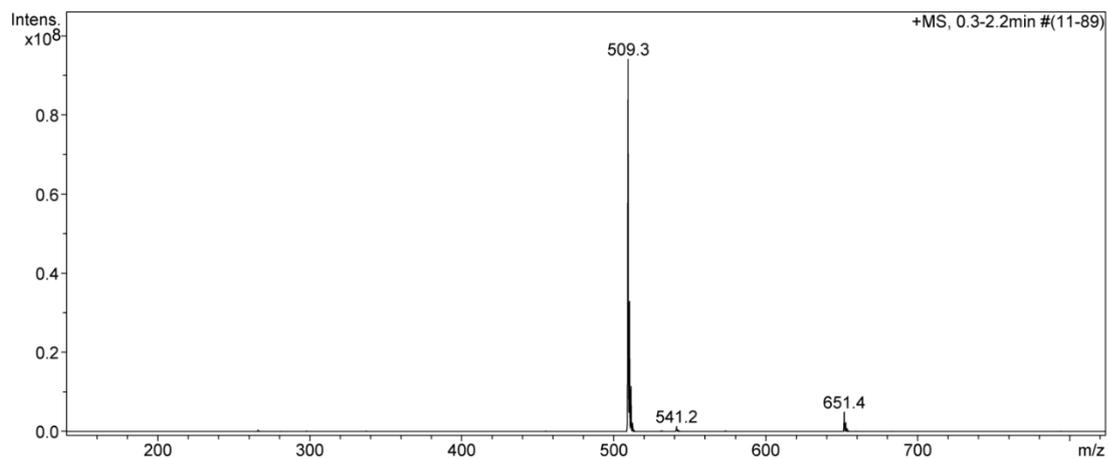


Figura 69: Spettro di massa ESI-MS in positivo del composto 3 in MeOH acido. Come si può osservare è possibile vedere il picco dello ione molecolare 509.3 m/z

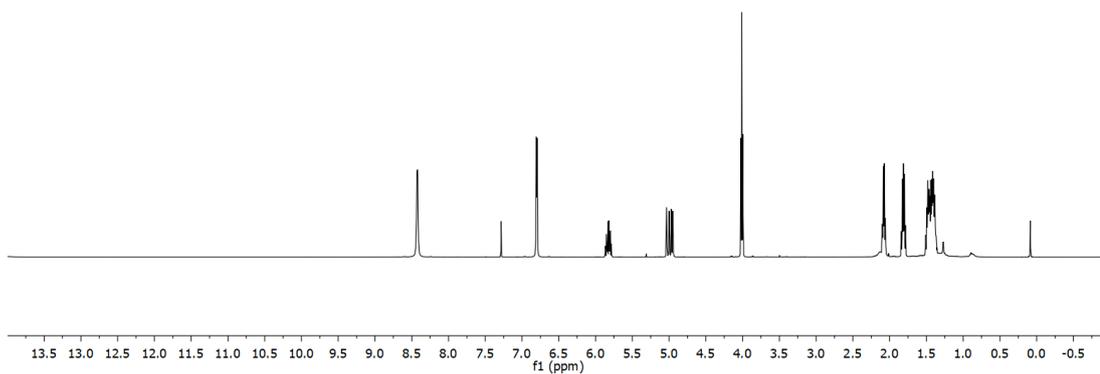


Figura 70: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto **A1**

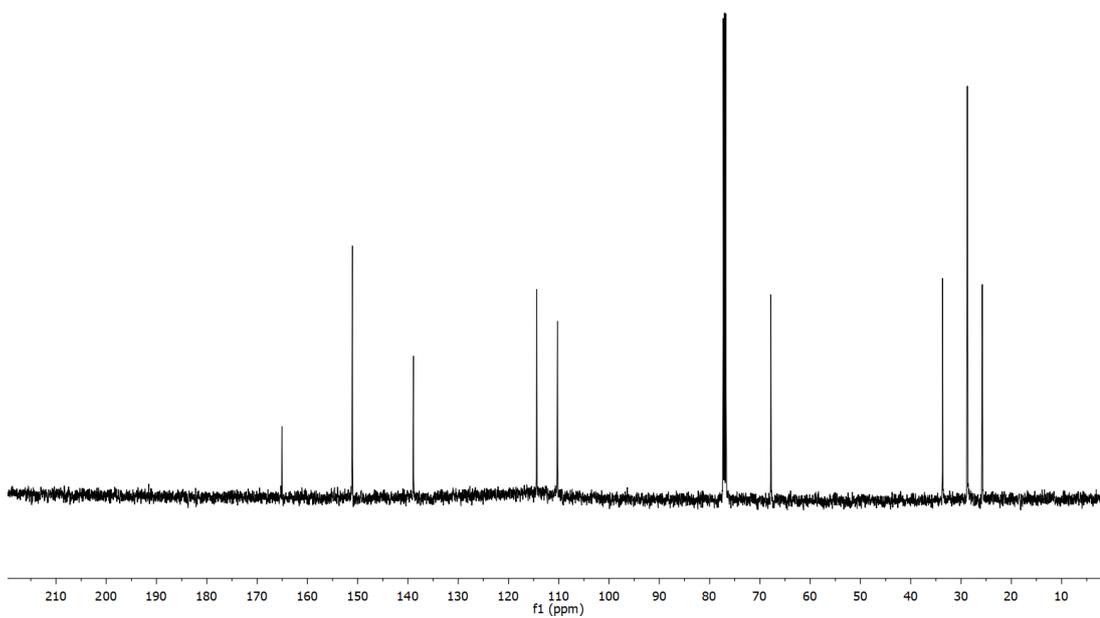


Figura 71: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 del composto **A1**

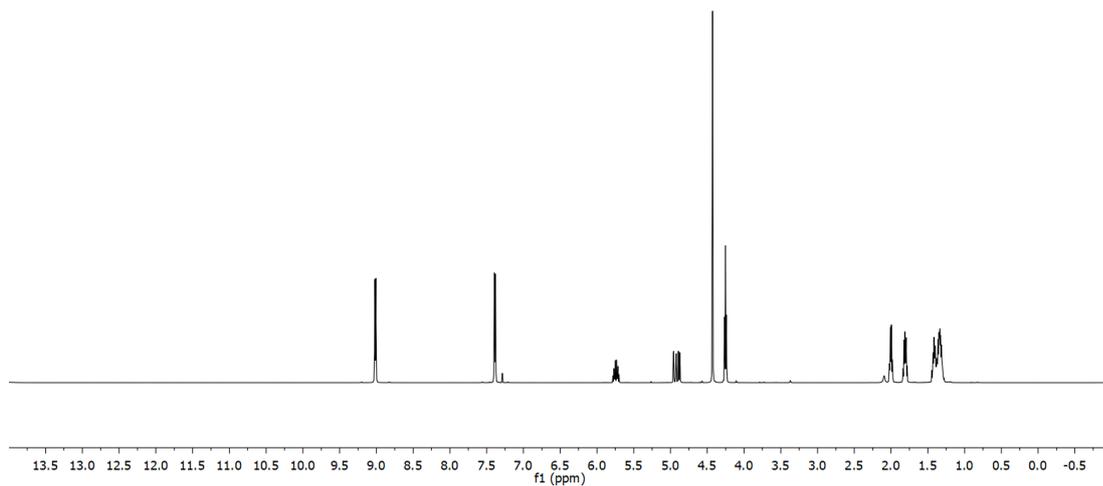


Figura 72: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto **A2**

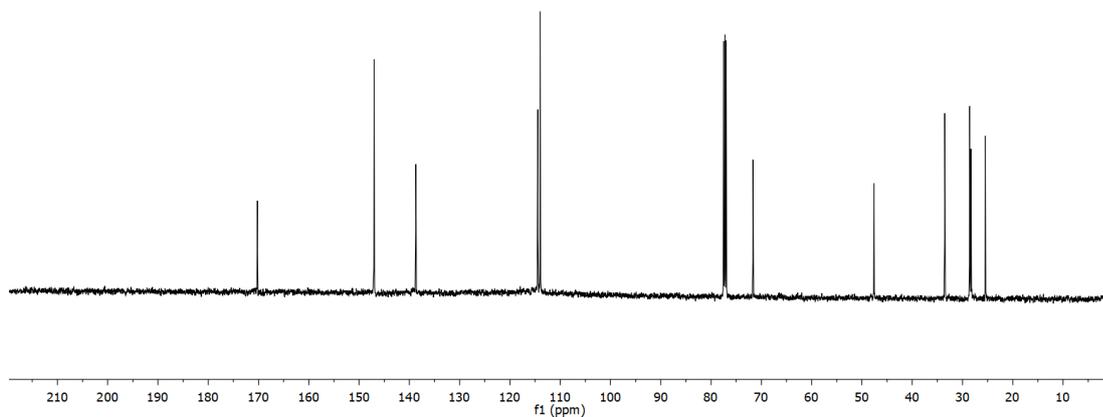
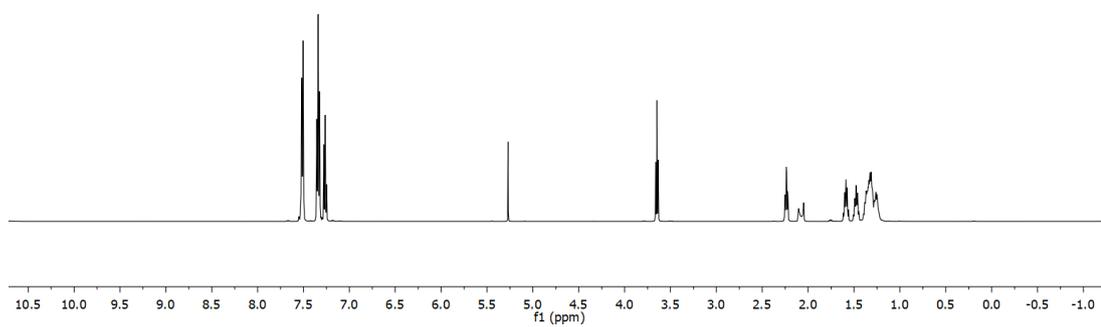


Figura 73: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 del composto **A2**



*Figura 74: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto **B1***

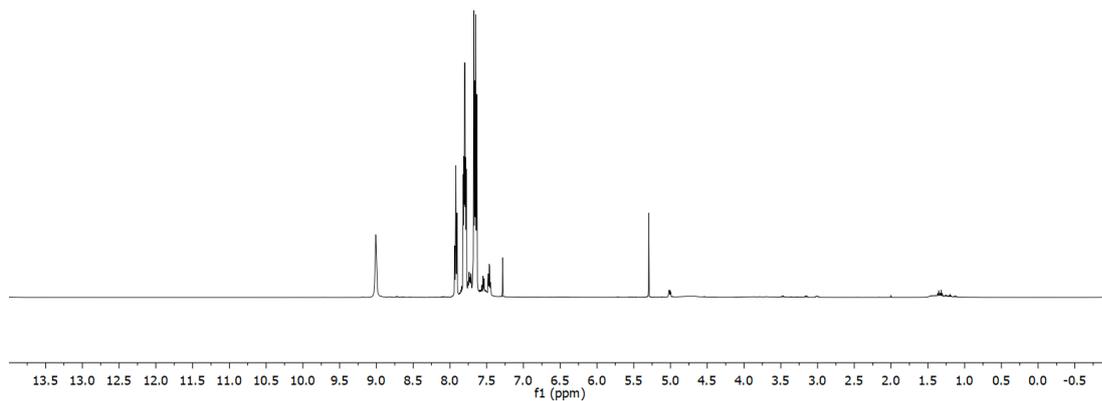


Figura 75: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 della 4-trifenilfosfopiridina.

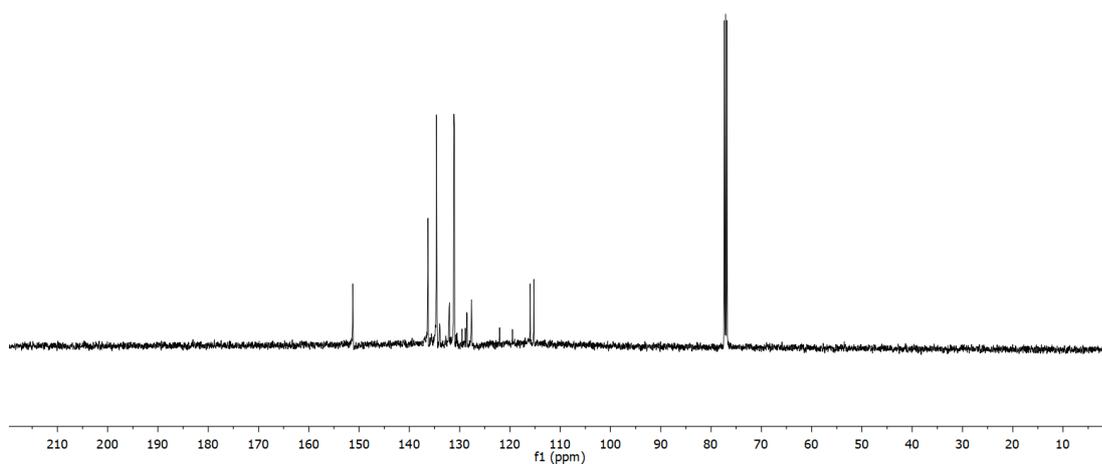
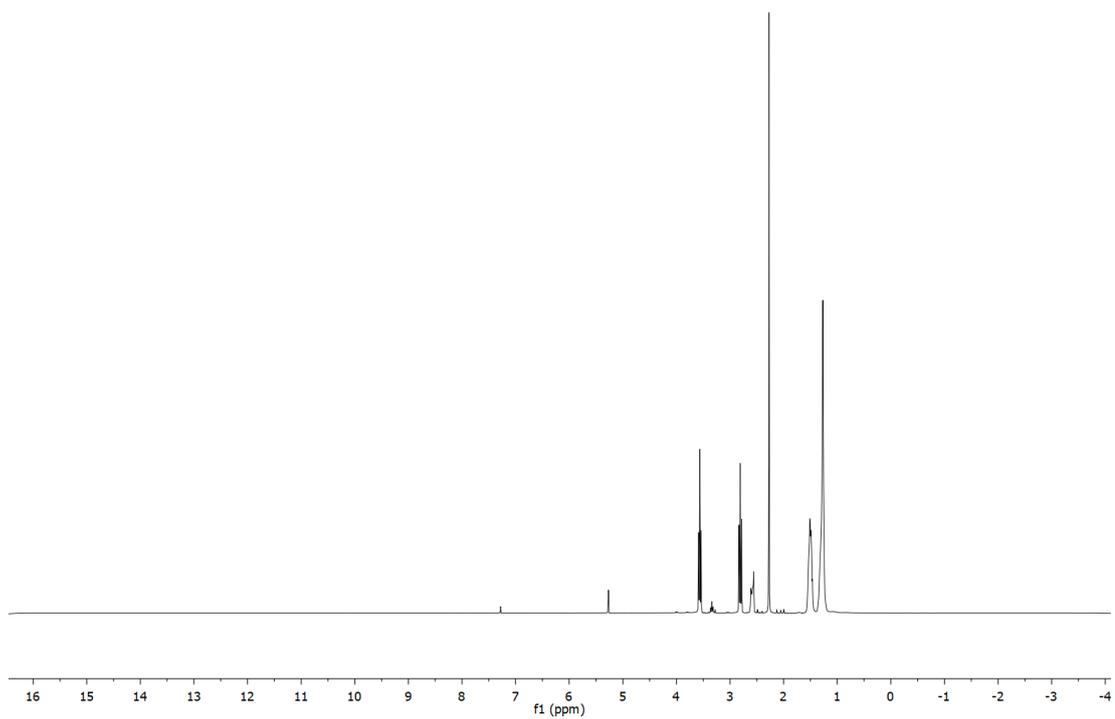


Figura 76: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 della 4-trifenilfosfopiridina.



*Figura 77: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto **C1***

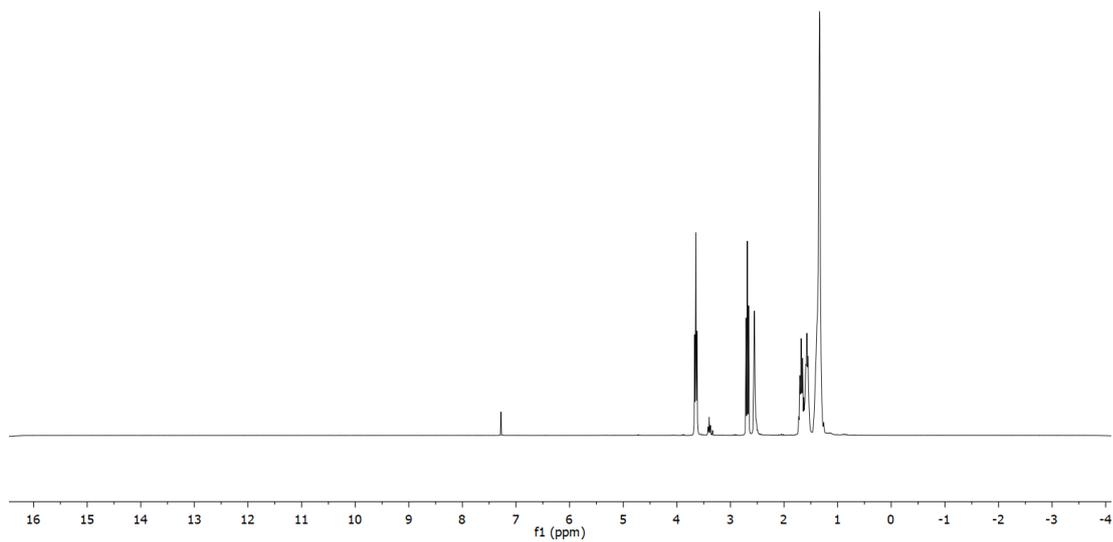


Figura 78: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto **C2**

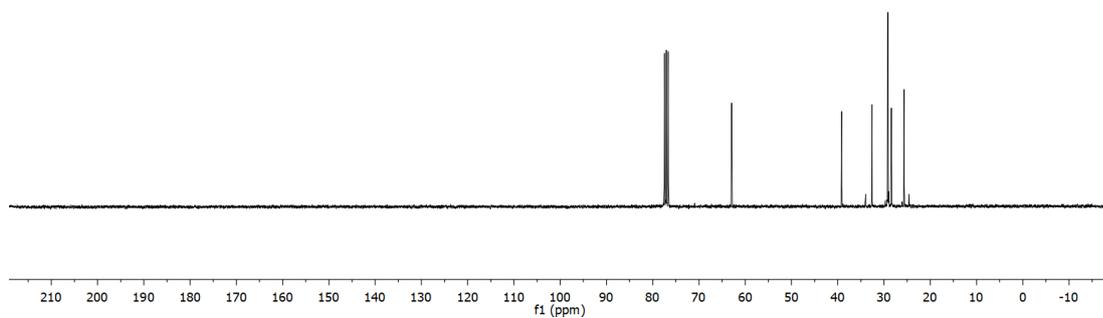


Figura 79: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 del composto **C2**

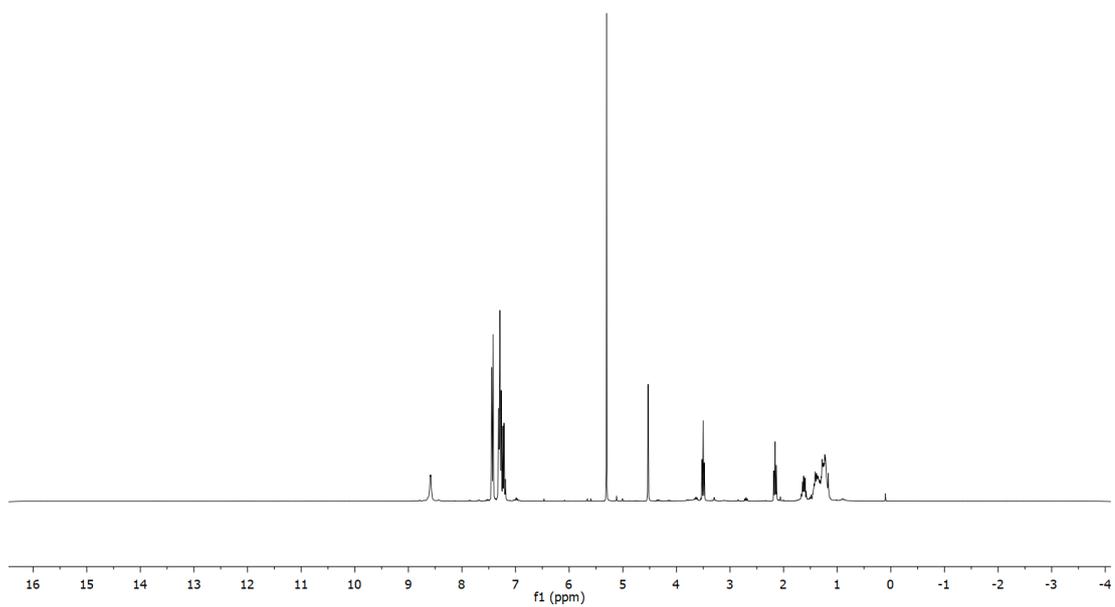


Figura 80: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 del composto 5

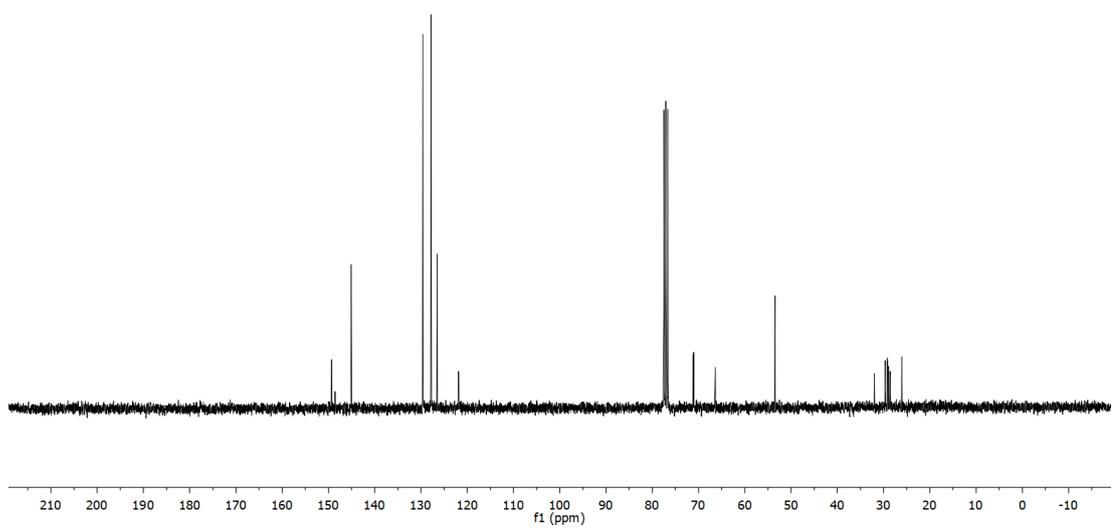


Figura 81: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 del composto 5

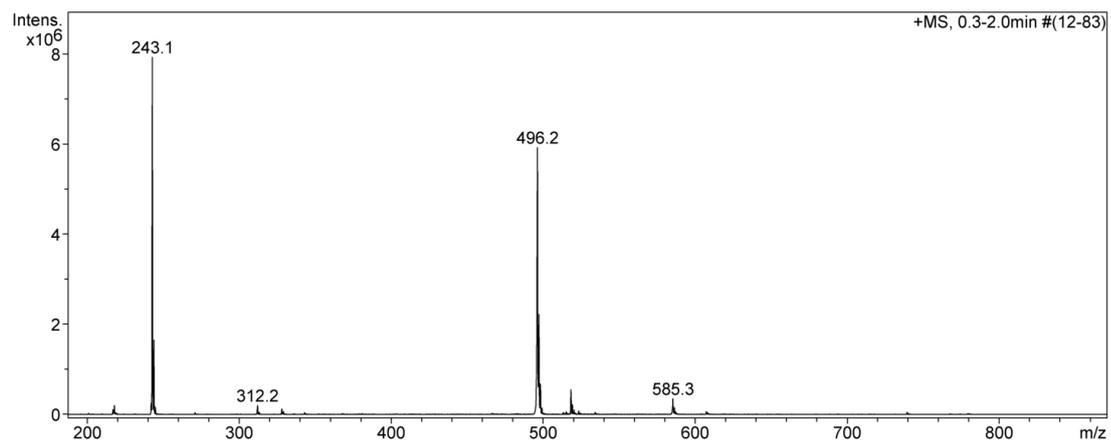


Figura 82: Spettro di massa ESI-MS in positivo del composto 5 in MeOH acido. Come si può osservare è possibile vedere il picco dello ione molecolare 496.2 m/z.

7. Bibliografia

1. Verly, I. R. N. *et al.* Catecholamines profiles at diagnosis: Increased diagnostic sensitivity and correlation with biological and clinical features in neuroblastoma patients. *European Journal of Cancer* **72**, 235–243 (2017).
2. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. vol. 538 (American Chemical Society, Washington, DC, 1993).
3. *Interfacial Design and Chemical Sensing*. vol. 561 (American Chemical Society, Washington, DC, 1994).
4. Riccardi, L. *et al.* Molecular Recognition by Gold Nanoparticle-Based Receptors as Defined through Surface Morphology and Pockets Fingerprint. *J. Phys. Chem. Lett.* **12**, 5616–5622 (2021).
5. Franco-Ulloa, S. *et al.* Molecular Mechanisms Underlying Detection Sensitivity in Nanoparticle-Assisted NMR Chemosensing. *J. Phys. Chem. Lett.* **14**, 6912–6918 (2023).
6. Mancin, F., Prins, L. J., Rastrelli, F. & Scrimin, P. Monolayer-Protected Gold Nanoparticles for Molecular Sensing and Catalysis. in *Supramolecular Chemistry in Water* (ed. Kubik, S.) 413–447 (Wiley, 2019). doi:10.1002/9783527814923.ch11.
7. Fabbri, L., Licchelli, M., Pallavicini, P., Perotti, A. & Sacchi, D. An Anthracene-Based Fluorescent Sensor for Transition Metal Ions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1975–1977 (1994).
8. Shah, M. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Front Biosci* **19**, 1320 (2014).
9. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **0**, 801–802 (1994).
10. Riccardi, L. *et al.* Nanoparticle-Based Receptors Mimic Protein-Ligand Recognition. *Chem* **3**, 92–109 (2017).
11. Kotov, N. A. Inorganic Nanoparticles as Protein Mimics. *Science* **330**, 188–189 (2010).
12. Drechsler, U., Erdogan, B. & Rotello, V. M. Nanoparticles: Scaffolds for Molecular Recognition. *Chemistry A European J* **10**, 5570–5579 (2004).

13. Diez-Castellnou, M., Salvia, M., Springhetti, S., Rastrelli, F. & Mancin, F. Nanoparticle-Assisted Affinity NMR Spectroscopy: High Sensitivity Detection and Identification of Organic Molecules. *Chemistry A European J* **22**, 16957–16963 (2016).
14. Manea, F., Bindoli, C., Polizzi, S., Lay, L. & Scrimin, P. Expeditious Synthesis of Water-Soluble, Monolayer-Protected Gold Nanoparticles of Controlled Size and Monolayer Composition. *Langmuir* **24**, 4120–4124 (2008).
15. Hilton, M. C., Dolewski, R. D. & McNally, A. Selective Functionalization of Pyridines via Heterocyclic Phosphonium Salts. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 13806–13809 (2016).